

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Verbundvorhaben

**Entwicklung holistischer Formulierungsverfahren für den biologischen
Pflanzenschutz von Beerenobst (HOPE)**

Zuwendungsempfänger: BIOCARE Gesellschaft für biologische Schutzmittel mbH (BIO)

Förderkennzeichen: 2818807E19

Berichtszeitraum: 15.04.2021 – 31.12.2024

Veröffentlicht am: 30.06.2025

I. Kurze Darstellung (max 2 Seiten)

- a. Ursprüngliche Aufgabenstellung sowie der wissenschaftliche und technische Stand an den angeknüpft wurde

Zur Förderung innovativer und nachhaltiger Pflanzenschutzverfahren im Gartenbau wurde vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) das Vorhaben „Entwicklung holistischer Formulierungsverfahren für den biologischen Pflanzenschutz von Beerenobst-HOPE“ gefördert (Laufzeit 04/2021-12/2024). Die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) betreute das Vorhaben als Projektträgerin. Die Koordination hatte die Hochschule Bielefeld (HSBI) inne.

Das Projektziel von HOPE war ein ganzheitlicher Schutz für Beerenobst gegen Schädlinge wie *D. suzukii* und bodenbürtige Schädlinge, bei der zwei Hauptansätze verfolgt wurden:

1. **Oberirdischer Schutz:** Entwicklung einer Sprühapplikation basierend auf Virusformulierungen, die sich als wirkungsvoll gegen *D. suzukii* erweisen.

2. **Unterirdische Bekämpfung:** Einführung einer Attract-and-Kill-Strategie mit entomopathogenen Pilzen zur Schädlingsbekämpfung, kombiniert mit CO₂-produzierenden Lockstoffen.

Das Projekt fokussiert sich auf nachhaltige Lösungen, die die Umwelt schonen und im konventionellen wie biologischen Anbau anwendbar sind, um Landwirten effektive Alternativen zu bieten.

Gegen die gefurchten Dickmalrüssler wurde auf der polymerhaltigen Kapselformulierung aufgebaut, die bereits gegen Drahtwürmer erfolgreich eingesetzt wurde.

- b. Ablauf des Vorhabens

Beim Screening nach Viren mit Wirksamkeit gegen *D. suzukii* (AP1), wurde innerhalb der vorgesehenen Zeit zwei Viruskandidaten, DCV und LJV identifiziert. Die Massenvermehrung der ausgewählten insktenpathogenen Viren wurde in der Etablierung eines robusten Kultivierungsverfahrens in Schneider S2-Zelllinien realisiert (AP2). Die Entwicklung kostengünstiger technischer Formulierungsverfahren für Insektenviren wurde auf Basis quervernetzter kationischer Polymere durchgeführt, bei der eine über mehrere Wochen formstabile Hülle für die Viren konstruiert wurde (AP3). Für die unterirdische Bekämpfung wurde die Auswahl und Anzucht entomopathogener Pilze als geeignete Kill-Komponente gegen bodenbürtiger Schädlinge abgeschlossen, bei der sich ein Isolat von *Metarhizium brunneum* als geeigneter Kandidat erwiesen hat (AP4). Für die Entwicklung einer Attract-and-Kill-Strategie wurden Umweltbedingungen die für Heidelbeerpflanzen spezifisch sind, wie

niedriger Boden pH-Wert und die Entwicklung eines geeigneten Granulats berücksichtigt, die wertvolle Erkenntnisse für eine optimale unterirdische Formulierung lieferte (AP5). Ein zentraler Meilenstein konnte durch die erfolgreiche orale Verfütterung und Wirksamkeit der Virenkandidaten in adulten und larvalen Stadien von *D. suzukii* erreicht werden; Infektionsversuche mit verschiedenen Pilzstämmen zeigte Wirksamkeiten der Pilze gegenüber bodenbürtigen Schädlingen, bei der vor allem der *M. brunneum* als das Isolat der Wahl zeigte, da die anderen getesteten Stämme eine geringere Sporenbildung aufwiesen (AP6). Das Projekt wurde mit praxisnahen Versuchen im Gewächshaus (GWH) und in Heidelbeerkulturen abgeschlossen (AP7).

c. Wesentliche Ergebnisse sowie ggf. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Skalierung von Labor- zu feldnahen Bedingungen brachte einige Herausforderungen mit sich, die dem Projektdesign geschuldet (einmaliger Praxistest im letzten Projektjahr) keine Optimierung und Implementierung der „Lessons learned“ im Folgejahr erlaubte. Es zeigte sich beispielsweise, dass der Versuchsaufbau im GWH im Hochsommer durch Austrocknung der Viruspräparate und Nahrungsquellen für die Fliegen problematisch ist.

Zusammenfassend konnte durch die enge Zusammenarbeit zwischen den verschiedenen Forschungseinrichtungen und Unternehmen vielversprechende Virusisolaten wie das Drosophila C Virus (DCV) und das La Jolla Virus (LJV) identifiziert und deren Massenproduktion erfolgreich etabliert werden. Diverse Formulierungen wurden entwickelt, um die Wirksamkeit dieser Viren zu maximieren und die Anwendung im Freiland zu ermöglichen. Zudem wurde die Interaktion zwischen entomopathogenen Pilzen und deren Implementierung für eine Attract-and-Kill Strategie untersucht, um innovative Bekämpfungsstrategien für bodenbürtige Schädlinge von Heidelbeerkulturen zu entwickeln. Wissenschaftlich konnten durch dieses Projekt mehrere Publikationen und Vorstellungen auf Fachtagungen eine Sichtbarkeit erreichen.

II. Eingehende Darstellung (max 20 Seiten)

- a. der im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Arbeiten, insbesondere im Vergleich zur ursprünglichen Vorhabenbeschreibung. Die Verwendung der Zuwendung sowie die erzielten Ergebnisse im Einzelnen müssen nachvollziehbar sein.

AP2 Massenvermehrung ausgewählter insektenpathogener Viren

AP2.2 Scale-up der Kultivierung

Das Ziel des AP2 (AP2.2) war die Entwicklung eines Herstellungsverfahrens, mit dem insektenpathogene Viren wirtschaftlich und massenhaft mit hoher räumlicher und zeitlicher Ausbeute zur Kontrolle der Ausbreitung von *D. suzukii* vermehrt werden können. Von beiden ausgewählten Virusisolaten, die eine letale Wirkung auf *D. suzukii* besitzen, nämlich Drosophila C Virus (DCV) und La Jolla Virus (LJV), wurde LJV für den Scale-up im Zeitraum 2023-2024 verfolgt. Nach der erfolgreichen Massenproduktion bei THM-Projektpartner, wurde das Produktions-Know-How für eine stabile, automatisierte und kontinuierliche Produktion von LJV in Liter-Skalierung realisiert.

