
Sektion 10

Biologischer Pflanzenschutz II

10-1 - Endophytic entomopathogenic *Metarhizium brunneum* F52 for biological crop protection: a bioengineering approach

Desiree Jakobs-Schönwandt, Vivien Krell, Anant Patel

University of Applied Sciences Bielefeld, Faculty of Engineering Sciences and Mathematics, Interaktion 1, 33619 Bielefeld, Germany, anant.patel@fh-bielefeld.de

Biocontrol of insect pests with endophytic entomopathogenic fungi like *M. brunneum* F52 is challenging because of the low efficacy and limited shelf life of the usually insufficiently formulated "active ingredients".

A solution for these problems could be a bioengineering approach to combine fine-tuned mass-production processes with optimized formulation processes to obtain novel formulations that deliver beneficial microorganisms to plants and protect them from insect herbivores.

To investigate the impact of formulation on hyphae fragments, fungal biomass was selectively produced in shake flasks and 2L bioreactors in a medium based on agricultural residues and osmotic stress inducers.

To develop a bead formulation, sodium alginate, corn starch and biomass were combined. Drying and storage tests were conducted and beads were applied to tomato plant roots to investigate plant colonization using light microscopy and qPCR.

By using a bead formulation with sodium alginate and corn starch, viability after drying was increased from 0.7 ± 0.3 % for unformulated hyphae fragments to 52.2 ± 37.4 % for encapsulated fragments. Formulated dried hyphae fragments were stored for 4 month at 5 °C and 25 °C and maintained viability with 74.7 ± 6.6 % and 75.5 ± 10.5 %, respectively. Plant colonization with encapsulated hyphae fragments was verified via light microscopy. When dry beads were applied to tomato plant roots, the number of hyphae was increased 7.6 fold. With moist beads, colonization was enhanced 23.4 fold compared to control plants. These results will be flanked by qPCR data.

10-2 - Entwicklung von Verkapselungsmethoden für Pflanzenextrakte im Projekt DevelOPAR

Development of encapsulation techniques for plant extracts in the project DevelOPAR

Anant Patel¹, Stefanie Lange¹, Marina Vemmer¹, Joanna Dürger^{2,3}, Alexandra Esther², Michael Diehm⁴, Karl Neuberger⁴, Ralf Tilcher⁵

¹Bielefeld University of Applied Sciences, Faculty of Engineering Sciences and Mathematics, WG Fermentation and Formulation of Biologicals and Chemicals, Interaktion 1, 33619 Bielefeld, anant.patel@fh-bielefeld.de

²Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst – Wirbeltierforschung

³Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Landschaftsökologie

⁴PhytoPlan Diehm & Neuberger GmbH, Heidelberg

⁵KWS SAAT SE, Einbeck

Die ökologische Landwirtschaft ist auf alternative Wirkstoffe, wie z. B. Pflanzenextrakte für den Pflanzenschutz angewiesen. Die schnelle Abbaubarkeit und die Lichtempfindlichkeit von Pflanzenextrakten haben im Vergleich zu manchen chemischen Pflanzenschutzmitteln zwar weniger Rückstände in den Lebensmitteln und in der Umwelt zur Folge, allerdings entstehen durch diese Eigenschaften auch neue Herausforderungen. Um das Potential von Pflanzenextrakten in eine praktische Nutzung zu überführen ist die Entwicklung von geeigneten Formulierungen unerlässlich. Als Formulierungsansatz bieten sich zahlreiche Verkapselungsmaterialien,

-methoden und -technologien an, wodurch sich auch gezielt die Freisetzung der Wirkstoffe und die Anzahl der Behandlungen beeinflussen lassen.

Am Beispiel des Projektes DevelOPAR wird die Entwicklung einer Verkapselungsmethode für Pflanzenextrakte vorgestellt. Vogelfraß durch Fasane, Tauben und Krähen führt jährlich zu hohen Verlusten an nicht mit chemischen Beizen geschützten Samen und Keimlingen. Als vielversprechende Möglichkeit, Vogelfraß zu vermeiden, wurden in den letzten Jahren Pflanzenextrakte identifiziert, die eine starke repellente Wirkung zeigten. Diese Pflanzenextrakte wurden mittels verschiedener Methoden verkapselt und in kommerzielles Saatgut eingearbeitet. Anschließend wurde deren Freisetzung und Wirksamkeit untersucht.

