

**43-6 - Muftah Alkhatay, D.; Karlovsky, P.; Vidal, S.**

Georg-August-Universität Göttingen

**Entomopathogens as Endophytes**

Whereas there is increasing evidence demonstrating that several strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* can endophytically colonize different plant species and demonstrating the insecticidal effects on some target pests, only few papers have so far proved this colonisation inside plant tissues.

In our research, we hypothesize that three strains of *Beauveria bassiana* (Bb), and two strains of *Metarhizium anisopliae* are able to successfully endophytically colonize two varieties of tomato plants (*Solanum lycopersicum*); 'Harzfeuer' and 'Ruthje', with no significant production of mycotoxins, and significant insecticidal effects on greenhouse whitefly development (*Trialeurodes vaporariorum*). Plants were inoculated with fungal conidiospores or blastospores in different ways; such as seed treatments, foliar applications, agar block applications, or root inoculations, and left growing under greenhouse conditions. At harvest time, plants were checked for successful endophytic colonization by re-isolating the target fungi on selective medium from the plant stems and leaves, checking the presence of the fungal DNA inside the plant tissues by applying Real-Time PCR and investigating the production of mycotoxins (i.e. Beauvericin and Destruxin A), using HPLC analysis. Thereafter, colonized plants were offered to greenhouse whitefly to assess their insecticidal effect on the development of the larvae.

Our results demonstrate that endophytic entomopathogenic fungi can be a new option for biological control strategies. Future research will analyse a wider spectrum of potential mycotoxins and will look at the interactions between host plant colonisation by the fungi and plant metabolism, as well as the interaction between the endophytic entomopathogenic fungus and other plant pathogens.

**43-7 - Lohse, R.<sup>1)</sup>; Jakobs-Schönwandt, D.<sup>1)</sup>; Vidal, S.<sup>2)</sup>; Patel, A.<sup>1)</sup>**

<sup>1)</sup> Fachhochschule Bielefeld

<sup>2)</sup> Georg-August-Universität Göttingen

**Fermentation und Verkapselung eines endophytischen *Beauveria bassiana*-Isolats zur Etablierung einer neuen Pflanzenschutzstrategie**

In den letzten Jahren hat die Suche nach alternativen Pflanzenschutzstrategien aufgrund von Resistenzentwicklungen und politischen Vorgaben erheblich an Bedeutung gewonnen. Eine innovative Möglichkeit Kulturpflanzen auf biologische Weise vor dem Befall von Schadinsekten zu schützen, besteht in der Nutzung des entomopathogenen Nutzpilzes *Beauveria bassiana*, welcher sich endophytisch in den Pflanzen etablieren kann. In einem kürzlich bewilligten BMBF-Projekt werden daher die Entwicklung eines neuartigen Fermentations- und Formulierungsverfahrens für ein endophytisches *B. bassiana* Isolat (ATP-04) entwickelt. Ziel ist es dabei, den Pilz in einer möglichst widerstandsfähigen Dauerform, wie den Submers-Konidiosporen (SKS), massenzu vermehren und im Anschluss so zu formulieren, dass er Rapspflanzen systemisch besiedelt und, analog zu herkömmlichen Insektiziden oder transgenen Pflanzen, vor Schadinsekten schützt.

*B. bassiana* ATP-04 wurde zunächst in verschiedenen technischen Kulturmedien basierend auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, Mineralien und Hefeextrakten im Schüttelkolbenmaßstab angezogen. In einem Mineralmedium mit 5 % Melasse wurde nach einer Kultivierungsdauer von 170 h eine Sporenausbeute von  $9,2 \times 10^9$  SKS/g Substrat erzielt. Dabei konnte die Ausbeute durch die Zugabe von 50 g/l NaCl auf  $2,0 \times 10^{10}$  SKS/g Substrat gesteigert werden. Bei der Fermentation im 2 L-Rührkesselreaktor konnte ohne Salzzugabe nach 170 h eine Sporenausbeute von  $1,3 \times 10^{10}$  SKS/g Substrat erreicht werden. Außerdem ließ sich der Anteil an SKS in Bezug auf den Gesamtsporenertrag durch NaCl-Zugabe von 40 auf 86 % steigern.

Im Anschluss an die Vermehrung des Pilzes erfolgten die ersten Versuche zur Verkapselung der Biomasse. Dazu wurde der Einfluss verschiedener Nährstoffzusätze auf das Auswuchsverhalten des Pilzes aus feuchten und getrockneten Ca-Alginatkapseln untersucht. Über die Messung des radialen Myzeldurchmessers konnte gezeigt werden, dass die Steigerung des Myzelwachstums bei Kapseln mit 1 % Hefeextrakt und 2 % Protein gegenüber Kapseln ohne Nährstoffe bei 30 % und bei Kapseln mit 1 % autoklavierter Bäckerhefe und 2 % Protein bei 42 % lag. Des Weiteren wurden je 5 g der feuchten Kapseln an Wurzeln von 3 Wochen alten Rapspflanzen platziert und unter Gewächshausbedingungen inkubiert. *B. bassiana* konnte in 2 von 10 Behandlungen aus dem Pflanzenmaterial re-isoliert und mittels molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, *B. bassiana* ATP-04 in kostengünstigen Kulturmedien zu sehr hohen Zelldichten zu kultivieren und mit Hilfe von Verkapselungsmethoden zu formulieren. Weitere Versuche werden sich mit der gezielten Herstellung der Submers-Konidiosporen unter Anwendung innovativer

Mess- und Regelungstechniken beschäftigen. Des Weiteren werden ein Screening von Kapselmaterialien und -zusätzen sowie Wirksamkeitstests an verschiedenen Raps-Schädlingen erfolgen.

