

“Biologischer Pflanzenschutz mit innovativen  
Formulierungen von endophytischen entomopathogenen  
Pilzen gegen Schadinsekten“

**Projektkoordinator:** Prof. Dr. Anant Patel, Fachhochschule Bielefeld  
**Kooperationspartner:** Prof. Dr. Stefan Vidal, Universität Göttingen  
**Kooperationspartner:** Dr. Arne Peters, e-nema – Gesellschaft für  
Biotechnologie und biol. Pflanzenschutz mbH

AZ: 31421/01

Projektbeginn: 18.11.2014

Laufzeit: 49,5 Monate

Bielefeld im Jahr 2019



**FH Bielefeld**  
University of  
Applied Sciences

# 1. Projektübersicht

## “Biologischer Pflanzenschutz mit innovativen Formulierungen von endophytischen entomopathogenen Pilzen gegen Schadinsekten“

<b>Aktenzeichen:</b>	31421/01
<b>Projektleitung:</b>	Fachhochschule Bielefeld (FH) Prof. Dr. Anant Patel Arbeitsgruppe: Fermentation und Formulierung von Biologicals und Chemicals Fachbereich Ingenieurwissenschaften und Mathematik
<b>Projekt Partner:</b>	Universität Göttingen (UG) Prof. Dr. Stefan Vidal, Department für Nutzpflanzenwissenschaften Abteilung Agrarentomologie  e-nema (EN) Gesellschaft für Biotechnologie und biologische Pflanzenschutz mbH
<b>Arbeitspakete (AP):</b>	
<b>AP 1: Screening von endophytischen Pilzisolaten: Wirksamkeit, Quantifizierung <i>in planta</i></b>	
	AP 1.1 Screening von endophytischen Pilzisolaten (FH,UG)
	AP 1.2 Quantifizierung in verschiedenen Pflanzenteilen (UG)
	AP 1.3 Vorab-Untersuchungen zur Mykotoxinbildung in verschiedenen Pflanzenteilen (UG)
<b>AP 2: Entwicklung von Anzuchtverfahren</b>	
	AP 2.1 Anzucht in Schüttelkultur (FH)
	AP 2.2 Scale-up der Anzucht (FH, EN)
<b>AP 3: Wirksamkeitstests (Labor-, Gewächshausversuche)</b>	
	AP 3.1 Wirksamkeitstests an Zielorganismen im Labor (FH,UG)
	AP 3.2 Wirksamkeitstests an Zielorganismen im Gewächshaus (UG)
<b>AP 4: Entwicklung technischer Formulierungen</b>	
	AP 4.1 Entwicklung von feuchten Formulierungen (FH)
	AP 4.2 Trocknung und Lagerung von Formulierungen (FH)
	AP 4.3 Scale-up technischer Formulierungen (EN, FH)
<b>AP 5: Quantifizierung und Mykotoxin-Charakterisierung <i>in planta</i></b>	
	AP 5.1 Abschließende Quantifizierung der EEPs mittels q-PCR (UG)
	AP 5.2 Mykotoxin-Charakterisierung in verwerteten Pflanzenteilen (UG)
<b>AP 6: Praxisnahe Versuche</b>	
	AP 6.1 Praxisnahe Versuche im Gewächshaus (UG, EN, FH)
	AP 6.2 Praxisnahe Versuche unter Feldbedingungen (UG, EN, FH)
<b>Projektlaufzeit:</b>	49,5 Monate; inkl. kostenneutraler Projektverlängerung: bis 31.12.2018

## Inhaltsverzeichnis

1.	Projektübersicht .....	2
2.	Zusammenfassung.....	4
3.	Bericht.....	4
3.1	Anlass und Zielsetzung des Projektes .....	4
3.2	Darstellung der Arbeitspakete und der angewandten Methoden.....	5
4.	Ergebnisse .....	7
4.1	Ergebnisse des Arbeitspaketes 1: Screening von endophytischen Pilzisolaten: Wirksamkeit, Quantifizierung in planta .....	7
4.2	Ergebnisse des Arbeitspaketes 2: Entwicklung von Anzuchtverfahren .....	12
4.3	Ergebnisse des Arbeitspaketes 3: Wirksamkeitstests (Labor und Gewächshaus).....	18
4.4	Ergebnisse des Arbeitspaketes: Entwicklung technischer Formulierungen .....	21
4.5	Ergebnisse des Arbeitspaketes 5: Quantifizierung und Mykotoxin-Charakterisierung <i>in planta</i> .....	28
4.6	Ergebnisse des Arbeitspaketes 6: Praxisnahe Versuche .....	30
5.	Diskussion.....	39
5.1	Inwieweit wurden die verfolgten Ziele erreicht? .....	39
5.2	Woraus ergaben sich Abweichungen der erhaltenen Ergebnisse? .....	40
5.3	Wie gestaltete sich die Arbeit mit den eingebundenen Kooperationspartnern? .....	40
5.4	Wird das Vorhaben oder Teile davon weitergeführt? .....	40
6.	Öffentlichkeitsarbeit.....	41
7.	Fazit .....	44
7.1	Hat sich die Vorgehensweise bewährt?.....	44
7.2	Welche Zielgruppen werden in welcher Form angesprochen?.....	44
8.	Anlagen/Anhang.....	45
8.1	Abbildungsverzeichnis .....	45
8.2	Tabellenverzeichnis .....	47
8.3	Abkürzungsverzeichnis .....	47

## 2. Zusammenfassung

Im Rahmen des vorliegenden Projektes wurden Fermentations- und Formulierungsverfahren für endophytische, entomopathogene Nutzpilzisolat entwickelt. Dazu wurde im Göttinger Umland ein breites Isolatscreening durchgeführt. Die gefundenen Isolate wurden aufgrund ihrer Fähigkeit *Tenebrio molitor* Larven (Mehlkäferlarven), verschiedene *Agriotes* spp. Larven (Schnellkäfer) sowie *Leptinotarsa decemlineata* (Kartoffelkäfer) Larven *in vitro* abzutöten selektiert. Besonders gute Resultate, für alle Schadinsekten, wurden mit dem *Metarhizium brunneum* Isolat CB15III erzielt. Es zeigte sich zudem, dass dieser Pilz generell in der Lage war, Kartoffelknollen endophytisch zu besiedeln und in neuwachsendes Gewebe einzuwandern. In keiner der untersuchten Proben konnten durch den Pilz induzierte potentiell toxische Destruxine nachgewiesen werden.

Alle eingesetzten *Metarhizium* Isolate (Bipesco5 und CB15 III) konnten erfolgreich im Fermenter kultiviert werden, wobei sich die Biomasseform des Myzels für die spätere Anwendung bzw. Formulierung als am besten geeignet herausstellte. Eine maximale Ausbeute von fein-disperser Myzelbiomasse konnte mit einem Medium basierend auf 7,5% Glukose, 4% ANiPept, 7% PEG 200 und 1% Kartoffelstärke erreicht wurde. In Scale-up Experimenten wurde zudem durch eine Verringerung der Gelöstsauerstoffkonzentration die Bildung von fein-disperser Myzel und Hyphenfragmenten weiter gefördert und zusätzlich eine Aggregation von Hyphen zu Pellets inhibiert.

In Gewächshausversuchen wurde das Isolat CB 15 III gegen die Larven des Kartoffelkäfers getestet. Die Ergebnisse aus diesem Versuch machten deutlich, dass eine Knollenbehandlung zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers am erfolgversprechendsten war. Anschließend wurde für dieses Isolat eine technische Formulierung mit dem Ziel entwickelt, die Pflanzen optimal in allen Geweben endophytisch zu besiedeln. Hierfür wurde der Einfluss einer Vielzahl von Parametern wie Kulturalter, Polyolgehalt, Zugabe von Enzymen zur besseren Penetration der Zellwand, Trocknungs- bzw. Lagerfähigkeit aber auch Einfluss des Bodens untersucht. Die zur Kolonisierung am besten geeignete Formulierung bestand aus einem Pektinamid als Matrix, Cellulose als Füll- und Nährstoff, Stärke und autoklavierter Bäckerhefe als Nährstoff sowie dem Enzym Cellulase.

Neben den Experimenten mit Schadinsekten wurden im Gewächshaus noch weitergehende Versuche zur pflanzenwachstumsstimulierenden Wirkung des verkapselten Endophyten durchgeführt. Hier zeigten sich mehrere positive Effekte der entwickelten Formulierung. So konnte die Pflanzenbiomasseproduktion signifikant gesteigert werden, die Formulierung des Pilzes führte zu größeren Blattflächen, die Pflanzennährstoffversorgung mit Stickstoff und besonders mit Phosphor war signifikant verbessert. Daraus ließ sich ableiten, dass das Isolat nicht nur gute entomopathogene Eigenschaften zeigt, sondern zusätzlich noch die Pflanze in ihrem Wachstum stärken kann.

Die Formulierung wurde im Freiland in praxisnahen Versuchen an Kartoffeln gegen einen Drahtwurmbefall getestet. Aufgrund widriger Umweltbedingungen sowie mangelndem bzw. zu hohem Infektionsdruck konnte eine Wirkung jedoch nicht ausreichend nachgewiesen werden. In einem weiteren Feldversuch gegen den Kartoffelkäfer zeigen die Ergebnisse von beiden Feldern jedoch, dass eine Knollenbehandlung mit dem *M. brunneum* Isolat CB 15 III einen reduzierenden Effekt auf die Populationsentwicklung der Käfer hatte.

## 3. Bericht

### 3.1 Anlass und Zielsetzung des Projektes

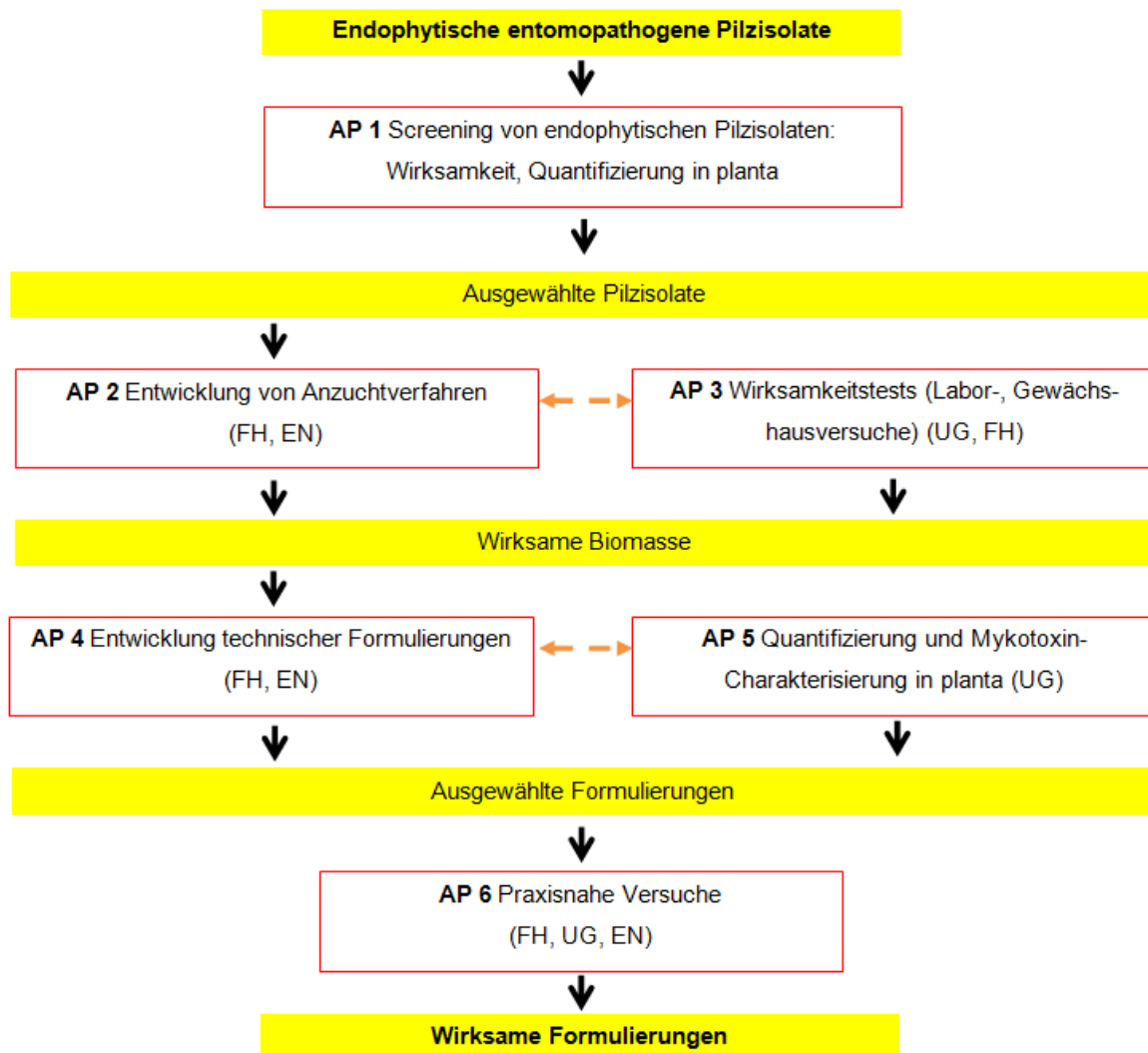
Die Entwicklung und Anwendung von neuen und effektiven Pflanzenschutzstrategien gegen Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschädlinge ist eine der stetigen und zentralen Herausforderungen für die Agrarforschung. Probleme, die durch Resistenzen oder neu eingeschleppte Schädlinge auftreten, erfordern innovative Ansätze mit neuen Wirkmechanismen. Die von den Verbrauchern und der Politik gewünschte nachhaltige Landwirtschaft erfordert zudem eine breitere Einbeziehung von biologischen Bekämpfungsverfahren in die Nahrungsmittelproduktion. Zudem sind in den letzten Jahren Formulierungen mit mehr als einer Funktion von besonderem Interesse („added value“) geworden. So ist es vorteilhaft, wenn ein Pflanzenschutzmittel auch eine Pflanzenwachstumssteigernde Funktion aufweist.