Die Vorkulturen von S2-Zellen wurden verwendet, um die ursprüngliche Zellkonzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/mL in Sf-900™ II SFM Medium und Vitalitätsparameter von über 95% einzustellen. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei 28 °C und höchstens 100 rpm in CO₂-Umgebungsluft erreichte die Konzentration über 3×10^7 Zellen/mL. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die S2-Zellen passagiert oder in Cryostocks zur Aufbewahrung eingelagert (10^6 Zellen/Aliquot). S2-Zellen wuchsen bei definierten Bedingungen als ungeklärte, lose, halb adhärenente Monolayer (s. Abbildung 1).

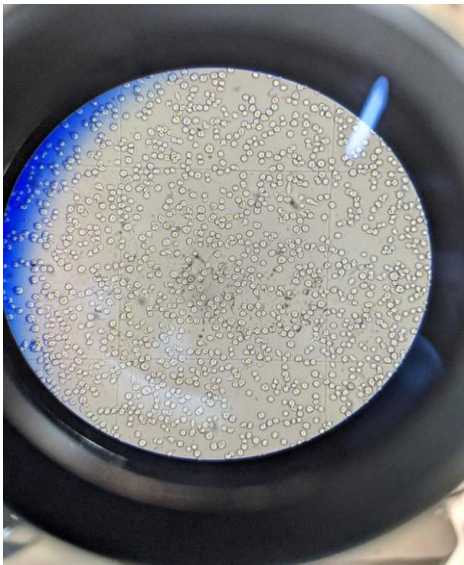


Abbildung 1: Lebende ausgewachsene S2-Zellen, die für die LJV-Kultivierung verwendet wurden.

Für die Virus Kultivierung wurden frische S2-Zellen mit einer MOI (Multiplicity of Infection) von 0,01 infiziert und mit frischem Medium zum Arbeitsvolumen, das 25% nicht überschreitet, ausgefüllt. Nach 4-tägiger Inkubation wurden infizierte S2-Zellen bei -80 °C über Nacht eingefroren, damit die Viren sich im Überstand freisetzen. Der Überstand wurde mittels der Zentrifugation überführt, gepoolt und bei -80 °C zur Qualitätssicherung und SXC-Aufreinigung eingefroren. Durch die optimierte Massenproduktion konnten Virustiter von bis zu 10^{11} Genomäquivalenten pro ml erreicht werden.

AP3 Entwicklung von technischen Formulierungsverfahren für Insektenviren

AP 3.2 Scale-up der Formulierungsverfahren für Insektenviren

Der Scale-Up der Formulierungsmethode zu BIO war sehr komplex und zeitlich begrenzt. Es wurden mit ersten Planungen begonnen. Erst 2024 hat FHB-Projektpartner finale Verkapselung von LJV und Formulierung inklusive UV-Schutzmittel, Lockmitteln und Haftungsmitteln unternommen. Mehrere Phytotoxizität-, UV-Stabilität-, Toxizität-, Blattanhaftungsversuche mit *D. suzukii* standen noch offen. Leider haben einige nicht eingekapselte Adjuvantien schon schädliche Auswirkungen auf Insekten gezeigt. Weitere Stabilitätstests müssen durchgeführt werden. Diese offenen Punkte ließen es problematisch erscheinen, die Reproduzierbarkeit in einem Scale-up Verfahren der Formulierung mit hohen Verkapselungseffizienz zu realisieren.

AP4 Auswahl und Anzucht entomopathogener Pilze als Kill-Komponente

Das Pilzisolat *Metarhizium brunneum* Cb15-III wurde 2022 als Ausgangspunkt für die Kill-Komponente gewählt. Die Anzucht der Hauptkultur erfolgte entweder in Schüttelkolben oder in Fermenter (s. Abbildung 2) bei 23 °C, 150 rpm für 96 Stunden.



Abbildung 2: Das Kultivierungsverfahren von *M. brunneum* Cb15-III unter definierten Bedingungen im Fermenter.

Der Fokus der Auswahl lag hier auf den speziellen Wachstumsbedingungen im Wurzelraum der Heidelbeere, die einen sehr sauren pH-Wert und einen stark humoses Substrat benötigt.

Die Kultivierung erfolgte daher bei einem pH-Wert von 6 und unter sauren Bedingungen bei einem pH-Wert von 4, um den sauren Boden im Heidelbeerfeld zu simulieren.

Die optimierte Kultivierungsverfahren führten zur Steigerung des Ertrags der Pilz-Biomasse (Sporen-Myzel-Verhältnis) und zur Verbesserung der Trocknungsfähigkeit durch Erzeugung von Stressbedingungen.

Nach Beendigung der Kultivierung, wird das Pilzmycel zur weiteren Verwendung mittels Vakuumpumpe über sterile Filter geerntet. Zur Beurteilung, ob sich der ausgewählte Pilz für die vorgesehene technische Verarbeitung, sowie die in der Anwendung herrschenden Bedingungen eignet, wird das Pilzmycel in die ausgewählte Prototypformulierung der stärkehaltigen Alginatkapsel eingearbeitet.

Zusätzlich wurden weitere Isolate des Pilzes *Beauveria* sp., *M. brunneum* und *Isaria fumosorosea* auf ihre Virulenz gegenüber Engerlingen getestet. Die Isolierung und Testung von Dickmaulrüssler hat sich im 2022 als schwierig herausgestellt. Die Witterungsverhältnisse hatten eine Isolation großer Mengen an Dickmaulrüsslern verhindert. Die Menge, die ausgegraben werden konnten, war für die nachfolgenden Experimente nicht ausreichend. Zudem waren die Larven, die zur Verfügung standen, nicht im optimalen Zustand, d.h. die Engerlinge waren sehr empfindlich und verstarben teilweise bereits als Kontrollgruppe, daher wurden Experimente mit Junikäfern durchgeführt.

AP5 Entwicklung einer Attract-and-Kill-Strategie mit entomopathogenen Pilzen

AP5.2 Scale-up des entwickelten Formulierungsverfahrens

Zusätzlich zum entomopathogenen Pilz wird die Backhefe *Saccharomyces cerevisiae* verkapselt (s. Abbildung 3).

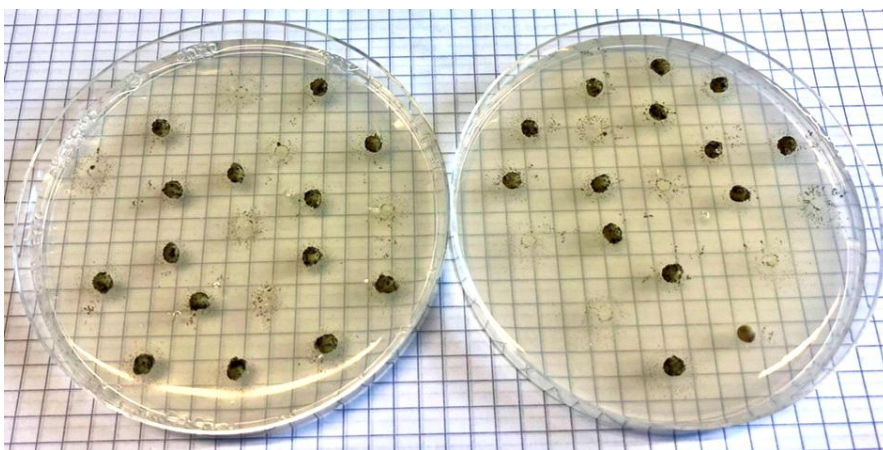


Abbildung 3: Sporulierender *Metarhizium brunneum* Cb15-III (ausgewachsene grüne Konidien) in Attract+Kill Kapseln auf H₂O-Agar Nährmedium.