10-3 - Entwicklung von Bodengranulaten flüssigfermentierter Biomasse der insektenpathogenen Pilze *Metarhizium brunneum*, *Isaria fumosorosea* und *Beauveria bassiana* zur Kontrolle bodenbürtiger Schadinsekten

*Development of granules of liquid fermented biomass of the entomopathogenic fungi *Metarhizium brunneum*, *Isaria fumosorosea* and *Beauveria bassiana* for control of soilborne pest insects*

Dietrich Stephan¹, Medea Buranjadze², Tanja Bernhardt¹, Juliana Pelz¹, Nicolas Maguire¹, Christopher Seib¹, Johannes Schäfer¹

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstrasse 243, 64287 Darmstadt, dietrich.stephan@julius-kuehn.de

²Agricultural University of Georgia, University Campus at Digomi, Tbilisi, Georgia.

Bodengranulate, die zur Bekämpfung von im Boden vorkommenden Schadinsekten mit Hilfe insektenpathogener Pilze eingesetzt werden, bestehen in der Regel aus im Feststofffermenter produzierten Pilzen bzw. Pilzsubstraten. Gängige Verfahren zur Feststofffermentation zeichnen sich im Vergleich zur Flüssigfermentation durch eine lange Fermentationsdauer aus. Eine schwierige Übertragung vom technischen in den industriellen

Maßstab sowie begrenzte Möglichkeiten der Prozesssteuerung bzw. -optimierung erschweren ein Scale up. Aufgrund der Produktbeschaffenheit ist eine Ausbringung dieser Bodengranulate mit Düngerstreuern teils sehr schwierig.

Daher wurde in dieser Studie untersucht, ob es möglich ist, aus im Flüssigfermenter produzierter Biomasse (Mycel und Submerssporen) der drei Pilzstämme *Metarhizium brunneum* Stamm JKI-BI-1339 (= Ma43 = F52 = BIPESCO5), *Isaria fumosorosea* Stamm JKI-BI-1496 und *Beauveria bassiana* Stamm Bb 007 Granulate herzustellen. Diese sollen mit herkömmlichen Düngerstreuern ausgebracht werden können. Hierfür wurde die Biomasse im Wirbelschichttrockner weiter verarbeitet, in dem diese im Coatingverfahren auf autoklavierte Hirse aufgetragen wurde. Anschließend wurde der Bewuchs, die Sporulation des Pilzes auf den Granulaten sowie im Boden unter verschiedenen Bodenfeuchten untersucht. In ersten Modellbiotests wurde die Wirksamkeit gegen Larven des Mehlkäfers (*Tenebrio molitor*) geprüft.

Die Ergebnisse veranschaulichen, dass sich die drei Pilzstämme hinsichtlich ihrer Formulierbarkeit unterscheiden: So konnte im Coatingverfahren bei 50 °C für JKI-BI-1496 und Bb 007 bei einer Konzentration von 0,003 % Trockenbiomasse über 95 % Auswuchsrate beobachtet werden. Hingegen konnte für JKI-BI-1339 selbst bei Verwendung einer Biomassekonzentration von 0,7 % nur eine Auswuchsrate von maximal 50 % erzielt werden. Wurden für diesen Stamm die Granulate zusätzlich mit einem Nährstofffilm versehen, so konnte die Auswuchsrate auf 95 % erhöht werden. Des Weiteren zeigte sich, dass die Sporulation der Pilze auf den Granulaten stark von der Bodenfeuchte abhing. Für den Stamm JKI-BI1496 lag die optimale Bodenfeuchte bei 40 % und für Bb 007 bei mindestens 45 %. In Biotests mit JKI-BI-1339 konnte eine Infektion der *Tenebrio molitor* Larven erreicht werden. Eine Verwendung dieses Produktions- und Formulierungsverfahrens zur Bekämpfung anderer Bodenschädlinge, wie z.B. von Drahtwürmern (*Agriotes* spp.) wird diskutiert.