In dem Projekt „Biologischer Pflanzenschutz mit innovativen Formulierungen von endophytischen entomopathogenen Pilzen gegen Schadinsekten“ wird die Entwicklung einer innovativen und vielfältig einsetzbaren Pflanzenschutzstrategie gegen verschiedene Schädlinge weiterentwickelt. Dabei sollte das endophytische Wachstum entomopathogener Pilzisolat genutzt werden (Pilze, die spezifisch Insekten

abtöten und im Inneren von Pflanzen wachsen), um verschiedene Kulturpflanzen systemisch und dauerhaft vor herbivoren Insekten zu schützen. Bisher in den Arbeitsgruppen von Prof. Vidal und Prof. Patel erarbeitete Grundlagen zum Wachstum dieser Pilzisolat im Pflanzengewebe und zur Wirkung gegenüber verschiedenen Schädlingarten wurden vervollständigt und validiert, um das Innovationspotenzial dieser Strategie für eine Produktentwicklung mit deutschen Pflanzenschutzfirmen nutzbar zu machen.

### 3.2 Darstellung der Arbeitspakete und der angewandten Methoden

Über ein Screening, das spezifische endophytische entomopathogene Pilzisolat (EEPs) für die Kulturpflanzen Kartoffel und Tomate definiert, wurden optimierte Isolate auf kostengünstigen Medien der Agrarindustrie vermehrt. Die pilzliche Biomasse wurde zur Erhöhung der Handhabbarkeit, Lagerfähigkeit und verbesserten Etablierung der endophytischen Pilze in den Kulturpflanzen in spritzbare Formulierungen, Kapseln oder Saatgut-Coatings eingearbeitet. In begleitenden Wirksamkeitstests wurde die erfolgreiche Besiedlung der Kulturpflanzen mit den Pilzen validiert und gewebespezifisch über q-PCR quantifiziert sowie jeweils die Mortalitätsfaktoren der herbivoren Schadinsekten *ad planta* erhoben. Das technische und wirtschaftliche Potenzial dieser innovativen Pflanzenstrategie wurde in Gewächshaus- und Freilandversuchen mit verschiedenen Kulturpflanzen evaluiert und die spezifischen Anwendungsbereiche identifiziert. Das Fließschema und der Zeitplan des Projektes ist in Abbildung 1 bzw. Abbildung 2 visualisiert.



**Abbildung 1.** Fließschema zum Ablauf des Projektes „Biologischer Pflanzenschutz mit innovativen Formulierungen von endophytischen entomopathogenen Pilzen gegen Schadinsekten“.

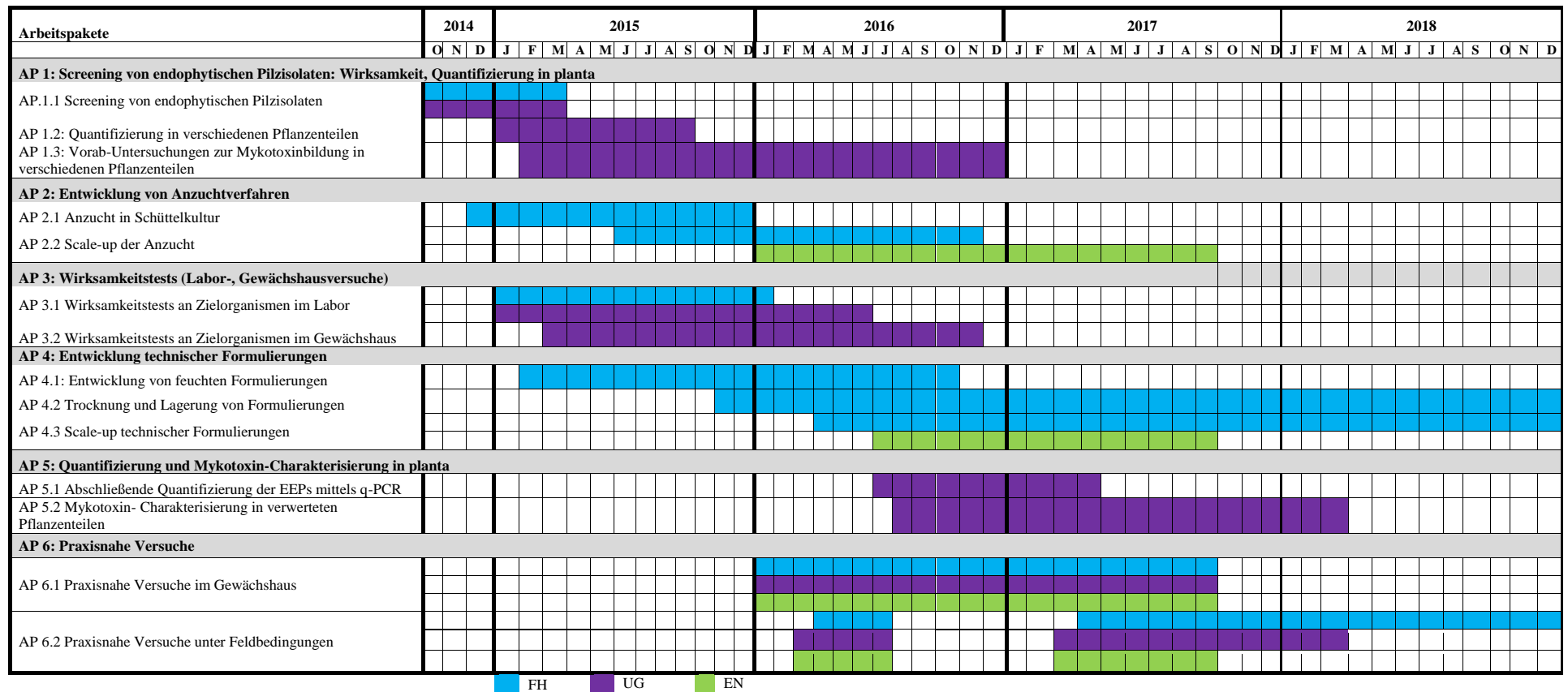


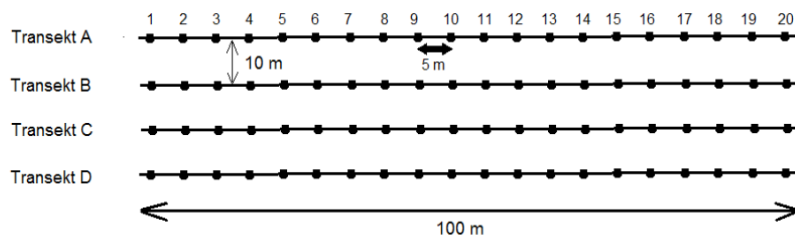
Abbildung 2. Zeitplan des Projektes „Biologischer Pflanzenschutz mit innovativen Formulierungen von endophytischen entomopathogenen Pilzen gegen Schadinsekten“

## 4. Ergebnisse

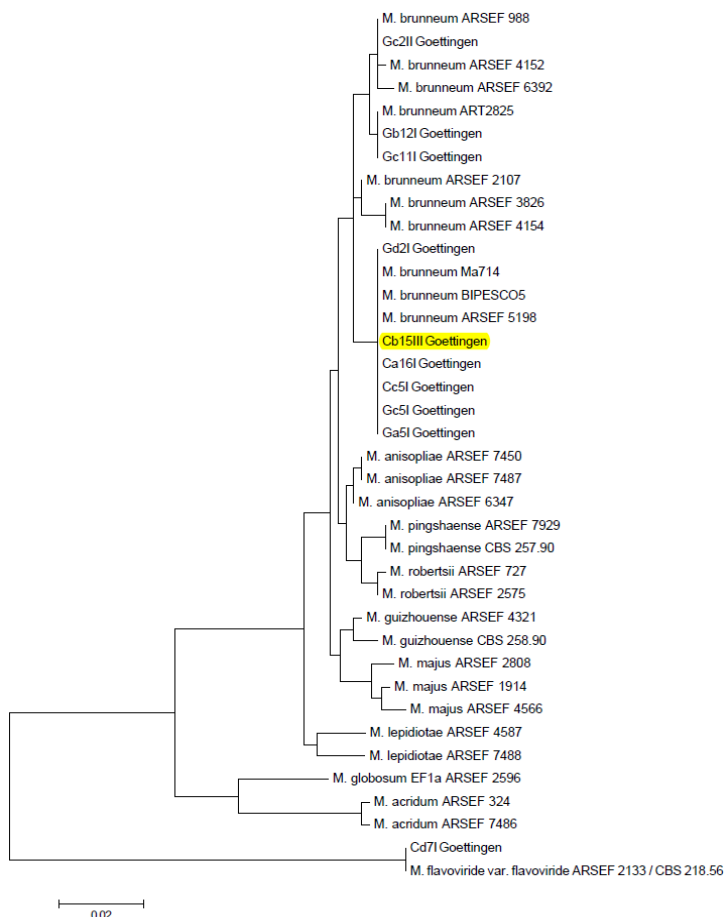
### 4.1 Ergebnisse des Arbeitspaketes 1: Screening von endophytischen Pilzisolaten: Wirksamkeit, Quantifizierung in planta

#### 4.1.1 Screening von endophytischen Pilzisolaten

Die für das Screening verwendeten Pilzisolaten wurden aus dem Göttinger Umland isoliert. Dafür wurden Bodenproben sowohl von einer ackerbaulich bewirtschafteten Fläche, als auch von einer Grünlandfläche entnommen. Zur Isolierung wurden die Proben aufgeschwemmt und auf selektives Medium ausplattiert. Das Medium wurde durch die Hinzugabe von Antibiotika und Fungiziden für die Selektion von *Metarhizium* spp. optimiert. Pilzkolonien wurden aufgrund morphologischer Merkmale selektiert und in mehreren Schritten von Kontamination (z.B. Pilze) gereinigt. Von jedem Isolat wurde ein Backup erstellt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Im Folgenden werden die Isolate mit der Probenbezeichnung benannt, die sich aus dem Ort der Probenentnahme herleiten lässt. So stammt ein *Metarhizium* Isolat mit der Bezeichnung „C, a16“ von einer Ackerfläche und dort aus dem 16ten Entnahmepunkt des Transekts „A“ (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung der Probenentnahme, die sowohl auf einer Grünlandfläche (G) als auch auf einer Ackerfläche (C) durchgeführt wurden.

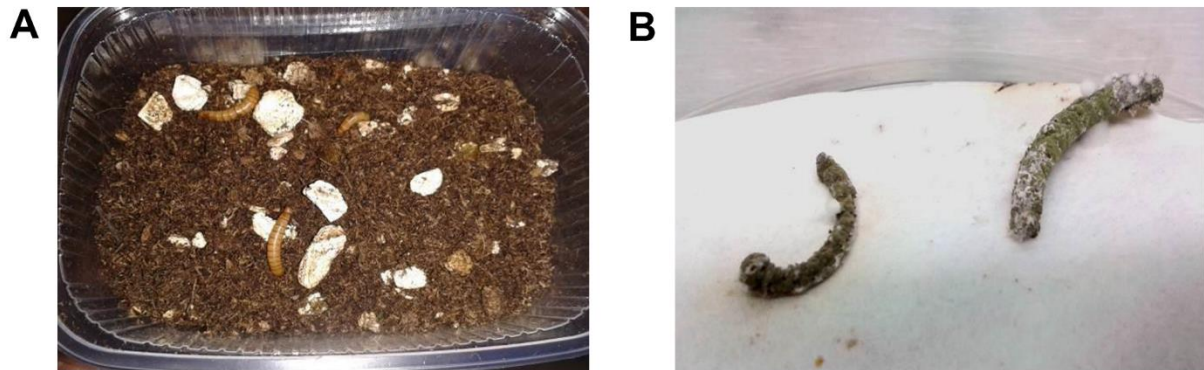


Alle Isolate wurden zur Sequenzierung und eindeutigen Bestimmung an die „Agroscope“ nach Zürich geschickt. Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei den isolierten Stämmen mehrheitlich um Isolate des Pilzes *Metarhizium brunneum* handelt (

Abbildung 4).

Für das Screening wurden in einem ersten Schritt acht Isolate auf ihre generellen entomopathogenen Eigenschaften hin untersucht. Dafür wurden Sporensuspensionen der jeweiligen Isolate angesetzt und über *Tenebrio molitor* Larven (Mehlkäferlarven) gegossen, welche sich in einem Erde-Vermiculit-Gemenge (5:1) befanden (**Abbildung 5A**).