Hierbei greifen synergistische Effekte zwischen Pilz und Hefe zur Attract-and-Kill Strategie. Der Pilz spaltet die zugegebene Stärke zu Glucose, welche durch die Hefe verstoffwechselt

wird. Dabei entsteht CO_2 , welches in Böden regulär von Insekten als Orientierungspunkt für Pflanzenwurzeln wahrgenommen wird. Durch die Freisetzung von CO_2 aus der Kapsel Formulierung werden die Insekten somit von den Wurzeln weg zur Kapsel hingelockt, wodurch der Kontakt mit dem entomopathogenen Pilz erfolgt, der die Insekten infiziert und dadurch die Populationsgröße verringert. Nach der Herstellung und Trocknung der Kapseln wurden diese auf ihr Sporulationsverhalten hin untersucht, da die gebildeten Aerokonidien, die sich an der Kapseloberfläche befinden, die infektiösen Partikel sind, die das Schadinsekt in seinem Bestand reduzieren sollen.

Im Rahmen dieses Arbeitspakets wurden die Trocknungsrezepte auf ein technisches Trocknungsverfahren (Wirbelschichttrocknung sowie auch das Coating) erfolgreich übertragen. Im Rahmen der Scale-ups Etablierung haben wir die Bestimmung von Eckdaten für ein kombiniertes Formulierungs- und Trocknungsverfahren durchgeführt.

GEO hat uns ihr Granulat in verschiedenen Größen mit verschiedenen Stärkeanteilen geliefert (s. Abbildung 4).

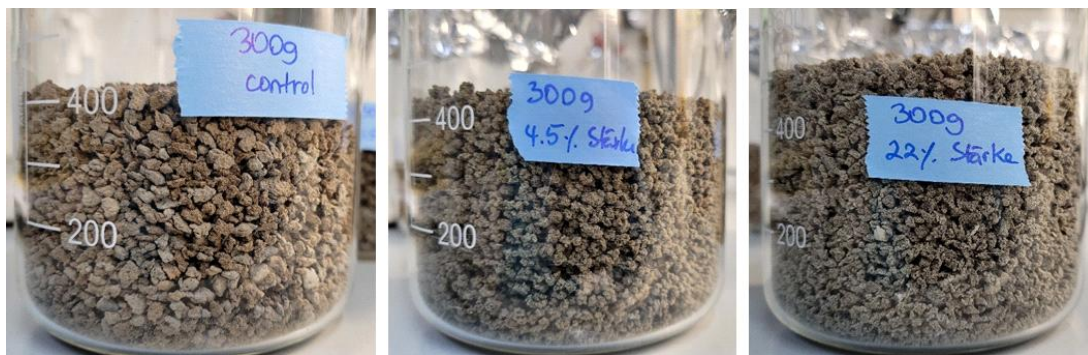


Abbildung 4: Verschiedene Geohumus Granulate, die für die Beschichtung verwendet wurden.

Dieses haben wir mit unterschiedlichen Coatings (mit und ohne Stärke, Cellulose, Hefe, *Metarhizium brunneum* Cb15-III) gecoated und das Pilzwachstum und die Sporenbildungsrate ausgewertet (s. Abbildung 5, Abbildung 6 und Abbildung 7).

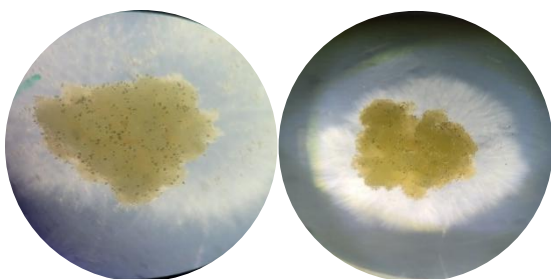


Abbildung 5: Auswuchs von *Metarhizium brunneum* Cb15-III aus gecoateten Granulat nach 14 Tagen Inkubation bei 23 °C auf H_2O -Agar Nährmedium.



Abbildung 6: Myceldurchmesser (in cm) von verschiedenen gecoateten Geohumus Granulat

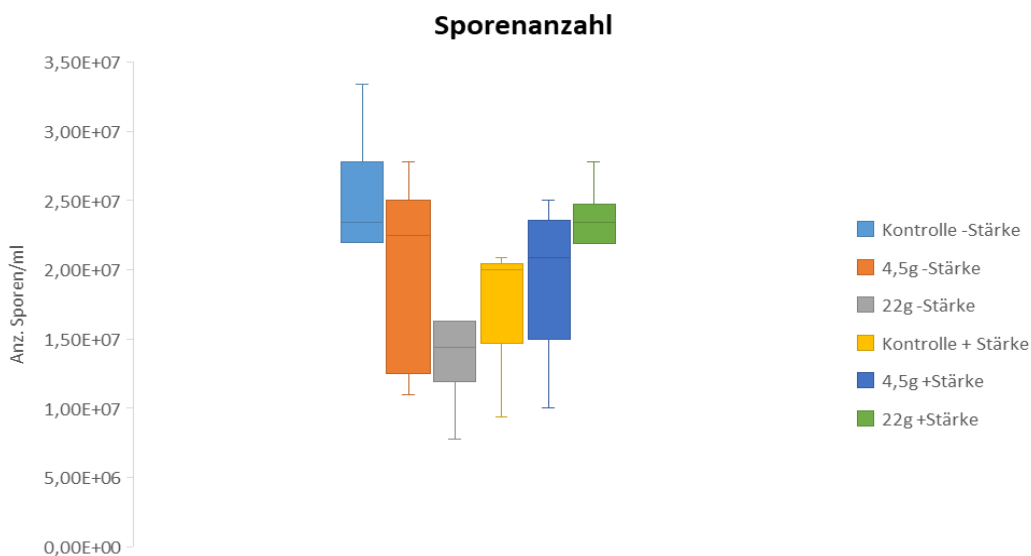


Abbildung 7: Myceldurchmesser (in cm) von verschiedenen gecoateten Geohumus Granulat.

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Formulierungen bezüglich der Sporenproduktion. Tendenziell produzierten die Formulierungen komplett ohne Stärke oder mit Stärke im Granulat und im Coating mehr Pilzsporen. Außerdem haben wir einen Auswuchsversuch auf Böden bei 15 °C und bei verschiedenen Feuchtegehalten durchgeführt (s. Abbildung 8).



Abbildung 8: Versuchsaufbau für den Auswuchsversuch im Boden.