#### 43-8 - Vemmer, M.; Patel, A.

Fachhochschule Bielefeld

### Entwicklung von CO<sub>2</sub> freisetzenden Lockstoffkapseln zur Bekämpfung bodenbürtiger Schadinsekten – erste Ergebnisse

*Development of CO<sub>2</sub> releasing beads to control soil-borne insect pests – first results*

Viele Schadinsekten nutzen Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) zur Lokalisierung ihres Wirtes (DOANE et al., 1975, HIBBARD und BJOSTAD 1988, BERNKLAU et al. 2005). Das bedeutendste Beispiel für die Landwirtschaft hierfür ist der Westliche Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera*), dessen Larven sich zur Lokalisierung ihrer Hauptnahrungsquelle, der Maispflanze, an einem von den Wurzeln ausgehenden CO<sub>2</sub> Gradienten orientieren (Strnad et al. 1986). Der Westliche Maiswurzelbohrer verursacht durch Ertragsverluste und die Kosten für seine Bekämpfung in den USA jährlich einen Schaden von etwa einer Milliarde Dollar (CHANDLER, 2003) und ist seit Anfang der 1990er Jahre auch in Europa auf dem Vormarsch (O A 2011).

Der großflächige Einsatz von Bodeninsektiziden ist problematisch, da nur ein Teil des Wirkstoffes die Larven erreicht. Effektivere Insektizidanwendungen würden ökologische und ökonomische Vorteile bieten. Studien haben gezeigt, dass künstliche CO<sub>2</sub>-Quellen *D. virgifera* Larven anziehen und von Maiswurzeln weglocken können (*attract*-Strategie) und auf diese Weise die Effektivität von Bodeninsektiziden steigern können (*attract&kill*-Strategie) (BERNKLAU et al., 2004, SCHUMANN et al., 2011). Deshalb besteht ein großes Interesse an Pflanzenschutzmitteln, die auf der attraktiven Wirkung von CO<sub>2</sub> basieren. Bei der Entwicklung der Formulierung stehen Stabilität, Handhabbarkeit und vor allem die Langzeitfreisetzung des CO<sub>2</sub> im Vordergrund.

Eine künstliche CO<sub>2</sub>-Quelle wurde in unterschiedlichen Konzentrationen mit oder ohne Additive mit Hilfe einer Tropfmethode in Ca-Alginat verkapselt (Ø = 2,7 ± 0,2 mm). Es wurden sowohl die Auswirkung unterschiedlicher Konzentrationen der CO<sub>2</sub>-Quelle auf die Dauer und Menge der Freisetzung als auch der Effekt von Additiven mit Potential zur sofortigen und verzögerten Steigerung der CO<sub>2</sub>-Freisetzung untersucht. Dafür wurden CO<sub>2</sub>-Bildungsraten von isolierten Kapseln und CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in mit Erde und Kapseln befüllten Töpfen gemessen. Hierbei zeigte sich, dass Additive die CO<sub>2</sub>-Freisetzung sowohl erhöhen als auch verlängern können. In der Erde konnte eine signifikante CO<sub>2</sub>-Freisetzung über drei Wochen gemessen werden.

Weitere Versuche beschäftigen sich mit der Optimierung der Formulierung mit dem Ziel eine verlängerte Freisetzungsdauer zu erreichen.

#### Literatur

- DOANE, J.F. et al., 1975: The orientation response of *Ctenicera destructor* and other wire worms (*Cleoptera elatiradae*) to germinating grain and to carbon dioxide. The Canadian Entomologist, 107(12), S.1233-1252.
- HIBBARD, B.E., BJOSTAD, L. B., 1988: Behavioral responses of western corn rootworm larvae to volatile semiochemicals from corn seedlings. Journal of Chemical Ecology, 14(6), S.1523-1539.
- BERNKLAU, E.J. et al., 2005: Attraction of subterranean termites (Isoptera) to carbon dioxide. Journal of economic entomology, 98(2), S.476-484.
- STRNAD, S.P. et al., 1986: First-instar western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) response to carbon dioxide. Environmental Entomology, 15, S.839-842.
- CHANDLER, L.D., 2003: Corn rootworm areawide management program: United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service. Pest Management Science, 59(6-7), S.605-608.
- O A, 2011: Ein Schädling erobert Europa. bioSicherheit.de. Available at: <http://www.biosicherheit.de/basisinfo/139.schaedling-erobert-europa.html>.
- BERNKLAU, E.J. et al., 2004: Disruption of host location of western corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae) with carbon dioxide. Journal of economic entomology, 97(2), S.330-339.
- SCHUMANN, M. et al., 2011: Management of western corn rootworm larvae with artificial CO<sub>2</sub> sources. German Entomological Society Meeting, Berlin.