10-4 - Hochdurchsatzkultivierung von Pflanzenzellkulturen zur Produktion von Bioinsektiziden

High-throughput cultivation of plant cell cultures for the production of bioinsecticides

Peter Spieth, Rieke Lohse, Anant Patel

Bielefeld University of Applied Sciences, Faculty of Engineering Sciences and Mathematics, WG Fermentation and Formulation of Biologicals and Chemicals, peter.spieth@fh-bielefeld.de

Das große Potential von Pflanzenzellkulturen zur Produktion von agrarwirtschaftlichen oder pharmazeutischen Wirkstoffen ist weithin bekannt. Dabei ist der Erhalt der *in vitro* Produktion sowie die Steigerung der Metabolitproduktion die größte Herausforderung bei der Entwicklung eines rentablen Prozesses. In Anbetracht der Problematik ist eine zelllinienspezifische Optimierung der Kultivierungsbedingungen der Schlüssel zum Erfolg. Die Verwendung eines neuartigen vollautomatischen Mikrobioreaktorsystems ermöglicht die online Regelung von pH, pO₂ und Temperatur sowie die Kontrolle der Biomasseproduktion und Produktbildung in bis zu 48 parallelen batch- und 32 fedbatch-Fermentationen im Mikrolitermassstab. Durch die Vorteile des Systems können innerhalb kürzester Zeit theoretische Erwartungen überprüft und somit optimierte Kulturbedingungen für einzelne Zelllinien ermittelt werden.

Im Rahmen eines BMBF-geförderten Forschungsprojektes wird das beschriebene Verfahren angewendet, um die Ausbeute des Bioinsektizids Azadirachtin-A aus 30 neuartigen Pflanzenzellkulturen von *Azadirachta indica* zu verbessern. Die im Mikrolitermassstab

gewonnenen Erkenntnisse über Nährstoffverwertung, Biomasseproduktion und Azadirachtin-A Gehalt sollen anschließend in ein 2 Liter Rührkesselsystem transferiert werden.

Wir werden berichten, welche Vorteile das vollautomatische Mikrobioreaktorsystem gegenüber gewöhnlichen Pflanzenzellsubmerskulturen bietet und zugleich erste Ergebnisse der Kultivierung und Produktivität von Zelllinien aus *Azadirachta indica* präsentieren.

10-5 - Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Etablierung insektenpathogener Pilze in Kulturpflanzen

Light microscopic studies on the establishment of insect pathogenic fungi in crop plants

Eckhard Koch, Cornelia I. Ullrich, Petra Zink, Regina G. Kleespies

Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstr. 243, 64287 Darmstadt, eckhard.koch@julius-kuehn.de

Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass *Beauveria bassiana* und andere entomopathogene Pilze in Pflanzen als Endopyhten auftreten können. Eine Nutzung dieses Prinzips im Pflanzenschutz dürfte nur dann möglich sein, wenn eine nennenswerte Etablierung im Pflanzengewebe erfolgt. In Versuchen wird die Besiedlung derzeit meist indirekt überprüft, d.h. durch Re-Isolierung aus zuvor inokuliertem Material oder durch DNA-basierten Nachweis.