Hierfür wurden 27 Kontrollen und gecoatete Geohumus Körnchen auf LUFA Sp 2.2 Boden ausgelegt und bedeckt. Der Boden wurde zu Beginn des Versuchs auf 15 % Feuchtigkeit eingestellt. Zur Schaffung von feuchten Bedingungen wurden die Proben jeden 5. Tag bewässert. Unter trockenen Bedingungen wurde eine Bewässerung nicht durchgeführt. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den neuen Formulierungen und der ungecoateten Kontrolle (s. Abbildung 9). Die Feuchtigkeit war jedoch wichtig, um ein besseres Wachstum zu induzieren, insbesondere in den ersten zwei Wochen.

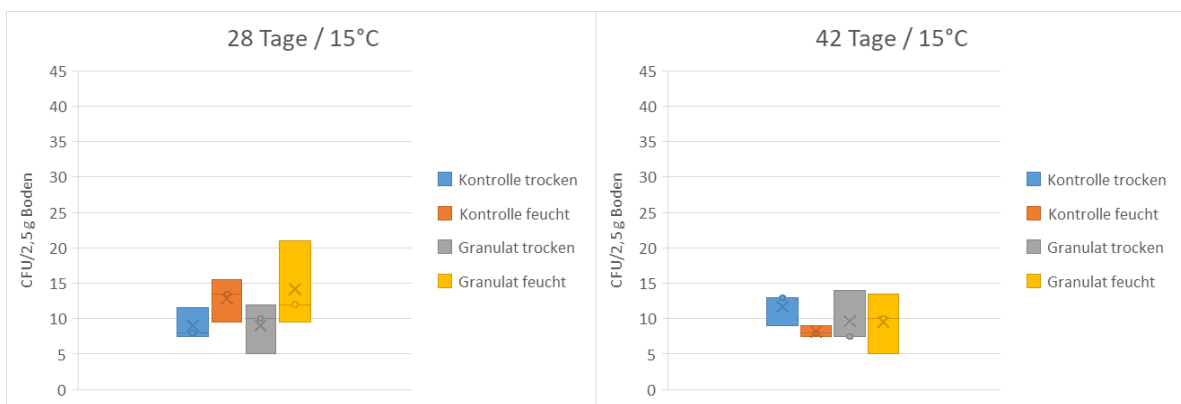


Abbildung 9: Sporenauswuchs in LUFA Sp 2.2-Boden aus dem Geohumus Granulat während der Inkubation mit und ohne konstante Feuchtigkeit bei 15 °C für 28 und 42 Tage.

Bei der Messung der CO₂-Produktion konnten keine vergleichbare CO₂-Produktion von Granulat im Vergleich zu ATTRACAP® feststellen. Bei uns produziert das Granulat im Durchschnitt 20-30 mal weniger CO₂ als ATTRACAP® über einen Zeitraum von 4 Tagen. Außerdem schien die CO₂-Produktion im Granulat mit der Zeit abzunehmen (außer beim Granulat mit 22% Stärke - hier konnten wir einen leichten Anstieg von Tag 1 bis Tag 4 feststellen).

AP6 Wirksamkeitstests

Trotz wiederholter Kontaktaufnahme zu anderen Unternehmen und Forschungseinrichtungen, konnten keine Dickmaulrüssler während des Forschungsvorhaben gefunden werden. Es wurde mehrfach zu verschiedenen Adressen gefahren, um Engerlinge zu sammeln.

Infektionsversuche von Engerlingen mit *I. fumosorosea* (Isaria 1616) und *B. tenella* (IF3)

Für den Infektionsversuch wurden 250 ml Becher mit 100 g Erde (Kulturerde aus der Heidelbeeranlage vom Partner WIN) befüllt. Die Feuchtigkeit der Erde wurde auf 10 % (w/w) eingestellt. Die Engerlinge (Mai + Junikäfer Larven) wurden mit 500 µL Formulierung ($3,1 \times 10^7$ Aerokonidiosporen in Tween 80 pro Engerling) mit Hilfe einer Pipette beträufelt und dann paarweise in die Becher gesetzt. Auf die Tiere der Kontrollgruppe wurden nur 500 µl Tween 80 appliziert. Während des Experimentes wurden die Tiere mit zerkleinerten Karotten gefüttert. Der Versuch wurde 90 Tage bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Vitalität der Versuchstiere wurde regelmäßig kontrolliert.

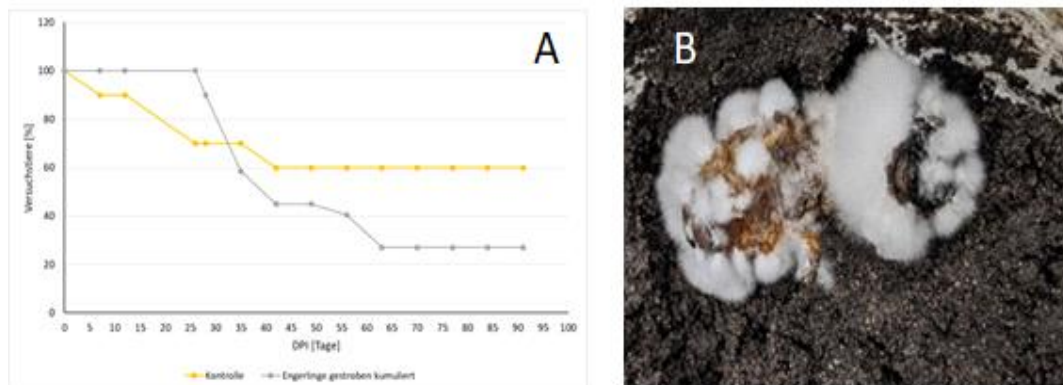


Abbildung 10: A Viabilität der Engerlinge nach Behandlung mit *Isaria 1616* (grau) im Vergleich zur Kontrolle mit Tween 80, ($3,125 \times 10^7$ Aerokonidiosporen in Tween 80; nach 91 Tagen in Heidelbeererde bei Raumtemperatur, $n=60$). B, Mit *Isaria 1616* infizierter Engerling auf Heidelbeererde.

Es wurde eine kumulierte Anzahl an verstorbenen Tieren angegeben, da die Infektion oft erst viel später zu sehen ist, oder die Tiere zwar aufgrund der Pilzinfektion verstarben, diese sich aber nicht vollständig ausprägt (s. Abbildung 10 A-B).

Im Vergleich zum Infektionsversuch mit dem Stamm *M. brunneum* Cb15-III wurde das Volumen pro Tier erhöht, um eine vergleichbare Sporendichte pro Engerling zu erreichen (Cb15-III $4,5 \times 10^7$ Sporen/Engerling, *Isaria* $3,125 \times 10^7$ Sporen/Engerling). Zusätzlich bestand das Problem, dass die Sporenbildung der *Isaria* und *Beauveria* Stämme im Vergleich zum Cb15-III auf der Agarplatte sehr lange dauerte (mehrere Wochen). Bisher wurden die verschiedenen Pilzstämme nur auf Mai- und Junikäfer Larven getestet, jedoch bestand bisher

keine Möglichkeit die Stämme gegen Dickmaulrüssler Larven zu testen. Es konnten keinerlei Versuchstiere gefunden werden, auch verschiedene Institutionen die angerfragt wurden, konnten leider keine Tiere zur Verfügung stellen, da die Dickmaulrüssler Larven nur in unregelmäßigen Abständen auftreten.