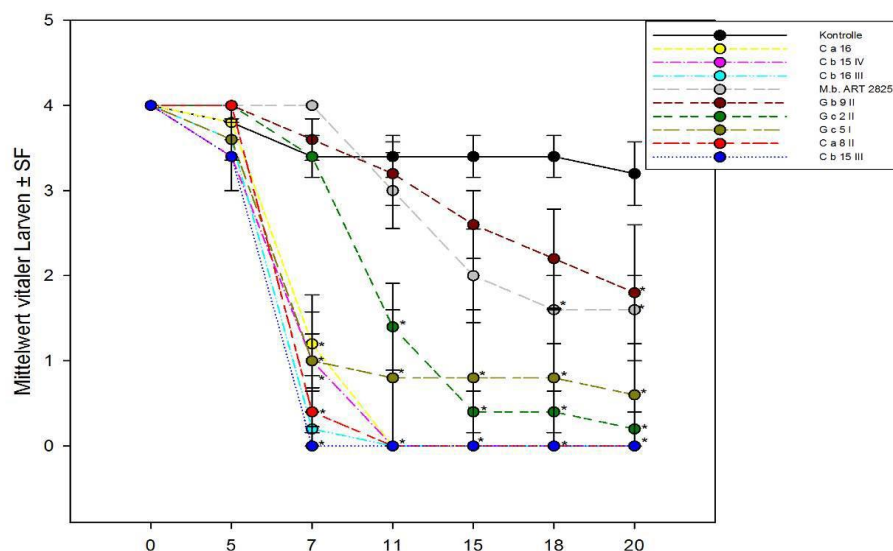
**Abbildung 4** Hierarchische Clusteranalyse der isolierten *Metarhizium* Isolate aus dem Göttinger Umland (AG Dr. Enkerli, Agroscope, Zürich, Schweiz)



**Abbildung 5.** (A): *T. molitor* Larven in einem Plastischälchen mit Erde/ Vermiculit Gemenge (5:1), (B): *T. molitor* Larven mit ausgeprägter Mykose, ausgelöst durch den Befall mit *Metarhizium* spp.

Zusätzlich wurde eine Gruppe von Larven mit dem bereits bekannten Isolat *Metarhizium brunneum* ART2825 behandelt. Abgestorbene Larven wurden über einen Zeitraum von 20 Tagen in regelmäßigen Abständen aus den Versuchen entfernt und in einem Inkubator gelagert, um ein Auswachsen des Pilzes (Mykose) zu begünstigen und dadurch eine Infektion mit dem Pilz nachzuweisen (**Abbildung 5B**).

Die Daten zeigten, dass besonders die Stämme aus der Ackerfläche sehr aggressiv waren und die Larven innerhalb von sieben Tagen abgetötet wurden. Das bisher bekannte Isolat ART 2825 konnte in diesem Versuch erst ab dem 18ten Tag die Anzahl von vitalen Larven signifikant reduzieren (**Abbildung 6**). Isolate die innerhalb von elf Tagen die Anzahl an Larven signifikant reduzieren konnten, wurden als „besonders wirksam“ eingestuft und wurden für das weiterführende Screening verwendet.



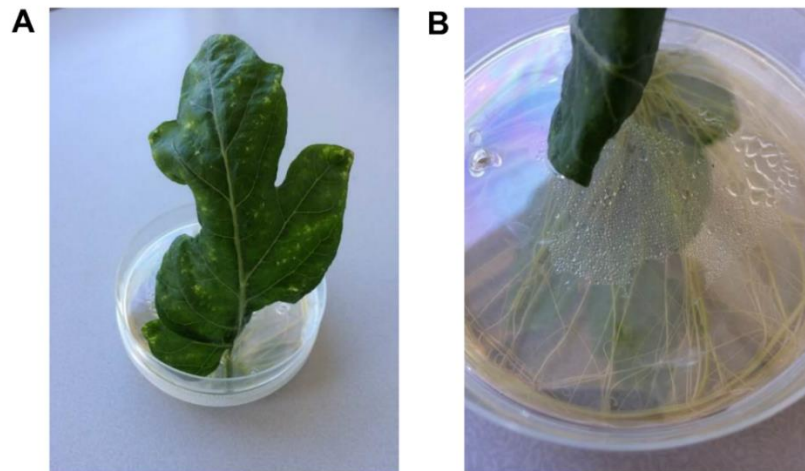
**Abbildung 6.** Mittelwert der vitalen Larven ± SF (Standardfehler) nach Tagen: 0= Versuchsbeginn, 20= Ende des Versuchs. (\*) zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollgruppe an,  $p < 0,05$  (Dunnett-post-hoc-Test)

#### 4.1.2 Entwicklung eines Screening-Verfahrens

Für die Untersuchung auf endophytische und entomopathogene Eigenschaften der Isolate wurde nach mehreren Vorversuchen ein auf Petrischalen basierendes Screening-System ausgewählt. Mit diesem Verfahren sollen sowohl endophytisches Wachstum als auch die entomopathogene Wirkung der Isolate nachgewiesen werden.

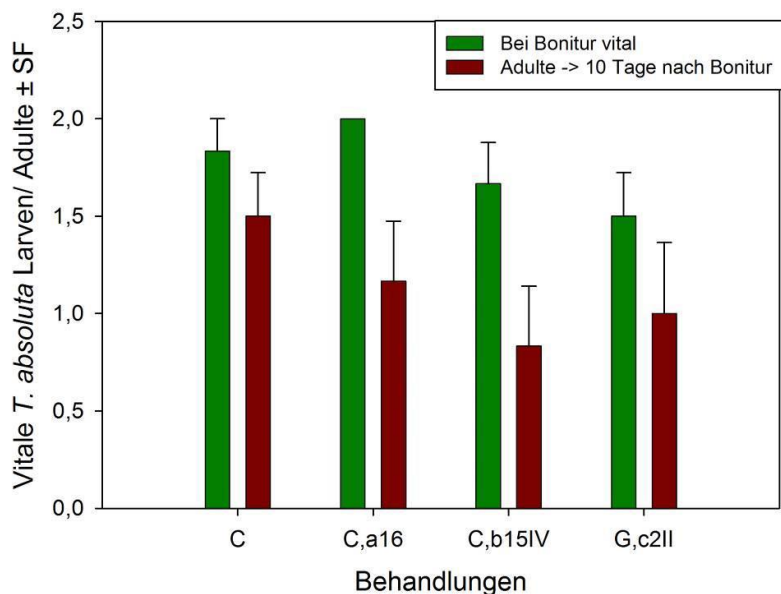


Für das Screening wurden abgeschnittene Tomatenblätter (Var. Ruthje) in präparierte Petrischalen gesetzt und mit einer Nährlösung (Wasser + div. Nährsalze) zur Wurzelbildung angeregt. Hierfür wurden zwei Petrischalen übereinandergestellt und in den Deckel der unteren und den Boden der oberen jeweils zwei 2,5 mm große Löcher gebrannt. Durch eines dieser Löcher konnte dann der Stängel des Blattes gesteckt werden (**Abbildung 7A**). Durch das zweite Loch kann das Blatt während des Versuches mit Nährlösung versorgt werden. Nach ca. zwei bis drei Wochen wurden von dem Blatt neue Wurzeln gebildet (**Abbildung 7B**).



**Abbildung 7.** (A): Abgeschnittenes Tomatenblatt in präparierten Petrischalen, (B): aus dem Tomatenblatt auswachsende Wurzeln.

Sobald ein neues Wurzelsystem ausgebildet worden war, wurde mit einer Pipette 200µl einer Sporensuspension ( $1 \times 10^6$  Sporen/ml) durch das „Versorgungsloch“ gegeben. Für den „1. Petrischalenversuch“ wurde eine L1 *T. absoluta* Larve auf jedes Blatt abgelegt, für den „2. Petrischalenversuch“ waren es zwei Larven. Nach der Verpuppung wurden die vitalen Puppen ausgezählt, oberflächensterilisiert und in sterile Petrischalen überführt. Zehn Tage nach der Bonitur wurden die geschlüpften adulten Motten ausgezählt und abgestorbene Puppen auf Anzeichen einer Mykose untersucht. Es konnte keine direkte Infizierung der Larven durch eines der Isolate nachgewiesen werden. Es konnten leichte Effekte auf den Schlupf der Adulten gezeigt werden, die allerdings nicht signifikant waren (**Abbildung 8**). Da auch in einem weiterführenden Versuch keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten (siehe: **AP 3.1**), wurde das Vorhaben *M. brunneum* Isolate endophytisch gegen *T. molitor* Larven einzusetzen aufgeben. Aus diesem Grund wurde ein neuer Screening-Durchgang durchgeführt, der sich auf Schädlinge an Kartoffeln konzentriert hat.



**Abbildung 8.** Ergebnisse des "2. Petrischalenversuches". In grün sind die vitalen Larven und Puppen dargestellt, die bei der Bonitur gefunden wurden. In rot sind die vitalen adulten Motten dargestellt, die zehn Tage nach der Bonitur geschlüpft sind. Zu sehen ist der Mittelwert  $\pm$  SE (Standardfehler).

Während des zweiten Screening-Durchganges wurden die *M. brunneum* Isolate Gc2II aus dem Grünland und Cb15III aus dem Ackerland auf ihre Wirksamkeit gegen *Agriotes* Arten getestet. Hierfür wurden *Agriotes*-Larven der Spezies *A. sputator*, *A. obscurus* und *A. lineatus* zunächst vereinzelt und anschließend in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Erde-Vermiculit (5:1) Gemisch gehalten. Zu dem Substrat wurden entweder eine Sporensuspension des Isolates Cb15III oder Gc2II hinzugegeben. Sowohl die Sterblichkeit als auch die Mykoserate wurde während des Versuchszeitraumes regelmäßig überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass das *M. brunneum* Isolat Cb15III die höchste Aggressivität (Mortalität) gegenüber allen getesteten *Agriotes*-Arten aufweist. So sind 50% der *A. obscurus* Larven bereits nach  $16 \pm 1,55$  Tagen abgestorben und zeigten in 87,5% der Fälle eine Mykose (**Tabelle 1**).

**Tabelle 1** LT<sub>50</sub> in Tagen (Median  $\pm$  Standardfehler (SE) und 95% oberes und unteres Konfidenzintervall (CI)), Mortalität und Mykoserate (beides in %) von *Agriotes lineatus*, *A. obscurus* und *A. sputator* nach der Inokulation mit *M. brunneum* (Isolat: Cb15III und Gc2II) (Kaplan-Meier survival analysis (log-rank test); Kleinbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen von *Agriotes* Arten an (Holm-Sidak pairwise tests ( $\alpha = 0.05$ )).

Behandlung	<i>A. lineatus</i>					
		LT <sub>50</sub>	95 % CI		Mortalität	Mykose Rate
		Median $\pm$ SE	Lower	Upper		
Cb15III	<b>a</b>	21 $\pm$ 7.74	5.82	36.05	70%	43%
Gc2II	<b>ab</b>	n.a.			30%	33%
Kontrolle	<b>b</b>	n.a.			20%	0 %

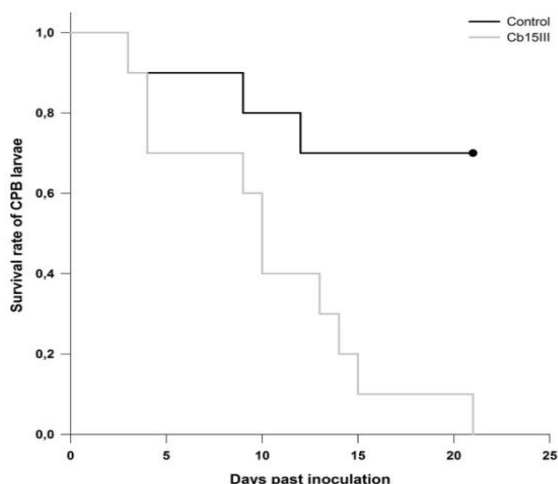
Behandlung	<i>A. obscurus</i>					
		LT <sub>50</sub>	95 % CI		Mortalität	Mykose Rate
		Median $\pm$ SE	Lower	Upper		
Cb15III	<b>a</b>	16 $\pm$ 1.55	11.85	46.95	90%	88%
Gc2II	<b>b</b>	n.a.			30%	50%
Kontrolle	<b>b</b>	n.a.			20%	0%

Behandlung	<i>A. sputator</i>					
		LT <sub>50</sub>	95 % CI		Mortalität	Mykose Rate
		Median $\pm$ SE	Lower	Upper		
Cb15III	<b>a</b>	18 $\pm$ 15.02	19.51	56.09	90%	100%
Gc2II	<b>a</b>	50 $\pm$ 17.39	22.01	67.39	70%	60%

Kontrolle	<b>b</b>	n.a.	20%	0%
n.a. not available				

Aufgrund der guten Wirksamkeit des Isolates Cb15III wurde dieses in einem dritten und abschließenden Versuch gegen die Larven und adulten Käfer des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata*) getestet. Für den Versuch wurden sowohl L<sub>2</sub> Larven als auch adulte Käfer einzeln in mit Filterpapier ausgekleideten Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm gehalten und täglich mit frischen Kartoffelblättern gefüttert. Die Tiere wurden zu Beginn des Versuchs mit einer Sporensuspension übergossen, die während des gesamten Versuches in der Petrischale verblieben ist. Die Ergebnisse zeigen, dass alle mit Cb15III inokulierten Larven innerhalb von 21 Tagen absterben (LT<sub>50</sub> Wert: 10 Tage ± 0,78) (**Abbildung 9**). Außerdem konnte bei 90% der abgestorbenen Larve ein Auswachsen des Pilzes beobachtet werden. Adulte Käfer haben während des Versuchszeitraumes nicht auf die Behandlung mit der Sporensuspension reagiert.



**Abbildung 9** Überlebensrate von Kartoffelkäferlarven nach Behandlung mit einer *M. brunneum* Cb15III Sporensuspension. Die Überlebensrate war signifikant verkürzt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Log-Rank test:  $\chi^2 = 8.65$ ; DF = 1,  $p < 0.01$ ).

### 4.1.3 Quantifizierung des Endophyten in verschiedenen Pflanzenteilen

Zur Überprüfung ob das *M. brunneum* Isolat Cb15III in der Lage ist Kartoffelpflanzen zu besiedeln, wurden je zehn Kartoffelknollen von 20 Kartoffelsorten mit 10 µl einer Sporensuspension beimpft. Die neuen Sprossen aus den Knollen wurden auf semi-selektives Nährmedium ausgelegt, um eine Kolonisierung zu verifizieren. Es zeigte sich, dass der Pilz generell in der Lage ist Kartoffelknollen zu besiedeln und in neuwachsendes Gewebe einzuwandern. Die nachgewiesenen Kolonisierungsraten sind allerdings sehr gering, was auf eine hohe Auswuchsrate anderer Pilze aus den Kartoffelsprossen zurückzuführen ist (Tabelle 2).