Um zu untersuchen, ob sich potentielle Endophyten auch lichtmikroskopisch nachweisen lassen, wurden Blätter von Raps, Faba-Bohnen, Gurken und *Phaseolus*-Bohnen mit *Beauveria bassiana* und anderen entomopathogenen Pilzen durch Besprühen, Infiltrieren oder punktförmiges Aufsetzen der Konidien suspension auf eine Wunde inokuliert. Zu verschiedenen Zeiten nach der Inokulation wurden Blattstücke entnommen und auf Agarmedien ausgelegt. Weiterhin wurden Blattstücke oder -schnitte mit verschiedenen Verfahren angefärbt (Trypan-Blau-Lactophenol, Fluoreszenzmikroskopie mit Blankophor, Solophenyl-Flavin 7GFE oder Fluoresceinisothiocyanat-markierten Antikörpern). Mit allen genannten Verfahren ließen sich Pilzstrukturen auf oder im Blatt sichtbar machen. Im Blattgewebe von Faba-Bohnen, Gurken und *Phaseolus*-Bohnen, nicht aber von Raps, waren im Bereich der Infiltrationsstellen interzellulär wachsende Pilzhyphen bis zu 36 dpi sichtbar. Ein nennenswertes Hyphenwachstum in das nicht-inokulierte Gewebe hinein erfolgte aber nicht. Im Falle von Raps deutete eine positive Reaktion nach Behandlung mit Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) sogar auf die pflanzliche Abwehr des Pilzes durch die Bildung von Wasserstoffperoxid. Nach Auslegen von Blattmaterial auf Agarnährmedien wuchsen die Pilze nur im Bereich der Inokulationsstellen aus. Nach Inokulation durch Infiltration waren noch nach 10 Tagen im Gewebe ungekeimte Konidien sichtbar. Nur wenige Tage nach Auslegen solcher Blattstücke auf Agarmedien hatte sich im Blattgewebe ein dichtes Geflecht aus interzellulär wachsenden Hyphen gebildet.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die untersuchten entomopathogenen Pilze im Blatt lokal begrenzt überdauern können, aber eine systemische Ausbreitung in gesundem Gewebe nicht erfolgt.

10-6 - Identifizierung neuer Isolate des *Phthorimaea operculella Granulovirus* (PhopGV) zur kombinierten Bekämpfung von *Phthorimaea*, *Tuta* und *Tecia*

Identification of novel isolates of Phthorimaea operculella Granulovirus (PhopGV) for a combined control of Phthorimaea, Tuta and Tecia

Andreas Larem, Eva Fritsch, Karin Undorf-Spahn, Johannes Jehle A.

Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstrasse 243, 64287 Darmstadt, andreas.larem@julius-kuehn.de

Für die Entwicklung neuer biologischer Pflanzenschutzmittel und deren Qualitätskontrolle ist es wichtig, die aktiven Substanzen klar zu identifizieren und voneinander abgrenzen zu können. Dies gilt insbesondere auch für Mikroorganismen und Viren, für welche geeignete Methoden der Aktivitätsbestimmung und der Identifizierung notwendig sind. Vor dem Hintergrund, die Anwendung chemischer Pflanzenschutzmittel zu reduzieren und praktikable biologische Verfahren zu entwickeln, werden im Rahmen des EU-Projektes BIOCOTES, verschiedene Isolate des *Phthorimaea operculella Granulovirus* (PhopGV) hinsichtlich ihres Infektionspotenzials für die wichtigen Schadinsekten Tomatenminiermotte (*Tuta absoluta*), Kartoffelmotte (*Phthorimaea operculella*) und Guatemalteckische Kartoffelmotte (*Tecia solanivora*) untersucht. Das Ziel ist hierbei, die am besten geeigneten PhopGV-Isolate zur möglichen Bekämpfung dieser Schadinsekten an Tomate, Kartoffel, Aubergine, Paprika und Tabak zu identifizieren.

Hierzu wurden mit acht, aus unterschiedlichen geographischen Regionen stammenden PhopGV-Isolaten vergleichende Wirkungsstudien bei Larven der Kartoffelmotte durchgeführt und die mittlere Letalkonzentration (LC₅₀) und die mittlere Überlebenszeit (ST₅₀) bestimmt.

Auf der Basis von Next-Generation-Sequenzierungen wurden die Genome von neun PhopGV-Isolaten vollständig sequenziert. Die Sequenzen werden dazu verwendet, genotyp-spezifische Marker zu identifizieren und Genomdaten mit Aktivitätsunterschieden bei den durchgeführten Bioassays zu korrelieren. Durch die Analyse der Genomdaten können Erkenntnisse über die genetische Diversität und Variabilität von PhopGV gewonnen werden.

Dieses Projekt wird im Rahmen des Gemeinschaftsprojektes BIOCOTES (<http://www.biocotes.eu/>) zur Entwicklung neuer biologischer Pflanzenschutzmittel für Europa durch Mittel der EU finanziert.