Für den Infektionsversuch mit Stamm *M. brunneum* Cb15-III wurden 250 ml Becher mit 100 g Erde (Kulturerde aus der Heidelbeeranlage vom Partner Winkelmann) befüllt. Die Feuchtigkeit der Erde wurde auf 7,7 % (w/w) eingestellt. Die Engerlinge wurden mit 250 µL Formulierung ($4,5 \times 10^7$ Aerokonidiosporen in Tween 80) mit Hilfe einer Pipette beträufelt und dann paarweise in die Becher gesetzt. Auf die Tiere der Kontrollgruppe wurden nur 250 µl Tween 80 appliziert. Während des Experimentes wurden die Tiere mit zerkleinerten Karotten gefüttert. Der Versuch wurde 70 Tage bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Vitalität der Versuchstiere wurde regelmäßig kontrolliert. Es wurde auf a) die Viabilität der Tiere generell; b) optische Anzeichen einer Pilzinfektion wie z.B. auswachsendes Pilzmyzel (6 a, b) bonitiert.

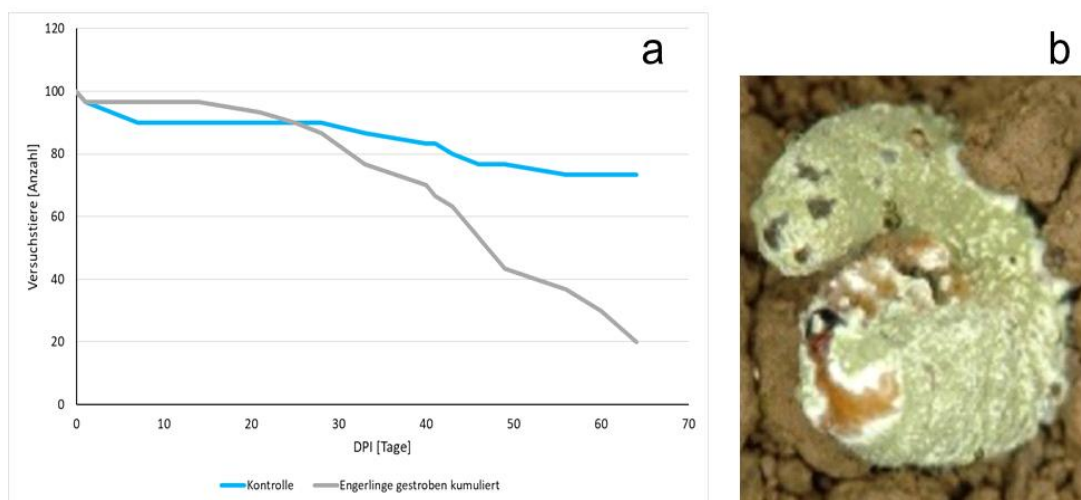


Abbildung 11: a Viabilität der Engerlinge nach Behandlung mit (blau) Kontrolle Tween 80, (grau) $4,5 \times 10^7$ Aerokonidiosporen in Tween 80; nach 70 Tagen in Heidelbeererde bei Raumtemperatur, $n=100$. b: mit *M. brunneum* Cb15-III befallener Engerling, in weiß ausgewachsenes Pilzmyzel, in grün neu gebildete Aerokonidien sichtbar.

Es wurde die kumulierte Anzahl an verstorbenen Tieren angegeben, da oft die Infektion erst viel später zu sehen ist oder die Tiere zwar durch den Pilz gestorben sind, diese aber nicht immer auswächst (s. Abbildung 11 a-b).

AP7 Praxisnahe Versuche

Die mit dem entomopathogenen Pilz *M. brunneum*, Stamm Cb15-III, entwickelten Attract-and-Kill-Formulierungen wurden im Gewächshaus und auf dem Feld im Rahmen von

Praxisversuchen in Kooperation mit WIN Partner 2022-2023 in Nordrhein-Westfalen, Niedersachsen getestet.

2022 wurde das Granulat manuell an den Einsatzort zwischen die Wurzeln ausgebracht (s. Abbildung 12). Am 26.07.2022 wurde auf einem 1,73 ha großen Heidelbeerfeld in NRW mit 42 Reihen ein Versuch zur Anwendbarkeit gestartet. Dazu wurde das Feld in drei Bereiche entlang dem Reihenverlauf aufgeteilt, wobei die Negativkontrolle zwischen den beiden Anwendungsbereichen lag. In den Reihen 1 bis 10 wurde Exigon entsprechend der Anwendungsbeschreibung mittels Tropfschlauch ausgebracht, Reihe 11 bis 20 dienten als Negativkontrolle ohne Behandlung und in Reihe 21 bis 30 wurde formulierter *M. brunneum* manuell ausgebracht. Das Feld wies zum Zeitpunkt der Ausbringung einen moderaten Befall mit Engerlingen auf, die den Pflanzenwurzeln teils schwere Schäden zugefügt haben. Im Verlauf des Versuchs hat sich die Situation soweit verschlimmert, dass von den Betriebsverantwortlichen ein kompletter Umbruch des Feldes und eine Neubepflanzung in Erwägung gezogen wurde, da die Ertragserwartung zu gering war (s. Abbildung 12 A-D). Die Aufwandmengen für Exigon betragen 3 kg/ha bei 300 bis 500 l Wasser / ha. Die Ausbringung erfolgte durch die bereits vorhanden Bewässerungsinfrastruktur, wobei das fertige Gemisch mittels Absperrhähne nur in die gewünschten Reihen appliziert wurde und anschließend mit der gleichen Menge Wasser nachgespült wurde, um eine nachträgliche Beimischung der anderen Reihen während der regulären Bewässerung zu verhindern. Die Ausbringung von *M. brunneum* Formulierung erforderte vier Personen im Feld, 20 Stunden auf 0,33 ha, wobei pro Pflanze drei Löcher mit einer Lanze wurzelnah gestochen wurde. Die entsprechende Menge des Granulats wurde appliziert und das Loch wieder verschlossen (s. Abbildung 13 A-B). Das Feld wurde anschließend den witterungsbedingten Anforderungen entsprechend bewässert und zum entsprechenden Zeitpunkt in die Ernte gebracht. Es erfolgten Drohnenaufnahmen zum Zeitpunkt der Ausbringung und zu einem späteren Zeitpunkt, um eventuelle Veränderungen über die Fläche dokumentieren zu können. Außerdem wurden zum Zeitpunkt der Ausbringung ein Datenlogger in den Boden eingebracht, der nach 3 Monaten wieder entfernt und an Biocare zur Auswertung zurückgesendet wurde. Die Ernte auf dem Feld erfolgte im Zeitraum 27.06.2022 bis 21.08.2022 und erbrachte verglichen mit der Vorjahresternte ca. 2,4 weniger Ernte. Am 14.09.2022 wurden aus allen Versuchsbereichen je 500 g Bodenproben entnommen und in die Labore der FH Bielefeld und zu Biocare zur weiteren Analyse versandt. Zu dem Zeitpunkt wurde zusätzlich in allen Bereichen Probegrabungen nach Engerlingen durchgeführt. Es konnte im Exigonbereich ein Exemplar gefunden werden, in den anderen Bereichen war der Befund negativ. Allerdings waren die Probegrabungen stichprobenartig und aufgrund der warmen Temperaturen über einen langen Zeitraum nicht aussagekräftig.