**Tabelle 2** Re-Isolierungsrate (in %) von *M. brunneum* und anderen Pilzen aus neuen Sprossen verschiedener Kartoffelsorten auf semi-selektiven Nährmedium (2 x 2 table Fisher's exact test  $\alpha = 0.05$ ).

Varietät	Treatment	Pilz Re-Isolierung (%)		Varietät	Treatment	Pilz Re-Isolierung (%)	
		<i>M. brunneum</i>	Andere			<i>M. brunneum</i>	Andere
Nicola	Control	0	10	Campina	Control	0	70
	Cb15III	0	30		Cb15III	0	88
Annabelle	Control	0	100	Annalena	Control	0	60
	Cb15III	0	71		Cb15III	0	80
Orla	Control	0	50	Adretta	Control	0	60
	Cb15III	0	88		Cb15III	0	100
Quarta	Control	0	100	Bintje	Control	0	40
	Cb15III	0	67		Cb15III	0	50
Cassablanca	Control	0	50	Linda	Control	0	10
	Cb15III	0	88		Cb15III	10	50
Granola	Control	0	30	Gala	Control	0	20
	Cb15III	0	60		Cb15III	11	22
Agria I	Control	0	20	Ditta	Control	0	40
	Cb15III	0	10		Cb15III	11	11
Agila II	Control	0	60	Bellinda	Control	0	22

	Cb15III	0	60		Cb15III	0	33
Belana	Control	0	0	Augusta	Control	0	80
	Cb15III	0	0		Cb15III	0	71
Solist	Control	0	43	Marabel	Control	0	83
	Cb15III	0	67		Cb15III	25	75

Für den molekulargenetischen Nachweis von *M. brunneum* in der Pflanze wurde eine Nested-PCR verwendet, da sich eine einfache PCR als zu wenig sensitiv gezeigt hat. Da kein spezifischer *M. brunneum* Primer zur Verfügung stand, wurde auf den Metarhizium Clade 1 spezifischen Primer 'Ma 1763' (forward primer: 5'-CCAACCTCC-AACCCCTGTGAAT) und 'Ma 2079' (reverse primer: 5'-AAAACCA-GCCTCGCCGAT) zurückgegriffen. Im zweiten Schritt der Nested-PCR wurde dann das Primer-Paar MetarhL1 (forward primer: 5'-ATCTCTTG-GTTCTGGCATCG) und MetarhR1 (reverse primer: 5'-CCCAACAC-CAAGTCCACAG) verwendet. Zwar konnte mit der hohen Sensitivität der Nested-PCR das Vorhandensein von *Metarhizium* DNS nachgewiesen werden, allerdings war die Menge des amplifizierten DNS jeweils nur knapp an der Nachweisgrenze. Des Weiteren kam es aufgrund des relativ unspezifischen Primer-Paars zu positiven Amplifikationsergebnissen in den Kontrollgruppen. Aus diesem Grund wurde in diesem Versuch auf eine abschließende Quantifizierung in weiteren Pflanzenteilen verzichtet. Weitere Untersuchungen und Quantifizierungen der Pilz-DNS wurden allerdings im Arbeitspaket 5.1 durchgeführt.

#### 4.1.4 Mykotoxinbildung in verschiedenen Pflanzenteilen

Die von dem Pilz *M. brunneum* produzierten Mykotoxine gehören überwiegend der Gruppe der Destruixine an. In keiner der untersuchten Proben konnten Destruixine nachgewiesen werden. Für den Nachweis von Destruixinen wurde die AG Prof. Karlovsky (Molekulare Phytopathologie und Mykotoxin Forschung, Georg-August Universität) betraut, die sich an dem Protokoll nach Carpio et al. (2016)<sup>1</sup> orientiert hat.

## 4.2 Ergebnisse des Arbeitspaketes 2: Entwicklung von Anzuchtverfahren

### 4.2.1 Anzucht in Schüttelkultur

In diesem Arbeitspaket wurden verschiedene Medien für die selektive Produktion fungaler Biomasse des Isolates *M. brunneum* Bipesco5 gescreent und optimiert. Die hier dargestellten Ergebnisse umfassen die Optimierung bezüglich Medienkomposition, pH, Viskosität und Osmolarität für die Produktion von Blastosporen oder fein-dispersem Myzel und Hyphenfragmenten im Schüttelkolben.

#### Produktion von Blastosporen

In Tabelle 3 ist eine Auswahl verschiedener Medien zur Produktion von Blastosporen des endophytischen entomopathogenen Pilzisolates *M. brunneum* Bipesco5 zusammengestellt. Da Myzelpellets die Bildung von Blastosporen behindern, sind diese im Medium unerwünscht und die Kultivierung wurde dahingehend optimiert, die Myzelpelletproduktion zu verhindern. Die besten Ergebnisse für die selektive Produktion von Blastosporen wurden in Medienkomposition Nr. 14 erreicht. Dieses Medium besteht aus Glukose als Kohlenstoffquelle, ANiPept als Stickstoffquelle (preisgünstige hydrolysierte Reststoffe der Agrarindustrie) und PEG 200 zur Reduktion des  $a_w$ -Wertes des Mediums, wodurch die Bildung von Myzelpellets verhindert wird. Weiterhin findet durch die Zugabe von Natriumchlorid eine zusätzliche Verminderung des  $a_w$ -Wertes statt, die die selektive Bildung von Blastosporen fördert. Dabei ist es wichtig, dass das Medium mit einer Vorkultur mit fein-dispersem Myzel angeimpft wird, die bereits 48 h ohne Salzstress kultiviert wurde, da das Wachstum und die Sporenproduktion ansonsten stark inhibiert werden.

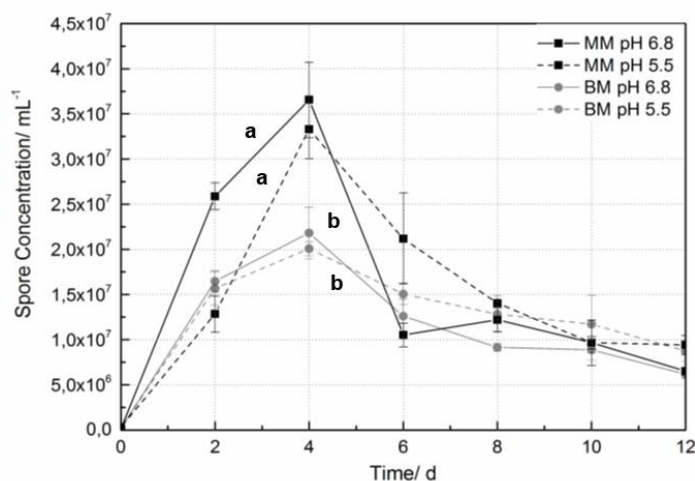
<sup>1</sup> Carpio A, Arroyo-Manzanares N, Ríos-Moreno A, et al (2016) Development of a QuEChERS-based extraction method for the determination of destruxins in potato plants by UHPLC-MS/MS. *Talanta* 146:815–822. doi: 10.1016/j.talanta.2015.06.008

**Tabelle 3.** Zusammenstellung verschiedener Medienkompositionen und deren Einfluss auf die Bildung von Submerssporen und unerwünschter Myzelpellets des Isolates *M. brunneum* Bipesco5

Nr.	Kohlenstoffquelle [%]	Stickstoffquelle [%]	Additiv [-]	Maximale Sporenkonzentration [mL <sup>-1</sup> ]	Myzelpellets* [-]		
<b>Chemisch definierte Medien</b>							
1	Glukose	5/8	KNO <sub>3</sub>	1	Basal Salze	2.8x10 <sup>5</sup> /3.2x10 <sup>5</sup>	++
2	Glukose	5/8	KNO <sub>3</sub>	1	Basal Salze, PEG 200	3.9x10 <sup>5</sup> /4.3x10 <sup>5</sup>	+
3	Glukose	5/8	KNO <sub>3</sub>	1	Basal Salze, Tween 80	3.5x10 <sup>5</sup> /3.7x10 <sup>5</sup>	+
4	Fruktose	5	KNO <sub>3</sub>	1	Basal Salze	2.5x10 <sup>5</sup>	++
5	Melasse	5	KNO <sub>3</sub>	1	Basal Salze	1.8x10 <sup>5</sup>	++
6	Dextrose	5	KNO <sub>3</sub>	1	Basal Salze	2.2x10 <sup>5</sup>	++
<b>Komplexmedien</b>							
7	Glukose	3	Hefeextrakt	3	-	6.8x10 <sup>5</sup>	+
8	Glukose	3	Hefeextrakt	3	PEG 200	3.8x10 <sup>6</sup>	-
9	Glukose	7.5	ANiPept	4	-	1.9x10 <sup>6</sup>	+
10	Glukose	7.5	ANiPept	4	PEG 200	3.9x10 <sup>6</sup>	-
11	Glukose	7.5	ANiPept	4	PEG 200, NaCl	2.1x10 <sup>7</sup>	-
12	Glukose	7.5	ANiPept	4	PEG 200, NaCl, Basal Salze	3.7x10 <sup>7</sup>	-

\* ++ Starke Pelletbildung; + mittlere Pelletbildung; - keine Pelletbildung

In **Abbildung 10** sind exemplarisch die Kultivierungsverläufe des Isolates *M. brunneum* Bipesco5 in verschiedenen Medien bei unterschiedlichen pH-Werten in Schüttelkolben gezeigt. Die Kultivierung, bei der die höchste Konzentration an Blastosporen mit 3,7x10<sup>7</sup> Sporen mL<sup>-1</sup> erreicht wurde (MM), entspricht in Tabelle 3 Medienkomposition Nr. 12. Geringere Konzentrationen von maximal 2,1x10<sup>7</sup> Sporen mL<sup>-1</sup> wurden mit Medienkomposition 11 erzielt (BM).



**Abbildung 10.** Einfluss von Medienkompositionen und des pH-Wertes auf die Produktion von Blastosporen des Pilzisolates *M. brunneum* Bipesco5. Signifikante Unterschiede der Behandlungen wurden mittels einer RM-ANOVA bzw. paarweisem Tukey-Post-hoc Test ( $p < 0,05$ ) ermittelt und sind durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet. So stieg die Blastosporenkonzentration über die Zeit signifikant an ( $F_{1,88}=84,2$ ;  $p < 0,05$ ) und variierte signifikant zwischen den verschiedenen Behandlungen ( $F_{3,88}=3,6$ ;  $p < 0,05$ ).

Abschließend kann festgehalten werden, dass nach einer kurzen Kultivierungsdauer von vier Tagen Konzentrationen von über 10<sup>7</sup> Sporen mL<sup>-1</sup> in Medien mit 7.5% Glukose, 4% ANiPept mit 7% PEG 200, 5% NaCl und zusätzlichen Basalsalzen erreicht werden konnten. Zwei unterschiedliche pH-Werte sorgten für keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die Produktion von Blastosporen (**Abbildung 10**). Da

*Metarhizium* spp. selten hohe Konzentrationen an Blastosporen mit min.  $10^9$  Sporen  $\text{mL}^{-1}$  bildet und auch in diesem Experiment die Konzentration nicht weiter erhöht werden konnte, wurde dazu übergegangen, die selektive Bildung von fein-dispersem Myzel zu untersuchen, um die Ausbeute an fungaler Biomasse und damit die Wirtschaftlichkeit des Produktionsprozesses zu verbessern.

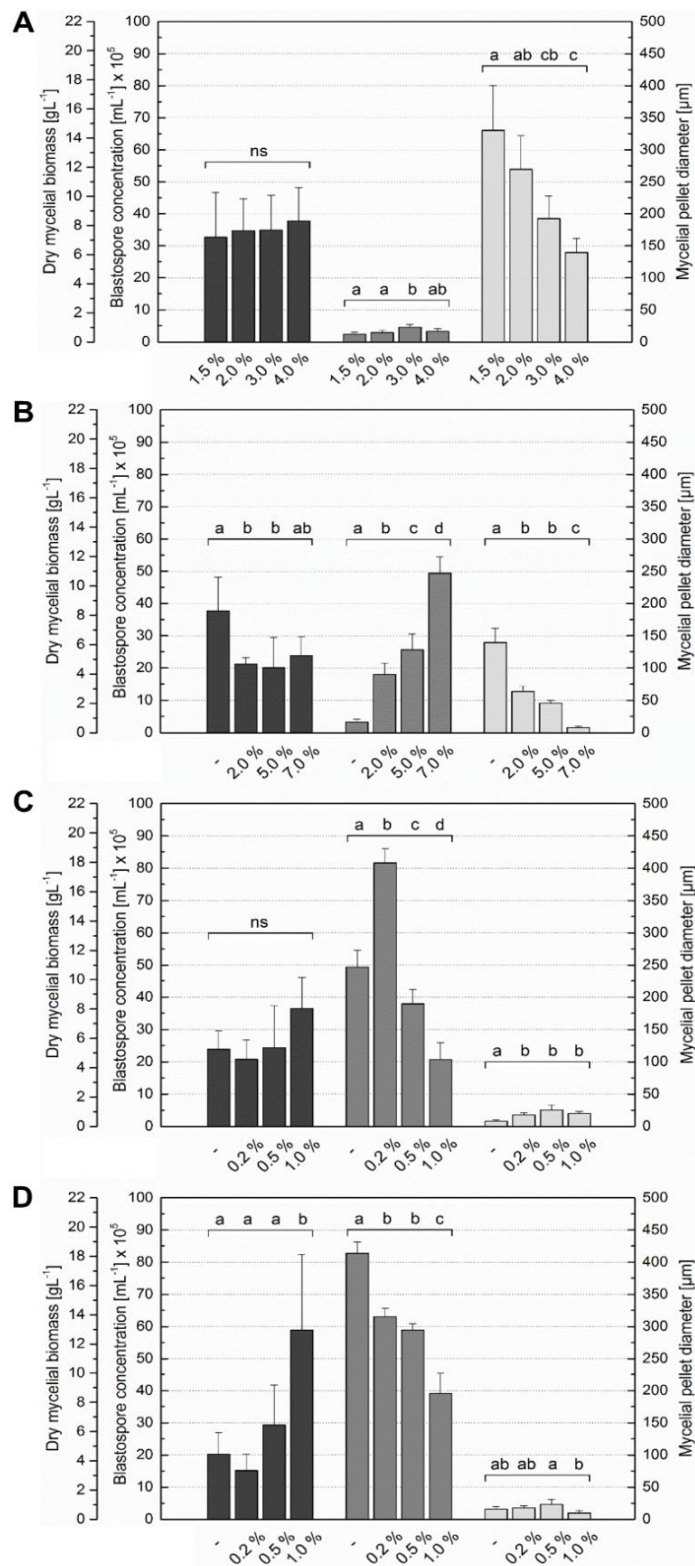
### Produktion von fein-dispersem Myzel

In einem weiteren Ansatz wurden Experimente zur selektiven Produktion von fein-dispersem Myzel von *M. brunneum* Bipesco5 im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt und optimiert (**Abbildung 11**). Im Gegensatz zu Myzelpellets liegen die Hyphen bei fein-dispersem Myzel fein verteilt vor, wodurch eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Substraten gewährleistet ist. Myzelpellets werden häufig während Flüssigkultivierungen von *Metarhizium* spp. gebildet. Hingegen tritt fein-dispersem Myzel i.d.R. nur unter bestimmten Bedingungen auf, wie z.B. bei osmotischem Stress.