10-7 - Biologische Aktivität des entomopathogenen Pilzes *Isaria fumosorosea* gegen Gewächshauschädlinge

Biological efficacy of the entomopathogenic fungi Isaria fumosorosea against greenhouse pest insects

Katharina Saar¹, Edgar Schliephake², Jasmin Philippi², Jonas Sindlinger¹, Manuel Werner¹, Nicolas Maguire¹, Johannes A. Jehle¹, Dietrich Stephan¹

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstrasse 243, 64287 Darmstadt, katharina.saar@julius-kuehn.de,

²Julius Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg

Neben den wohl bisher bekanntesten entomopathogenen Pilzgattungen wie *Metarhizium*, *Beauveria* und *Lecanicillium* ist auch die ubiquitär vorkommende Art *Isaria fumosorosea* ein

vielversprechender Kandidat zur effektiven biologischen Schadinsektenbekämpfung. Sowohl in den USA als auch in Südamerika und Zentralasien wurde das häufige Vorkommen des entomopathogenen Pilzes *Isaria fumosorosea* bereits seit Anfang der 1990er Jahre bei sowohl Nymphen als auch Adulte der Weißen Fliegen beschrieben. Mittlerweile konnten jedoch für *Isaria* sp. bereits bei Insekten ein zehn Ordnungen und 25 Familien umfassendes Wirtsspektrum beschrieben werden, wobei die Hauptwirte zur Klasse der Lepidoptera zählen (Zimmermann, 2008).

Das EU-Projekt BIOCOTES hat zum Ziel, biologische Alternativen zur chemischen Bekämpfung von Schadinsekten zu finden. Im Hinblick auf die Richtlinie 2009/128/EC der Europäischen Union, die die Rolle der integrierten Schädlingsbekämpfung als essentielle Strategie zur Verringerung des Einsatzes chemischer Pflanzenschutzmittel betont, soll im Rahmen dieses Projektes ein effektives *I. fumosorosea* Isolat gefunden werden. Hierfür soll eine genauere Charakterisierung verschiedener aus weltweiter Herkunft stammenden *I. fumosorosea* Isolaten durchgeführt werden. Da es Hinweise gibt, dass es spezifische Unterschiede bezüglich der Wirtspathogenität zwischen den einzelnen Isolaten gibt, hat die Studie zum Ziel, einen Vergleich der biologischen Effektivität diverser *I. fumosorosea* Isolate gegen unterschiedliche Gewächshausschädlinge sowie unter verschiedenen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen zu untersuchen.

Darüber hinaus wurde nicht nur die Mortalitätsrate der Isolate auf den Schädling selbst, sondern auch der Einfluss der Infektion auf das Saugverhalten der blattsaugenden Weißen Fliege (*Bemisia tabaci*) mittels der *Electrical Penetration Graph* Methode untersucht. Zudem wurden molekularbiologisch (RAPD) isolatspezifische molekulare Fingerprints erstellt um so erste Einblicke über die Populationsstruktur sowie potentielle Virulenzfaktoren zu erhalten. Weiterhin wurde untersucht, ob sich genomische Unterschiede innerhalb des Chitinase Gens hinsichtlich zur jeweilig vorliegenden Virulenz approximieren ließen.

Literatur

Zimmermann, G. 2008: The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Sci Techn* 18, 865-901.

10-8 - Selection of Entomopathogenic Nematodes for the Biological Control of major insect pests on Tomato

Mokhtar Abdelraouf Abonaem, Annette Herz

¹Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstrasse 243, 64287 Darmstadt, mokhtar.abonaem@julius-kuehn.de

The efficacy of 15 nematode isolates against four major tomato insect pests was tested. Nematodes were applied in four concentrations (1, 5, 10, or 20 nematode (IJs)/larva). The results showed that increasing the applied concentration (5, 10, 20 IJs/larva) of the tested isolates increase the number of isolates that can cause at least 60 % larval mortality of the tested insects. Some of them even achieved high mortalities of target pests at 5 IJs/larva. These isolates will be under further study to develop their use as biological control agents in tomato crops.