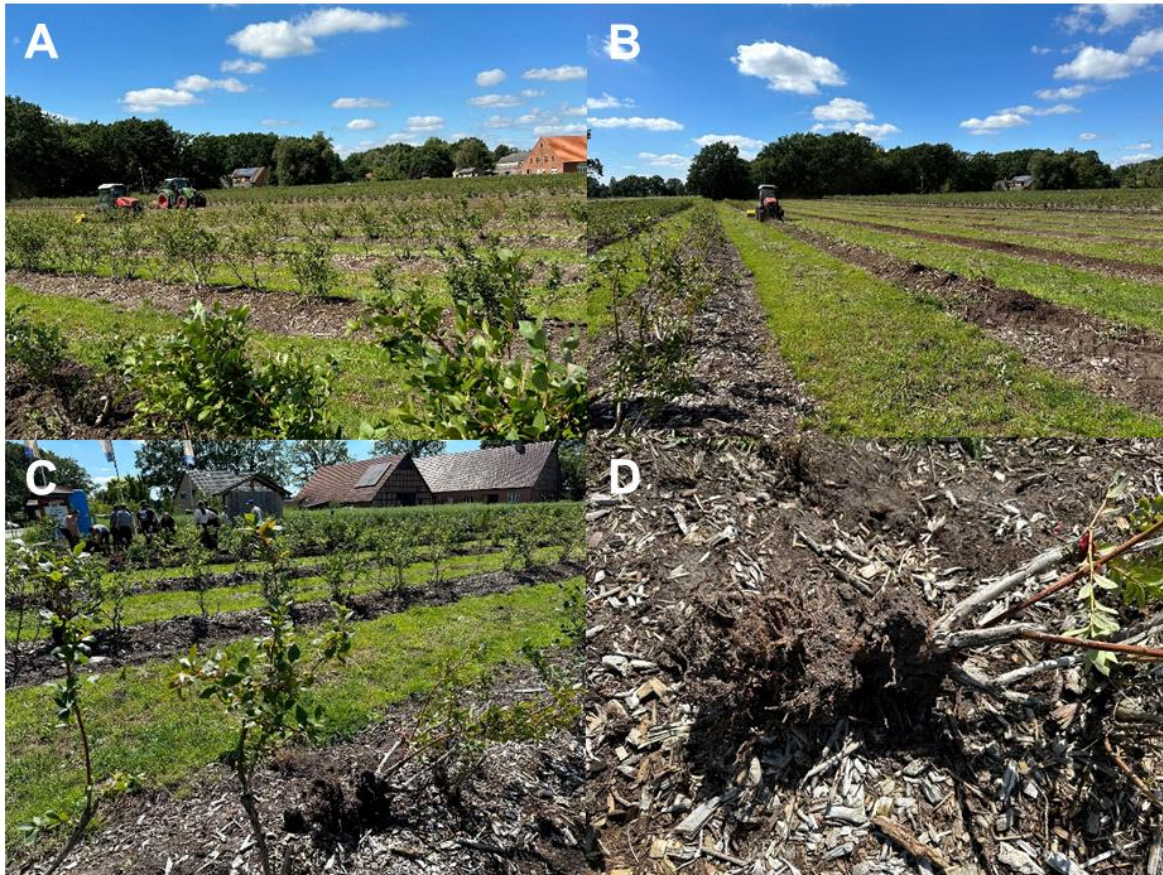


Abbildung 12: A-D Pflanzenrettungsmaßnahmen auf dem Heidelbeerfeld im Freiland.



Abbildung 13: A Unterwurzelbereich für die Anwendung. B Applikation der *M. brunneum* Formulierungen im Freiland.

Die Inkubation der Engerlinge mit den Formulierungen (AP5) im Gewächshaus diente für die Schaffung und Simulierung der praxisnahen Bedingungen und Erzielung eines

Wirksamkeitsnachweises. Der Opferversuch in einem 20-Liter-Pflanztopf (Maße 32 x 27 cm und damit eine Grundfläche von 804 cm²) wurde 2023 mit mindestens 5 Wiederholungen in einem Versuchstunnel durchgeführt. Dazu wurden am Tag des Versuchsansatzes Engerlinge frisch aus einer Rasenfläche, ihrem natürlichen Habitat, entnommen und nach kurzer Bestimmungsphase wieder in Erde überführt, um Tod als Stressartefakt möglichst zu minimieren. Auch wurde die Hitzeperiode des Sommers abgewartet und der Versuch erst am 12.09.2023 bei moderaten Außentemperaturen von 22°C gestartet. Es wurde mit zwei Parallelen je Ansatz gearbeitet. Vom Projektpartner BIOCARE wurden 300 g gecoatetes Granulat (22% Stärke) gekühlt zur Verfügung gestellt. Der Wurzelraum nahm ca. 1/3 des neuen Pflanztopfes ein und wurde mit 5 Engerlingen pro Topf gefüllt. Das gecoatete Geohumus-Granulat (mit 22% Stärke) wurde als bester Testkandidat, anhand der Auswuchsrates, ausgewählt und mit dem Pflanzsubstrat in den Topf eingemischt. Es wurde eine optimale Ausbringungsmenge von mindestens 50 g des Granulats pro Topf empfohlen und getestet, um eine *M. brunneum* Cb15-III Sporenkonzentration von $3,6 \times 10^8$ im Topf zu erreichen, die mit der ATTRACAP-Anwendung äquivalent ist.

Es erfolgten vier Ansätze mit je zwei Parallelen. Im ersten Ansatz wurden 100 g Granulat mit betriebseigener Standardkulturerde gemischt, 5 Engerlinge der Stadien L1, L2 und L3 eingebracht und eine Heidelbeerjungpflanze vorsichtig eingepflanzt. Im zweiten Ansatz wurden 50 g Granulat mit Erde, 5 Engerlingen und einer Heidelbeerpflanze zusammengeführt. Der dritte Ansatz diente als Negativkontrolle, in der nur 5 Engerlinge zur Heidelbeere gegeben wurden. Der letzte Ansatz als Nullprobe sollte sicherstellen, dass die Pflanze an sich überlebensfähig war und unter den gegebenen Bedingungen Wassermangel, oder Krankheiten die Pflanzengesundheit im Versuchszeitraum hätten beeinflussen können.

Eine Ernte der Heidelbeeren zeigte keine signifikanten Unterschiede in Fruchtanzahl oder Geschmack. Keine der Pflanzen zeigte Stresssymptome durch Blattabwurf oder verfrühte oder ungewöhnliche Verfärbung.