In diesem Experiment wurde osmotischer Stress durch erhöhte Konzentrationen der Stickstoffquelle ANiPept und insbesondere durch PEG 200 induziert (**Tabelle 4**). Dies führte zwar zu einer signifikanten Verbesserung der Bildung von fein-dispersem Myzel ( $F_{3,16} = 105,90$ ;  $p < 0,001$ ), jedoch nahm gleichzeitig die Konzentration gebildeter Blastosporen signifikant von  $3,31 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  auf  $49,39 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  zu ( $F_{3,16} = 116,29$ ;  $p < 0,001$ , **Abbildung 11B**). Da bekannt ist, dass für die Bildung von Blastosporen hohe Konzentrationen an Gelöstsauerstoff benötigt werden, wurde eine Erhöhung der Medienviskosität angestrebt, da dadurch der Sauerstoffeintrag vermindert wird und somit die Bildung von Blastosporen inhibiert werden müsste. Durch den Zusatz von 1% Kartoffelstärke nahm die Medienviskosität signifikant zu ( $F_{3,16} = 24,99$ ;  $p < 0,001$ , **Tabelle 4**) und dies korrelierte mit einer signifikanten Reduktion der Blastosporenkonzentration von  $49,4 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  auf  $20,7 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  ( $F_{3,16} = 140,41$ ;  $p < 0,001$ , **Abbildung 11C**), ohne dass die Bildung von fein-dispersem Myzel beeinträchtigt wurde.

Bisherige Kulturen wurden mit  $10^6$  Aerokonidien  $\text{mL}^{-1}$  beimpft. Für Fermentationen mit großen Volumina werden jedoch größere Inokula benötigt, weshalb in der Regel vegetative Vorkulturen eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde das Medium mit der zugesetzten Kartoffelstärke in einem anschließenden Versuch mit 5% einer vegetativen Vorkultur bestehend aus Blastosporen und fein-dispersem Myzel beimpft. Auch unter diesen Bedingungen konnte eine selektive Bildung von fein-dispersem Myzel erreicht werden mit maximalen Trockenmyzelbiomassewerten von  $13,0 \text{ gL}^{-1}$  nach 48h (**Abbildung 11D**).

■ Dry mycelial biomass ■ Blastospore concentration ■ Mycelial pellet diameter



**Abbildung 11.** Einfluss von Medienzusätzen und deren Konzentrationen auf die Bildung von *Metarhizium brunneum* Bipesco5 Trockenmyzelbiomasse, Blastosporen und Myzelpelletdurchmesser. (A): 7,5% Glukose mit verschiedenen ANiPept-Konzentrationen (1,5%; 2,0%; 3,0%; 4,0%), (B): 7,5% Glukose, 4,0% ANiPept mit verschiedenen PEG 200-Konzentrationen (0%; 2,0%; 5,0%; 7,0%), (C): 7,5% Glukose, 4,0% ANiPept, 7,0% PEG 200 mit verschiedenen Kartoffelstärke-Konzentrationen (0%; 0,2%; 0,5%; 1,0%), (D): wie (C), aber mit vegetativer Vorkultur als Inokulum anstatt von Aerokonidien. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n = 5$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung); ns: nicht signifikant; publiziert in (Krell et al., 2018c).

**Tabelle 4.** Einfluss von Medienzusätzen und Konzentrationen auf die dynamische Viskosität und Osmolarität von Mediensuspensionen. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb der Kultivierungsschritte zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=5$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung). ns: nicht signifikant; publiziert in (Krell et al., 2018c).

Inokulum	Medienbestandteil	Konzentration [%]	Dynamische Viskosität [mPas]	Osmolarität [osmol]
Aerokonidien	ANiPept	1.5	2.88 $\pm$ 0.54	0.339 $\pm$ 0.004
		2.0	2.81 $\pm$ 0.09	0.358 $\pm$ 0.007
		3.0	2.82 $\pm$ 0.22	0.365 $\pm$ 0.004
		4.0	2.86 $\pm$ 0.21	0.386 $\pm$ 0.003
Aerokonidien	PEG	0	2.86 $\pm$ 0.21	0.386 $\pm$ 0.003
		2.0	2.75 $\pm$ 0.27	0.506 $\pm$ 0.006
		5.0	3.07 $\pm$ 0.64	0.749 $\pm$ 0.006
		7.0	3.17 $\pm$ 0.14	0.848 $\pm$ 0.006
Aerokonidien	Stärke	0	3.17 $\pm$ 0.14	0.848 $\pm$ 0.006
		0.2	3.21 $\pm$ 0.26	0.851 $\pm$ 0.008
		0.5	3.40 $\pm$ 0.66	0.909 $\pm$ 0.004
		1.0	5.08 $\pm$ 0.38	0.921 $\pm$ 0.005
vegetative Prekultur	Stärke	0	3.15 $\pm$ 0.40	0.862 $\pm$ 0.005
		0.2	3.30 $\pm$ 0.55	0.895 $\pm$ 0.003
		0.5	3.63 $\pm$ 0.35	0.923 $\pm$ 0.004
		1.0	5.10 $\pm$ 0.28	0.973 $\pm$ 0.003

Zusammenfassend lässt sich anhand der hier erreichten Ergebnisse feststellen, dass in einem Medium mit 7,5% Glukose, 4% ANiPept, 7% PEG 200 und 1% Kartoffelstärke eine maximale Ausbeute von fein-disperser Myzelbiomasse des Pilzisolates *M. brunneum* Bipesco5 erreicht wurde.

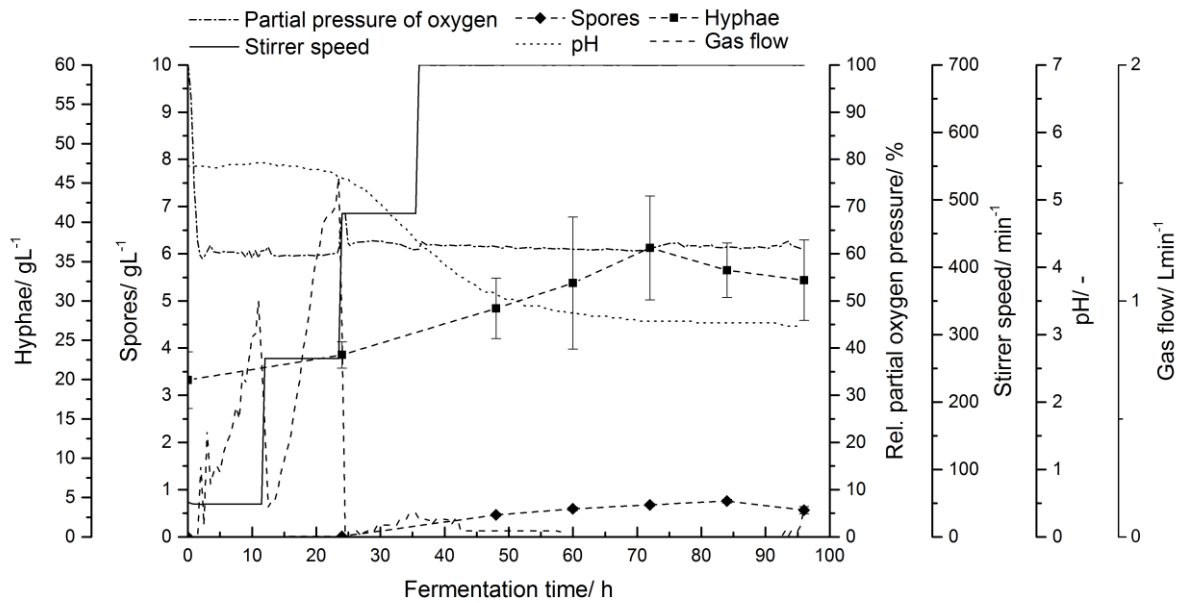
#### 4.2.2 Scale-up der Anzucht

Die in den Experimenten zur Anzucht in Schüttelkultur gesammelten Erkenntnisse hinsichtlich der Kultivierungsbedingungen für die selektive Bildung von fein-dispersem Myzel dienten als Basis für das Scale-up in 2L-Rührkesselreaktoren. Die Vorteile von Rührkesselreaktoren gegenüber konventionellen Schüttelkolben sind, neben der Tatsache, dass eine ausreichende Menge an aktiver Biomasse für Freilandexperimente produziert werden kann, insbesondere die Sensorik zur Überwachung von Prozessparametern, wie pH, Temperatur, Rührerdrehzahl und Gelöstsauerstoffkonzentration ( $rpO_2$ ) sowie die präzise Regelungsmöglichkeit dieser Parameter.

In diesem Experiment wurde nun gezielt der Frage nachgegangen, ob durch eine Verringerung der Gelöstsauerstoffkonzentration die selektive Bildung von fein-dispersem Myzel gefördert werden kann. Um im späteren Formulierungsprozess die koloniebildenden Einheiten (cfu) bestimmen zu können, wurde zudem die Bildung von Hyphenfragmenten durch einen erhöhten Scherstress angestrebt.

Im Folgenden (**Abbildung 12** bis **Abbildung 14**) werden die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses verschiedener Gelöstsauerstoffkonzentrationen auf die selektive Bildung von Hyphenfragmenten des endophytischen entomopathogenen Pilzes *M. brunneum* Bipesco5 gezeigt.

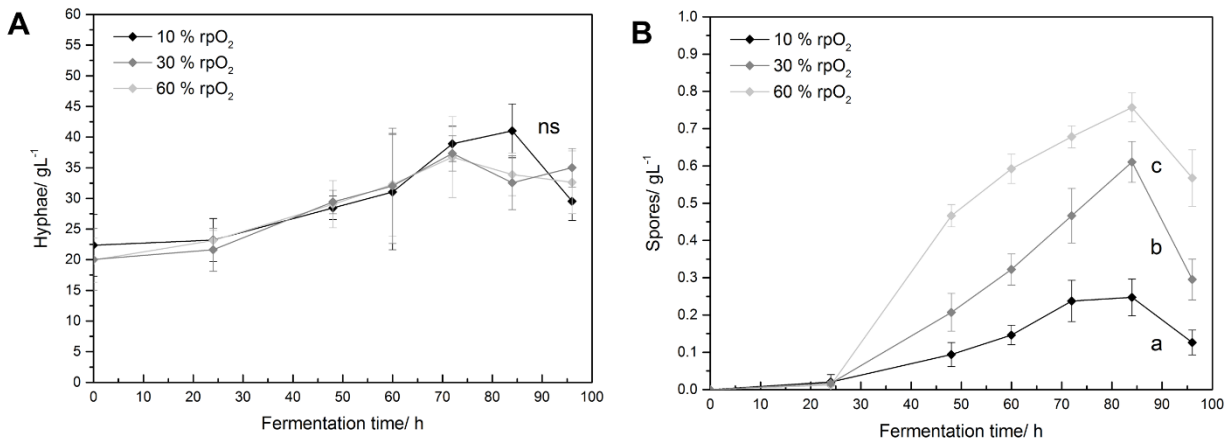




**Abbildung 12.** Beispielfermentation zu der Untersuchung des Einflusses der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $rpO_2 = 60\%$ ) auf die selektive Bildung von *M. brunneum* Bipesco5 Hyphen im 2L-Rührkesselreaktor ( $n = 4$ ).

Die in **Abbildung 12** dargestellte Fermentation zeigt einen beispielhaften Verlauf einer Kultivierung von *M. brunneum* Bipesco5 im 2L-Rührkesselreaktor mit 60% Gelöstsauerstoffkonzentration. Dabei wurden neben der Bildung der Biomasse (Hyphen und Blastosporen), die Rührerdrehzahl, der pH-Wert und die Begasung aufgezeichnet. Für die Rührerdrehzahl wurde ein Stufensystem für alle Fermentationen mit verschiedenen Gelöstsauerstoffkonzentrationen verwendet, um in allen Fermentationen vergleichbare Scherkräfte des Rührers zu erzeugen. Zusätzlich war aus Vorexperimenten bekannt, dass eine Rührerdrehzahl von 700 rpm förderlich für die Bildung viabler Wachstumseinheiten ist.

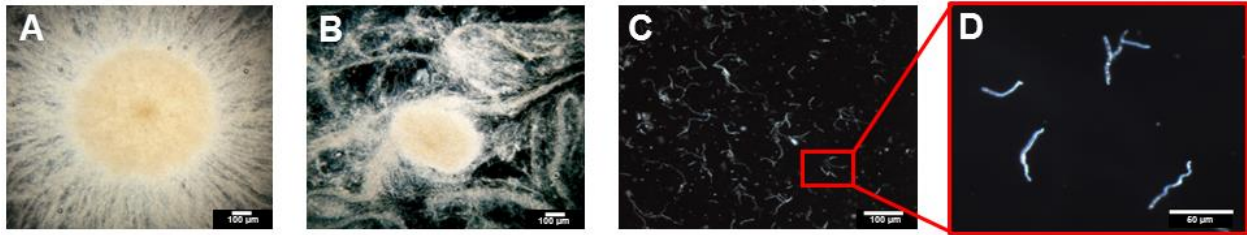
In der folgenden Grafik, **Abbildung 13**, wird der Einfluss verschiedener Gelöstsauerstoffkonzentrationen von 10%, 30% und 60% auf die Bildung von Hyphen und Blastosporen verglichen.



**Abbildung 13.** Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration auf die Bildung von *M. brunneum* Bipesco5 Biomasse im 2L-Rührkesselreaktor ( $n = 4$ ). (A): Hyphen, (B): Blastosporen. Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine RM-ANOVA mit  $p < 0,05$ ; ns: nicht signifikant.

Sowohl die Hyphenbiomasse (**Abbildung 13A**) als auch die Sporenkonzentration (**Abbildung 13B**) nahmen über die Zeit signifikant zu (Hyphen:  $F_{6,18} = 12,8$ ;  $p < 0,001$ ; Sporen:  $F_{6,18} = 298,8$ ;  $p < 0,001$ ). Dabei war die Zunahme der Hyphenbiomasse unabhängig von der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $F_{2,6} = 0,3$ ;  $p > 0,05$ ), jedoch gab es einen signifikanten Einfluss der Sauerstoffkonzentration auf die Bildung von Blastosporen ( $F_{2,6} = 437,6$ ;  $p < 0,001$ ). Dies deutet darauf hin, dass durch eine Reduktion der Gelöstsauerstoffkonzentration die selektive Bildung von Hyphen begünstigt wurde.

Zusätzlich zu der Untersuchung des Einflusses der Gelöstsauerstoffkonzentration auf die selektive Bildung von Hyphen wurde der Einfluss an gelöstem Sauerstoff auf die Pilzmorphologie betrachtet (**Abbildung 14**).



**Abbildung 14.** Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration auf die Morphologie von *M. brunneum* Bipesco5 im 2L-Rührkesselreaktor. (A):  $rpO_2 = 60\%$ , (B):  $rpO_2 = 30\%$ , (C):  $rpO_2 = 10\%$ , Verdünnung 1:10, (D):  $rpO_2 = 10\%$ , Verdünnung 1:10 mit vergrößertem Ausschnitt aus C.

Anhand von **Abbildung 14** wird deutlich, dass die Konzentration an gelöstem Sauerstoff einen starken Einfluss auf die Morphologie von *M. brunneum* Bipesco5 hatte. Je höher die Gelöstsauerstoffkonzentration, desto stärker war die Aggregation von Hyphen, was in Pelletbildung resultierte. Die Bildung von Hyphenfragmenten wurde erst bei einer Sauerstoffkonzentration von 10% unter Berücksichtigung weiterer Fermentationsparameter erreicht.

Zusammenfassend konnte mit diesem Experiment die Hypothese verifiziert werden, dass durch eine Verringerung der Gelöstsauerstoffkonzentration die Bildung von fein-dispersem Myzel und Hyphenfragmenten gefördert und eine Aggregation von Hyphen zu Pellets inhibiert werden kann. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die selektive Bildung von Hyphen durch Unterdrückung der Blastosporenbildung bei niedrigen Gelöstsauerstoffkonzentrationen erreicht werden kann. Dies geschah ohne Einbußen bei der Hyphenbiomasse.

### 4.3 Ergebnisse des Arbeitspaketes 3: Wirksamkeitstests (Labor und Gewächshaus)

#### 4.3.1 Wirksamkeitstests an Zielorganismen im Labor

Die von der FH Bielefeld entwickelten und bereitgestellten Formulierungen des *M. brunneum* Isolates Bipesco5 wurden in einem „Petrischalenversuch“ auf ihre Wirksamkeit gegenüber *T. absoluta* getestet. Zwei Sporentypen, Aerokonidien und Blastosporen, sowie Pilzmyzel wurden getestet. Ziel war es zu untersuchen, ob sowohl die Formulierung als auch die vorliegende Form des entomopathogenen Pilzes Einfluss auf die Entwicklung von *T. absoluta* hat (**Tabelle 5**).

**Tabelle 5.** Kürzel, sowie die genaue Beschreibung der in dem Versuch verwendeten Behandlungen.

Abkürzung	Behandlung
C	Kontrolle
CL	Kontrolle mit „leeren“ Kapseln
KAF	Kapseln mit Aerokonidien (feucht)
KAT	Kapseln mit Aerokonidien (getrocknet)
KMF	Kapseln mit Myzel (feucht)
KMT	Kapseln mit Myzel (getrocknet)
KSF	Kapseln mit Blastosporen (feucht)
KST	Kapseln mit Blastosporen (getrocknet)
UMF	Unformuliertes Pilzmyzel (feucht)

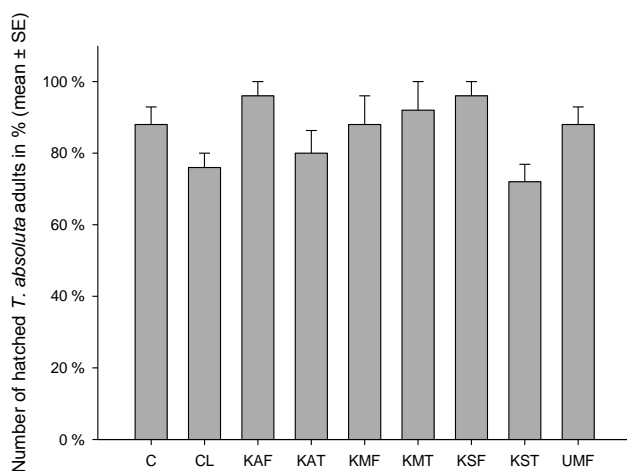
Hierfür wurden abgeschnittene Tomatenblätter mit Hilfe einer Nährlösung zur erneuten Wurzelbildung angeregt (**Abbildung 15A**). Anschließend wurden die in **Tabelle 5** aufgeführten Behandlungen in je fünf Petrischalen appliziert (**Abbildung 15B**). Nach der vollständigen Durchwurzelung der Erde (3:1 Fruhstorfer Erde/Sand) und der Kapseln (**Abbildung 15C**) wurden an jedes Blatt fünf L<sub>1</sub> *T. absoluta* Larven angesetzt und bis zum Schlupf der Adulten an diesen belassen. Bonitiert wurden die geschlüpften adulten Motten, sowie die von den Larven gefressene Blattfläche.



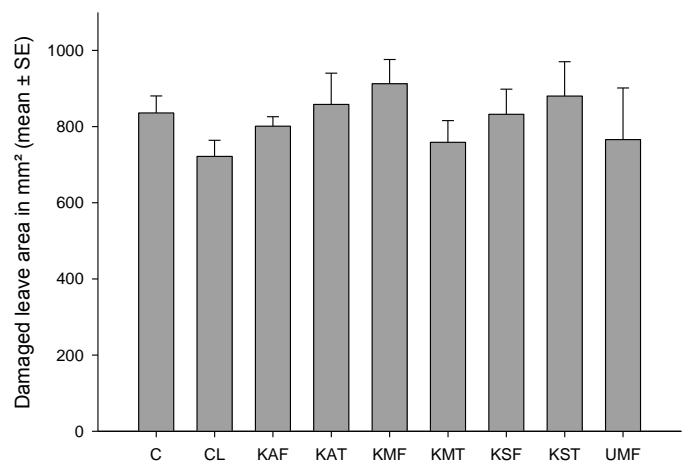
**Abbildung 15.** (A): Tomatenblatt mit neu ausgebildeter Wurzel, (B): Applikation der Wirkstoffkapseln in der Petrischale, (C): vollständig ausgebildetes Wurzelsystem in der Petrischale mit Kapseln.

In vorherigen Versuchen konnte eine gute Kolonisierung der Pflanze durch das Isolat Bipesco5 nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass die Pflanzen durch das Isolat besiedelt worden sind. Daten zur tatsächlichen Kolonisierung der Pflanze konnten aufgrund des Versuchsdesigns nicht erhoben werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Anzahl der sich entwickelnden Motten zwischen den untersuchten Behandlungen signifikant unterscheiden (Kruskal-Wallis-Test  $H_{8,45} = 15,86$ ;  $p < 0,05$ ). Allerdings sind in keiner der Behandlungen signifikant weniger Adulte geschlüpft als in den beiden Kontrollbehandlungen (C und CL) (**Abbildung 16**). Ebenso wenig konnte die geschädigte Blattfläche durch eine der Behandlungen signifikant gesenkt werden (ANOVA  $F_{8,36} = 0,70$ ;  $P = 0,69$ ) (**Abbildung 17**).

Nach einer Vielzahl von Wirksamkeitstests gegen *T. absoluta* zeigt sich, dass Bipesco5 kein wirkungsvolles Isolat für den Einsatz gegen *T. absoluta* zu sein scheint. Weitere Versuche mit diesem Isolat an Insekten wurden bis auf weiteres ausgesetzt. Dennoch soll versucht werden andere, effektivere Isolate zu finden (siehe Arbeitspaket 1.1).



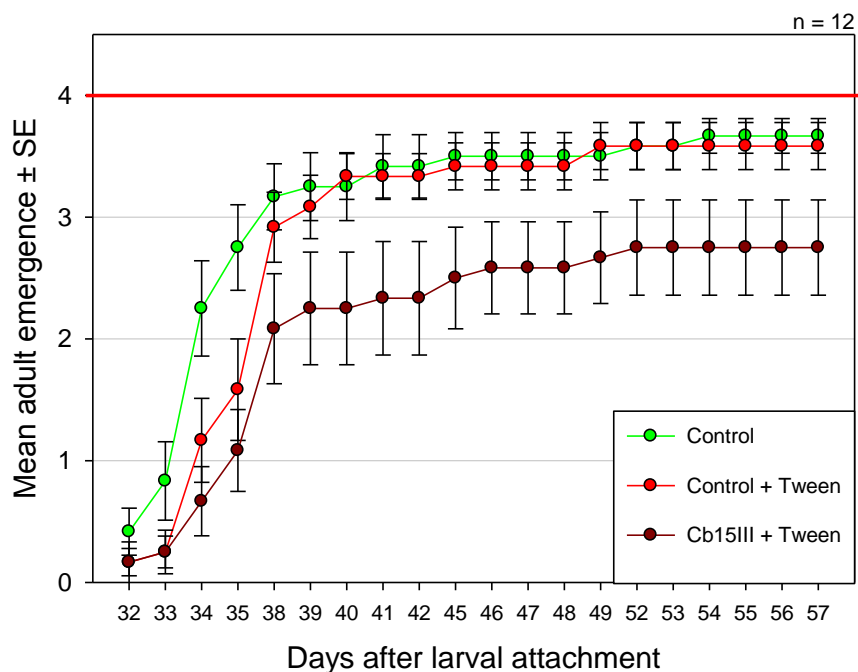
**Abbildung 16.** Durchschnittlich geschlüpfte adulte Motten in %  $\pm$  Standardfehler. Kruskal-Wallis-Test  $H_{8,45} = 15,86$ ;  $p < 0,05$ .



**Abbildung 17.** Durchschnittliche gefressene Blattfläche in mm²  $\pm$  Standardfehler. ANOVA  $F_{8,36} = 0,70$ ;  $p = 0,69$ .

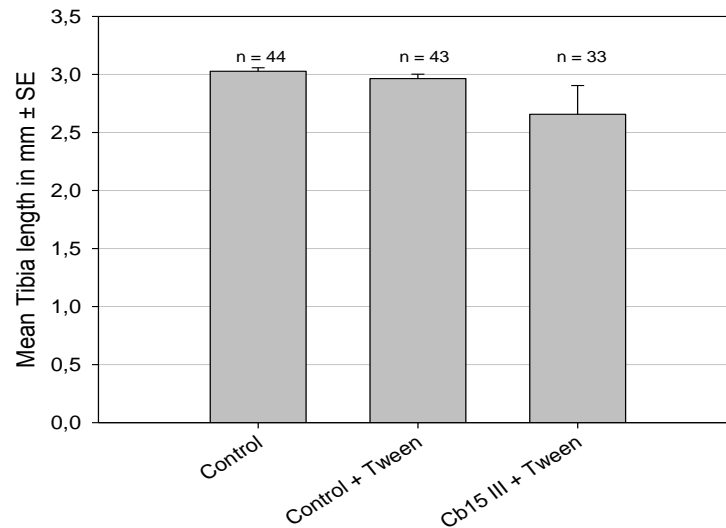
#### 4.3.2 Wirksamkeitstests an Zielorganismen im Gewächshaus

Kartoffelknollen und Pflanzen haben sich in Vorversuchen als guter Wirt für das *M. brunneum* Isolat Cb15 III erwiesen und wurden während des Berichtszeitraums im Gewächshaus getestet. Da die Drahtwurmzucht während dieser Zeit nicht ausreichend Tiere zur Verfügung stellen konnte, wurde der Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) als zweiter Modellorganismus an Kartoffeln ausgewählt. Für den Versuch wurden je 12 vorgekeimte Kartoffelknollen in eine Tween 80 0,1% Lösung entweder mit (= Cb15 III + Tween) oder ohne Sporensuspension ( $1 \times 10^7$  Aerokonidien/ mL) (= Kontrolle + Tween) für zehn Sekunden getaucht. Alle Knollen wurden anschließend in Töpfe gepflanzt. Eine Kontrollbehandlung wurde direkt in die Pflanztöpfe gelegt (Kontrolle). Nach Erreichen des BBCH 19 Stadiums wurden jeweils 4 neonate Kartoffelkäferlarven an die Kartoffelpflanzen angesetzt. Nach der Verpuppung der Larven wurden die geschlüpften adulten Käfer gesammelt, gezählt und die Länge der Tibia gemessen. Außerdem wurden die Pflanzentrockenmasse und der (Knollen-) Ertrag bestimmt. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass bei Pflanzen, die mit *M. brunneum* behandelt wurden, signifikant weniger Adulte geschlüpft sind, als in der unbehandelten Kontrolle (RM-ANOVA  $F_{12,11} = 2,89$ ,  $p < 0,05$ ) (Abbildung 18).