Am 22.11.2023 konnten im Topf mit dem höchsten Anteil an Versuchsmaterial in beiden Parallelen lebende, unversehrte Engerlinge gefunden werden. Das Granulat hatte sich im Volumen durch das Gießwasser erweitert, aber anscheinend ist es trotz direktem Kontakt zu keiner Infektion mit dem Pilz gekommen. Da die höchste Konzentration keine Wirkung gezeigt hat, und die Engerlinge sogar noch die Wurzelmasse der Heidelbeeren um mindestens 50% verringert haben, wurde der Versuch um 4 Wochen verlängert, da ab dem Zeitpunkt die Frostfreiheit der Töpfe auch im Gewächshaus nicht garantiert werden konnte. Am 12.12.2023 wurden alle Versuchstöpfe ausgewertet. Die Ansätze in Varianten 2 und 3 wurden am 22.11.2023 nicht weiter untersucht, um die Engerlinge nicht mechanisch zu schädigen und so das Ergebnis zu beeinflussen.

Die Auswertung des Versuchs zeigte nicht den gewünschten Effekt. Eine Pilzinfektion der Engerlinge konnte nicht nachgewiesen werden. Vermutlich war das Stadium der Engerlinge mit größtenteils L2 und L3 bereits zu fortgeschritten für eine erfolgreiche Infektion. Je Versuchsansatz wurden 5 Engerlinge verwendet (in Summe 30), von denen nach Abschluß des Experiments noch 18 Engerlinge wiedergefunden werden konnten. Diese Tiere entsprachen alle dem Larvenstadium L3. Dabei lag die höchste Wiederfindungsrate bei den Versuchen mit dem gecoateten Material (je 70%), während die Negativkontrolle nur 40 % Überlebensrate aufwies. Zusätzlich kam es zu einem Eintrag von zwei Erdeulenraupen und einer Tipulalarve. Die Wurzelballen der ersten beiden Versuchsansätze mit Granulat zeigten zudem eine bis zu 50% Massenreduktion, vermutlich durch Fraß.

Gründe für das Ergebnis dieses Versuches könnten der Versuchsansatz sein, in dem die Engerlinge in einem zu weit fortgeschrittenen Stadium zu früh mit dem gecoateten Material in Berührung gekommen sind. Somit war noch kein Übertrag der Pilzsporen auf den Zielorganismus möglich und die Tiere haben sich in der folgenden Richtung der Pflanzenwurzeln orientiert, in denen sich kein Pilzmaterial mehr befand.

Für Feldversuche wurde daher die Möglichkeit besprochen, wie eine Barriere das Granulat oder ein anderes mit Pilzsporen versehenes Material zwischen Pflanzreihe und Zwischenreihenbegrünung zu bringen, in dem am Rand des Pflanzwalls eine Schlitzung des Bodens mit einer Maschine erfolgt, sowie eine automatische Dosierung und Verschließung der Furche. So müssten die Schadtiere, für die eine Wanderbewegung zwischen Kulturpflanze und Grünstreifen beobachtet wurde, das Pilzmaterial bei dieser Bewegung berühren und eine Infektion könnte erfolgen. Dieser Versuch wird für einen späteren Zeitpunkt angestrebt, wenn das abschließende Produkt zur Verfügung steht.

Der ursprüngliche Gantt-Plan sah eine klare Staffelung der Arbeitspakete mit mehreren Meilensteinen vor. Aufgrund von Verzögerungen (v. a. durch Personalwechsel und pandemiebedingte Engpässe) wurde die Projektlaufzeit um sechs Monate verlängert. Die wichtigsten Auswirkungen: Der Abschluss der Screening- und Formulierungsphase (AP1–AP5) verschob sich von Ende 2022 auf bis einschließlich 2024. Die praxisnahen Versuche (AP7), ursprünglich für 2023 geplant, wurden im erweiterten Projektzeitraum 2024 abgeschlossen. Die Meilensteine M4 (Auswahl der finalen Formulierungen) und M5 (Nachweis der Wirksamkeit im Freiland) wurden, zeitlich angepasst, nur teilweise erreicht.

- b. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises,

Die mit Abstand größte Position war 0837 – Personalkosten.

- c. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeit,

Die im Projekt durchgeführten Arbeiten waren notwendig und angemessen, um die angestrebten Ziele zur Förderung des biologischen Pflanzenschutzes zu erreichen. Angesichts der wachsenden Bedeutung nicht-chemischer Pflanzenschutzstrategien im Rahmen der Farm-to-Fork-Strategie der EU und der nationalen Ziele zur Reduzierung chemisch-synthetischer Pflanzenschutzmittel bestand ein dringender Bedarf, effektive und praktikable Alternativen zu entwickeln und zu bewerten. Die Auswahl der Arbeitspakete erfolgte auf Basis einer fundierten Problem- und Bedarfsanalyse in enger Zusammenarbeit mit Praxispartnern und wissenschaftlichen Einrichtungen. Die methodische Vorgehensweise – einschließlich der Skalierung von Laborversuchen über Gewächshausversuchen zu Feldversuchen und durchgeführten Wirksamkeitstests – entsprach dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik und war geeignet, belastbare Aussagen zur Wirksamkeit, Praxistauglichkeit und Wirtschaftlichkeit der untersuchten biologischen Verfahren bzw. Mittel zu ermöglichen. Die Ressourcennutzung im Projekt – personell, zeitlich und finanziell – war effizient und zielgerichtet. Die im Förderzeitraum erbrachten Leistungen stehen in einem angemessenen Verhältnis zu den erzielten Ergebnissen und den formulierten Zielsetzungen des Vorhabens.

- d. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses – auch konkrete Planungen für die nähere Zukunft – im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans,

Die im Projekt erzielten Ergebnisse leisten einen relevanten Beitrag zur Weiterentwicklung des biologischen Pflanzenschutzes im landwirtschaftlichen Praxisbetrieb. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass Insektenviren wie LJV durch die im Labormaßstab getesteten Eigenschaften geeignet sind, eine Reduktion des Befalldrucks zu ermöglichen.

In Zusammenarbeit mit den Projektpartnern der THM wurde die Formulierung auf der Grundlage einer hochskalierten Produktion der LJV-Viren weiterentwickelt. Die entwickelte Technologie kann als Grundlage für die weitere Optimierung und Validierung des Prozesses zur Herstellung anderer vielversprechender RNA-Insektenviren dienen. Die kontinuierliche, ertragreiche Produktion der innovativen und effizienten Formulierung verspricht, die entsprechenden Schäden durch *Drosophila suzukii* in Heidelbeerkulturen auf ein wirtschaftlich vertretbares Maß zu reduzieren.