**Abbildung 18.** Anzahl der durchschnittlich geschlüpften adulten Kartoffelkäfer  $\pm$  Standardfehler nach Tagen nach dem Ansetzen der Larven. Die horizontale rote Linie gibt die Anzahl, der zu Versuchsbeginn angesetzten Larven, an.

Zusätzlich weisen die Adulten, dessen Larven an behandelten Pflanzen gefressen hatten, eine geringe Länge der Tibia auf (Abbildung 19). Die Länge der Tibia wird als „Fitnessparameter“ gewertet und lässt somit Rückschlüsse auf die Qualität der Nahrungsquelle zu. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass sich die Qualität der Pflanzen als Nahrungsquelle für die Larven durch die Behandlung mit *M. brunneum* verschlechtert haben könnte. Signifikante Auswirkungen der Behandlungen auf die Pflanzentrockenmasse sowie den Knollenertrag konnten nicht beobachtet werden.



**Abbildung 19.** Durchschnittliche Tibia-Länge der re-isolierten adulten Käfern in mm ± Standardfehler. ANOVA  $F_{2,33} = 1,65$ ;  $p = 0,21$ .

Die Ergebnisse aus diesem Versuch machen deutlich, dass eine Knollenbehandlung zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers durchaus in Betracht gezogen werden sollte.

#### 4.4 Ergebnisse des Arbeitspaketes: Entwicklung technischer Formulierungen

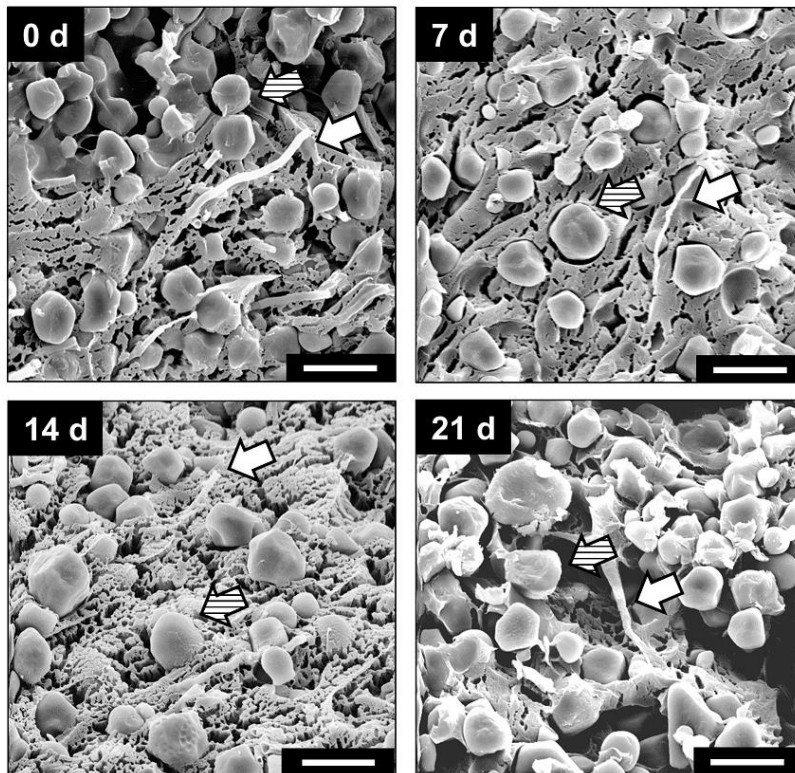
Während der Projektlaufzeit wurden verschiedene Formulierungen entwickelt, die als Sprays, Saatgutbehandlung oder für die Ausbringung als Kapseln geeignet sind. Für größere Pilzmorphologien, wie Hyphenfragmente sowie fein-disperses Myzel, die als aktive Komponente aufgrund der hohen Ausbeute in der Flüssigkultivierung gewählt wurden, eignen sich insbesondere Kapseln für die Bodenapplikation. Darüber hinaus war es vorrangig das Ziel bodenbürtige Schadinsekten, wie Drahtwürmer an Kartoffelpflanzen, mit Hilfe des Nutzpilzes *M. brunneum* Bipesco5 oder *M. brunneum* Cb15 zu kontrollieren. Da in der wissenschaftlichen Community noch Unklarheiten darüber bestehen, ob eine Oberflächenanwendung an Blättern mit endophytischen entomopathogenen Pilzen das Wurzelsystem und Knollen vor Schadinsekten im Boden schützen kann, ist es zudem sinnvoll, die Nutzpilze dort anzuwenden, wo das Schadinsekt mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auftritt. Das Ziel des Arbeitspaketes 4 war die Entwicklung von technischen Formulierungen maßgeschneidert für die in Arbeitspaket 2 angezogenen Hyphenfragmente oder fein-disperses Myzel. Die entwickelten Formulierungen wurden in Arbeitspaket 5 sowie Arbeitspaket 6 eingesetzt.

##### 4.4.1 Entwicklung von feuchten Formulierungen

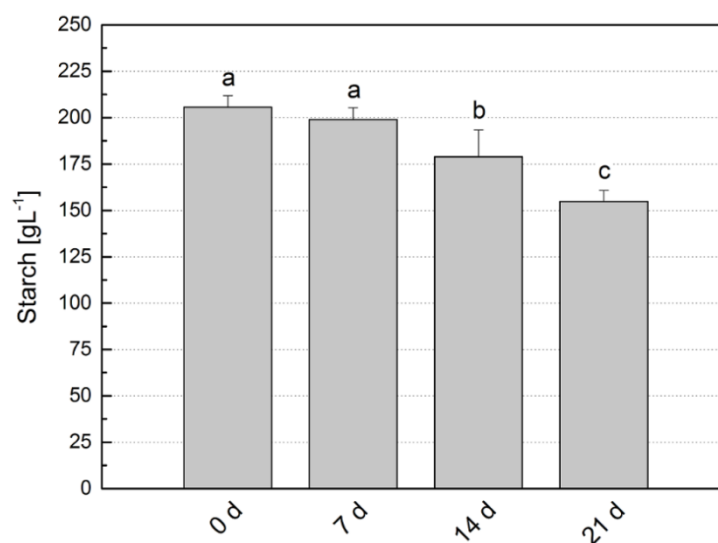
###### Calcium-Alginatkapseln

Für die Verkapselung von Hyphenfragmenten des Nutzpilzes *M. brunneum* Bipesco5 wurden Kapseln basierend auf Calcium-Alginat gewählt. Für die Formulierung wurden 2% Calcium-Alginat (w/w), 20% Maisstärke (w/w) sowie 1,5% Hyphenfragmente (w/w) kombiniert, in eine 2%ige Calciumchloridlösung (w/v) getropft und für 20 min ionotropisch geliert. Die Kapseln wurden anschließend mit Reinstwasser gewaschen.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob sich Maisstärke als Substrat für den verkapselten Pilz eignet. Zu diesem Zweck wurden feuchte Kapseln über 21 Tage bei Raumtemperatur auf Wasseragar inkubiert und der Stärkeabbau mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) (**Abbildung 20**) sowie eines biochemischen Assays (**Abbildung 21**) analysiert.



**Abbildung 20.** REM-Aufnahmen der inneren Strukturen in feuchten Calcium-Alginatkapseln mit eingeschlossenen *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmenten nach einer Inkubationszeit von 0, 7, 14 und 21 Tagen (Maßstab: 20 µm, Vergrößerung: 1000x). Gestreifte Pfeile zeigen Stärkekörner; weiße Pfeile zeigen Hyphen die gleichmäßig in die Calcium-Alginat-Matrix eingebettet sind; publiziert in (Krell et al., 2018c).



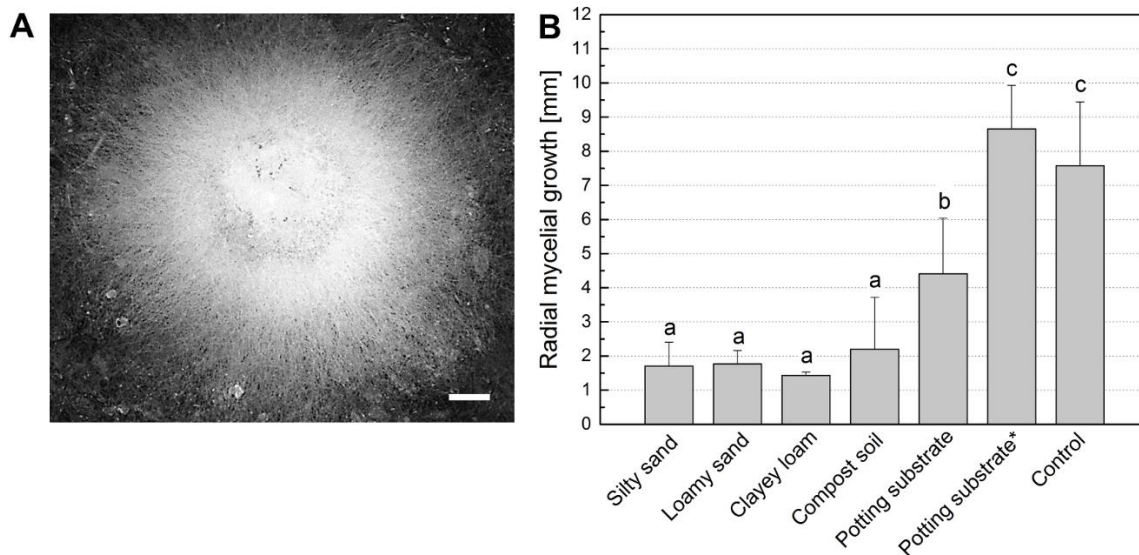
**Abbildung 21.** Stärkeabbau durch verkapselte *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmente in feuchten Calcium-Alginatkapseln über eine Inkubationszeit von 0, 7, 14 und 21 Tagen. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=5$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung); publiziert in (Krell et al., 2018c).

In **Abbildung 20** wird deutlich, dass über die Zeit und insbesondere nach 21 Tagen Inkubation vermehrt Hohlräume in den Kapseln gebildet wurden. Diese können zum einen durch den Stärkeabbau entstanden sein, zum anderen aber auch durch das Wachstum des Pilzes, durch das die Kapsel auseinandergedrückt wurde. Zur Verifizierung des Stärkeabbaus in den Kapseln, wurde zusätzlich ein Assay angewandt, durch den die Stärkekonzentration bestimmt werden kann (**Abbildung 21**). Über 21 Tage nahm die Stärkekonzentration mit 24,8% signifikant ab ( $F_{3,9} = 141,46$ ;  $p < 0,001$ ). Hiermit konnte gezeigt werden, dass sich Maisstärke als Substrat für *M. brunneum* Isolat Bipesco5 eignet.

Da es für die Anwendung von endophytischen entomopathogenen Nutzpilzen mit dem Ziel der endophytischen Etablierung im Pflanzengewebe unerlässlich ist, dass der verkapselte Pilz auf

unsterilen Böden mit hoher mikrobieller Aktivität aus den Kapseln auswächst, wurden die produzierten Calcium-Alginatkapseln auf unterschiedlichen Böden ausgelegt und das Wachstum des Pilzes von den Kapseln untersucht (**Abbildung 22**). Um ein möglichst großes Bodenspektrum mit dem verkapselten Pilz bedienen zu können, wurde ein Auswuchs des Pilzes auf allen Bodentypen angestrebt.

In diesem Versuch wurde angenommen, dass der Auswuchs des verkapselten Pilzes in Abhängigkeit der Bodeneigenschaften stattfindet. Bei den verwendeten Böden handelt es sich zum einen um ein Zierpflanzensubstrat (Fruhstorfer Erde Typ T mit 10% Sand) und zum anderen um Standardböden (LUFA Speyer), die sich hauptsächlich hinsichtlich der Gehalte an organischer Substanz, der Korngrößenzusammensetzung und des pH-Wertes unterscheiden. Das verwendete Zierpflanzensubstrat ist eine nährstoffreiche Erde, die mit Ton und Torf supplementiert wurde. Bei den Standardböden handelt es sich um Schlicksand, lehmigen Sand, sowie tonigen Lehm Boden, der letztere mit der höchsten Nährstoffkonzentration unter den verwendeten Standardböden. Geringe Unterschiede sind in der Korngrößenverteilung und im pH-Wert zu finden. Bei der Untersuchung des Auswuchses des verkapselten Pilzes auf verschiedenen Böden wurde nun hauptsächlich ein Nährstoffeinfluss des Bodens erwartet, wobei angenommen wurde, dass der Auswuchs des Pilzes mit höherer Nährstoffkonzentration des Bodens zunimmt, da dem Pilz zusätzliche Nährstoffe zur Verfügung standen. Weitere Einflüsse auf das Wachstum durch die bodenbürtige mikrobielle Gemeinschaft sind möglich, wurden allerdings in diesem Experiment nicht näher untersucht.