Darüber hinaus zeigten unsere Ergebnisse, dass das Pilzisolat *Metarhizium brunneum* Cb15-III sowie weitere Isolate der Pilze *Beauveria* sp., *M. brunneum* und *Isaria fumosorosea* eine hohe Virulenz als Kill-Komponenten-Formulierung zur Bekämpfung großer Bodenschädlinge aufweisen. In Zusammenarbeit mit GEO-Forschungspartnern wurde das Fermentationsverfahren für den Pilz etabliert sowie die praktische Herstellung des innovativen

Produkts mittels Coating. Für die entwickelte Formulierung wurde ein Qualitätsmanagement durchgeführt, und die definierten Bodenparameter für eine bessere Wirksamkeit ermöglichen die Weiterentwicklung des Produkts mit Verbesserung der Beschichtungsformulierung und des Potenzials der CO₂-Anlockung für *D. suzukii* und Bodenbohrer.

Die Arbeiten mit *M. brunneum* zeigen exemplarisch, dass die Entwicklung biologischer Pflanzenschutzmittel hohe Anforderungen an eine präzise Formulierungstechnologie stellt. Auch wenn die getesteten Kapseln in der Praxis nicht den erwarteten Bekämpfungserfolg gegen große, robuste Larvenstadien wie die des Dickmaulrüsslers erzielen konnten, liefern die Ergebnisse wertvolle Erkenntnisse zu Limitierungen der Sporulation und zu physiologischen Grenzen bei der Herstellung wirksamer Formulierungen.

Aus den Ergebnissen lassen sich klare Empfehlungen ableiten: Für die Praxis empfiehlt sich, die LJV-Formulierung in Pilotversuchen unter Freilandbedingungen in Beerenobstbetrieben zu testen, um Effekte auf Populationsdynamik und Fruchtqualität langfristig zu belegen. Gleichzeitig sollten *M. brunneum*-Formulierungen gezielt weiterentwickelt und vor allem in frühen Larvenstadien appliziert werden. Für die Forschung ist eine vertiefte Untersuchung der populationsökologischen Effekte sowie der Formulierungstechnologien notwendig, um technologische Hemmnisse zu überwinden. Die Politik sollte die Entwicklung biologischer Wirkprinzipien, insbesondere nicht-gentechnischer Verfahren wie virus- oder RNAi-basierter Sprays, durch gezielte Förderung und den Abbau regulatorischer Hürden aktiv unterstützen. Darüber hinaus sollten Beratungsangebote und finanzielle Anreize geschaffen werden, die den Einsatz innovativer biologischer Verfahren in der landwirtschaftlichen Praxis erleichtern. Insgesamt verdeutlichen die vorliegenden Arbeiten, dass biologischer Pflanzenschutz ein dynamisches Entwicklungsfeld ist, in dem neue Wirkprinzipien und innovative Technologien Hand in Hand gehen müssen, um nachhaltige, zukunftsfähige Lösungen zu realisieren.

Langfristig trägt das Projekt zur Umsetzung nationaler und europäischer Nachhaltigkeitsstrategien bei, insbesondere im Hinblick auf die Reduktion chemischer Pflanzenschutzmittel, die Förderung der Biodiversität sowie die Stärkung innovativer und resilienterer Anbausysteme.

- e. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen,

In den letzten Jahren hat sich die Forschung zur biologischen Kontrolle von *D. suzukii* intensiviert. Neben der bereits bekannten Wirksamkeit entomopathogener Pilze wie *Beauveria bassiana* und *Metarhizium brunneum* im Labor (z. B. in Form von beimpften Beeren oder verkapselten Formulierungen), werden zunehmend neue biologische Bekämpfungsstrategien

untersucht. Eine der vielversprechendsten Entwicklungen ist der gezielte Einsatz natürlicher Gegenspieler wie Parasitoiden. Besonders hervorzuheben ist *Ganaspis cf. brasiliensis*, ein parasitoider Hymenopter aus Asien, der sich durch seine hohe Wirtsspezifität gegenüber *D. suzukii* auszeichnet. Im Gegensatz zu vielen einheimischen Parasitoiden, die auch andere Drosophiliden befallen, parasitiert *G. cf. brasiliensis* nahezu ausschließlich *D. suzukii*-Larven in frischem Fruchtgewebe. Aufgrund dieser Spezifität wurde die Art bereits in der Schweiz, Frankreich, Italien und den USA im Rahmen kontrollierter biologischer Freisetzungsprogramme eingeführt. Auch *Trichopria anastrephae* zeigt Potenzial, insbesondere im Puppenstadium der Fliege. Beide Arten bieten ein hohes Maß an Biosicherheit und könnten mittelfristig eine dauerhafte Etablierung in betroffenen Regionen ermöglichen.

Parallel dazu wurde die Sterile Insektentechnik (SIT) zur gezielten Populationskontrolle von *D. suzukii* weiterentwickelt. Anders als bei früheren Ansätzen, bei denen genetisch modifizierte Organismen (GVO) zum Einsatz kamen, ermöglicht der Einsatz von Röntgenstrahlung zur Sterilisation männlicher Fliegen eine effektive Methode ohne Eingriffe ins Genom. Diese Technik erfüllt daher regulatorische Anforderungen in der EU und anderen Regionen. Erste Freisetzungsversuche in geschlossenen Produktionssystemen zeigen vielversprechende Ergebnisse, insbesondere in Kombination mit Lockstofffallen.

Ein weiterer innovativer Ansatz nutzt organische Reststoffe: Aus Orangenschalen gewonnene, fermentierte Extrakte – das sogenannte „Salty Orange Peel Product (OPP)“ – haben sich in Labor- und Gewächshausversuchen als hochattraktiv für *D. suzukii* erwiesen. Sie übertrafen in Lockwirkung teilweise kommerzielle Produkte. Gleichzeitig konnte eine signifikante Reduktion der Eiablage und Larvenanzahl in behandelten Früchten erzielt werden. Dieser biobasierte und umweltfreundliche Wirkstoff zeigt das Potenzial, sowohl als Lockstoff als auch direkt insektizid zu wirken – ein doppelter Vorteil in der biologischen Schädlingskontrolle.

- f. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 5 der NKBF 2017.

1) Linscheid, Y.; Kessel, T.; Vilcinskas, A.; Lee, K.-Z. Pathogenicity of La Jolla Virus in *Drosophila suzukii* following Oral Administration. *Viruses* **2022**, *14*, 2158. <https://doi.org/10.3390/v1410215>

2) Abdelhafiz, I.; Kessel, T.; Vilcinskas, A.; Lee, K.-Z. La Jolla Virus: The Pathology and Transmission in Its Host *Drosophila suzukii*. *Viruses* **2025**, *17*, 408. <https://doi.org/10.3390/v17030408>

3) in Vorbereitung: Leppin, M.; Sölmann, S.; Gröb, T.; Richter, T.; Linscheid, Y.; Wortmann, M.; Keil, W.; Wolff, M.; Patel, A.V.; Lee, K.-Z. Insect virus formulations for plant protection against the spotted wing *Drosophila suzukii*.

4) in Vorbereitung: Linscheid, Y.; Billion, A.; Hurka, S.; Lüddeke, T.; Vilcinskas, A.; Lee, K.-Z. Deciphering the molecular mechanism of La Jolla Virus in *Drosophila suzukii* by transcriptomic analysis.