**Abbildung 22.** Einfluss der Kapselumgebung auf den Auswuchs von *M. brunneum* Bipesco5 aus feuchten Calcium-Alginatkapseln nach 21 Tagen. (A): Exemplarisches Bild einer Kapsel mit Myzelwachstum nach Inkubation auf unsterilem Zierpflanzensubstrat (Maßstab: 1 mm, Vergrößerung: 20x), (B): radiales Myzelwachstum von Kapseln auf drei standardisierten Böden (Schlicksand, lehmiger Sand, toniger Lehm Boden), Kompostboden, Zierpflanzensubstrat (\*sterilisiert) und Kontrollsubstrat (Wasseragar). Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung): publiziert in (Krell et al., 2018c).

Wie anhand von **Abbildung 22** deutlich wird, hatte die Kapselumgebung einen signifikanten Einfluss auf das Auswuchsverhalten des verkapselten *M. brunneum* Bipesco5 ( $F_{6,25} = 67,75$ ;  $p < 0,001$ ). Auf den standardisierten Böden sowie dem Kompostboden war der Auswuchs des Pilzes signifikant reduziert verglichen zu dem Zierpflanzensubstrat und der Kontrolle (Wasseragar). Das beste Wachstum des Pilzes wurde in auf sterilem Zierpflanzensubstrat bestimmt mit 8,7 mm nach 21 Tagen. Mit diesem Experiment wurde also gezeigt, dass die entwickelte Formulierung eine günstige Umgebung für den Pilz schaffte, durch die es dem Pilz ermöglicht wurde, auf allen untersuchten Böden auszuwachsen. Darüber hinaus scheint die mikrobielle Aktivität des Bodens einen größeren Einfluss auf das Auswuchsverhalten des Pilzes gehabt zu haben als die Nährstoffzusammensetzung des Bodens.

#### Calcium-Pektinamidkapseln

Für den Nutzpilz *M. brunneum* Cb15 wurden Pektinamid-basierte Kapseln entwickelt, um die Penetration des Pilzes in Pflanzengewebe zu unterstützen. Für die Formulierung wurden 2% Pektinamid (w/w), 20% Maisstärke (w/w) sowie 1,5% fein-disperses Myzel (w/w) kombiniert. Um den Einfluss

verschiedener Formulierungsadditive auf die Bildung von Cellulase als Penetrationshilfsmittel, sowie auf das Wachstum des Pilzes aus der Kapsel und die endophytische Kolonisierung von Kartoffelpflanzen zu untersuchen, wurden 2% Cellulose und 2% inaktivierte Bäckerhefe zu der Formulierung supplementiert. Um eine hohe Cellulaseaktivität zu erreichen, wurde zu einer Formulierung zusätzlich  $1 \text{ Ug}^{-1}$  Cellulase hinzugegeben. Die Suspensionen wurden in eine 2%ige Calciumchloridlösung (w/v) getropft, für 20 min ionotropisch geliert und die resultierenden Kapseln mit Reinstwasser gewaschen.

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob durch den Zusatz von Cellulose zu der Formulierung die Sekretion aktiver Cellulase durch den verkapselten Pilz erreicht werden kann. Dazu wurden feuchte Kapseln auf Wasseragar für 28 Tage bei Raumtemperatur ausgelegt und die Cellulaseaktivität mit Hilfe eines biochemischen Assays quantifiziert (**Abbildung 23**).

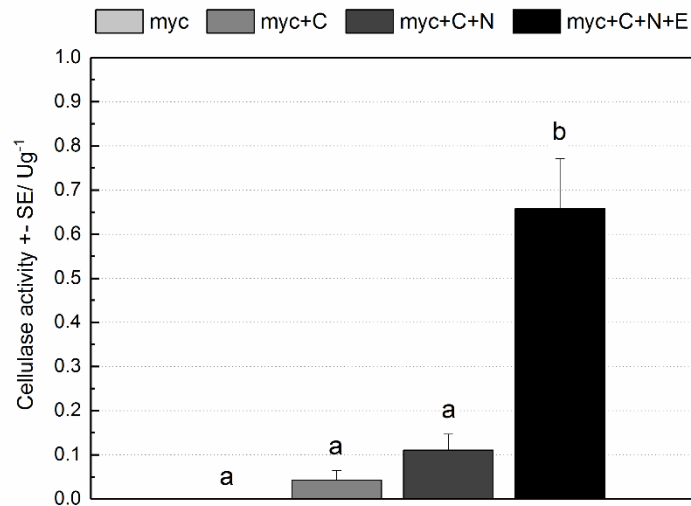
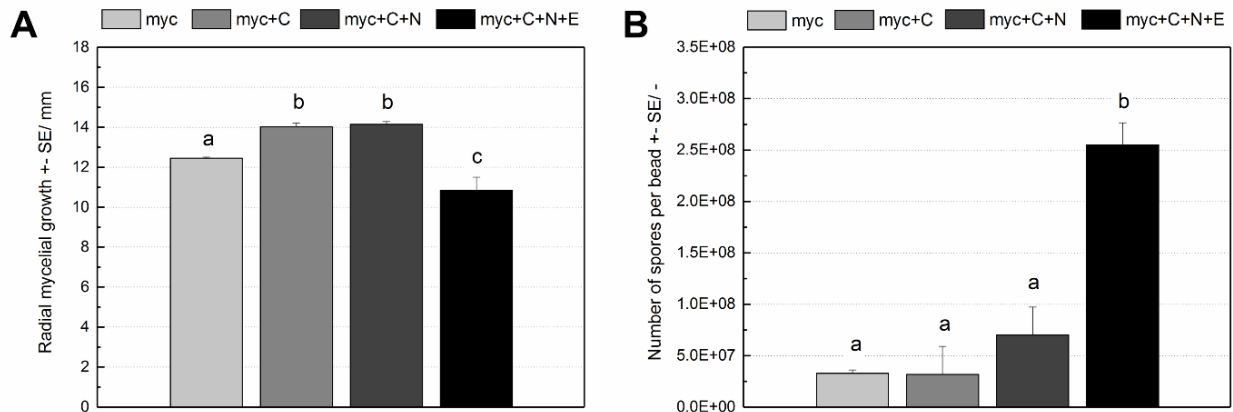


Abbildung 23. Einfluss der Formulierungsadditive Cellulose (C), inaktivierte Bäckerhefe (N) und Cellulase (E) auf die Cellulaseaktivität von Kapseln mit amidiertem Pektin, Stärke und *M. brunneum* Cb15 Myzel (myc) nach 28 Tagen. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf einen Kruskal-Wallis-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=8$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018b).

Wie in **Abbildung 23** verdeutlicht wurde, konnte Cellulaseaktivität in Kapseln mit Cellulose erfolgreich bestimmt werden, jedoch wurde kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Durch den Zusatz von Cellulase stieg die Cellulaseaktivität signifikant an und erreichte einen Wert von  $0,66 \pm 0,11 \text{ Ug}^{-1}$  ( $\chi^2 = 23,36$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ). Die Verkapselungseffizienz für die supplementierte Cellulase betrug  $59,6 \pm 5,4\%$  ( $n = 8$ ). Mit diesem Experiment wurde zudem gezeigt werden, dass *M. brunneum* in der Lage ist, aktive Cellulase in Gegenwart von co-verkapselter Cellulose zu sekretieren.

Im Folgenden wurde nun untersucht, wie sich die Formulierungsadditive Cellulose, inaktivierte Bäckerhefe und Cellulase auf das Wachstum von verkapseltem *M. brunneum* Cb15 auswirken. Dazu wurden die Kapseln für 28 Tage auf Wasseragar bei Raumtemperatur inkubiert und das Myzelwachstum sowie die Sporenbildung bestimmt (**Abbildung 24**).





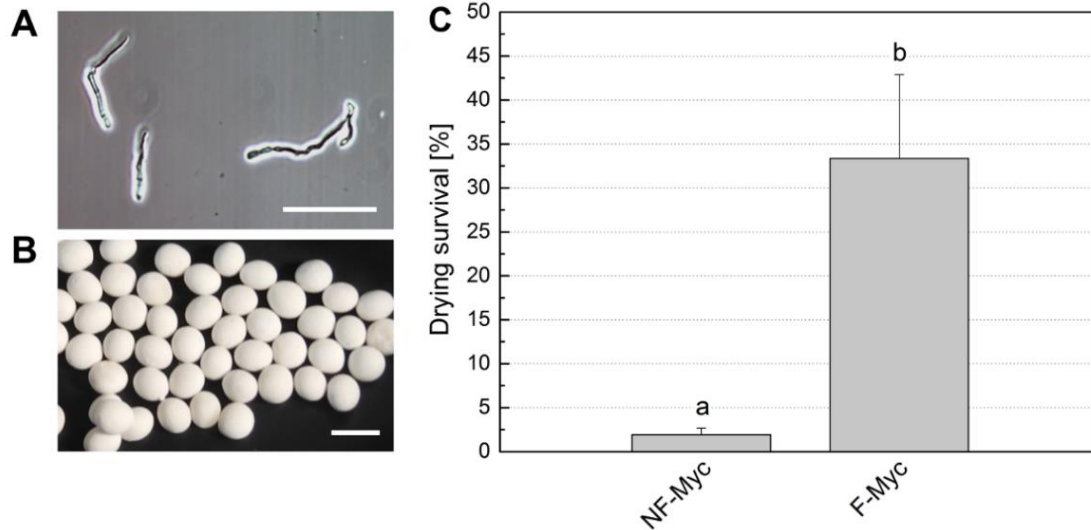
**Abbildung 24.** Einfluss der Formulierungsadditive Cellulose (C), inaktivierte Bäckerhefe (N) und Cellulase (E) auf das Wachstum des Pilzes von Kapseln mit amidiertem Pektin, Stärke und *M. brunneum* Cb15 Myzel (myc) nach 28 Tagen. (A): Radiales Myzelwachstum, (B): Sporenbildung an der Kapseloberfläche. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=8$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018b).

Sowohl der Zusatz von Cellulose, als auch von inaktivierter Bäckerhefe führten zu einer signifikanten Zunahme des Myzelwachstums ( $F_{3,13} = 53,89$ ;  $p < 0,001$ , **Abbildung 24A**), hatten jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Sporenbildung des Pilzes an der Oberfläche der Kapseln (**Abbildung 24B**). Der Zusatz von Cellulase verursachte eine signifikante Reduktion des Myzelwachstums (**Abbildung 24A**) zu Gunsten eines signifikanten Anstiegs der Sporenbildung pro Kapsel zu  $2,5 \times 10^8 \pm 6,1 \times 10^7$  ( $F_{3,14} = 36,74$ ;  $p < 0,001$ , **Abbildung 24B**). Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass durch die Co-Verkapselung von Cellulase ein Shift von Myzelwachstum hin zu Bildung von Sporen induziert werden kann.

#### 4.4.2 Trocknung und Lagerung von Formulierungen

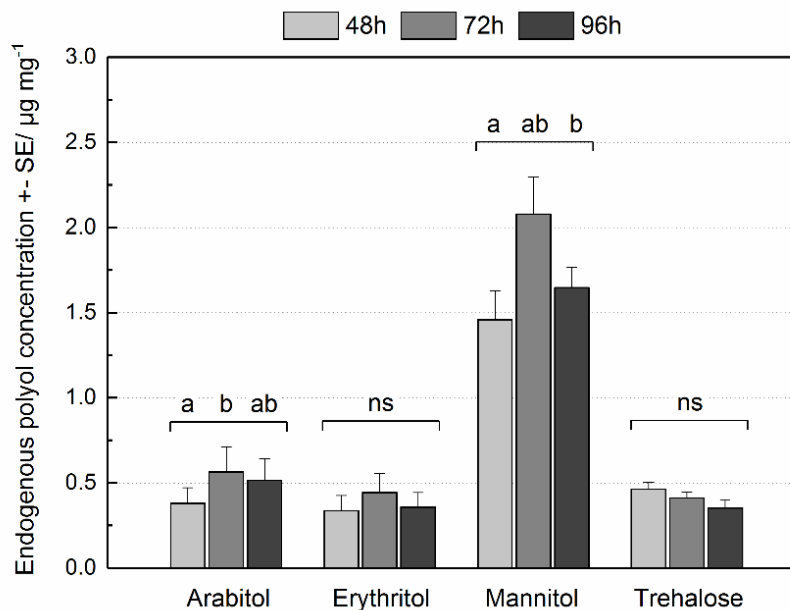
Zur Erhöhung der Lagerfähigkeit der in Arbeitspaket 4.1 hergestellten Kapseln ist es erforderlich, diese technisch zu trocknen. Um die Hypothese zu untersuchen, dass sich Verkapselung positiv auf die Trocknungsstabilität von *M. brunneum* Bipesco5 auswirkt, wurden die Calcium-Alginatkapseln aus Arbeitspaket 4.1 getrocknet. Als Kontrolle dienten nicht-verkapselte Hyphenfragmente. Die Dosis verwendeter Biomasse war bei verkapselter und nicht-verkapselter Anwendung identisch. Die Trocknung wurde bei 28 °C für drei Tage in einer speziellen Trocknungsapparatur unter Vakuum bis zu einem  $a_w$ -Wert von  $\leq 0,2$  durchgeführt. Für die Bestimmung der koloniebildenden Einheit (cfu) wurden die Kapseln in einer gepufferten Citratlösung aufgelöst, auf Sabouraud-Dextrose-Agar ausplattiert und bei 25 °C für drei bis vier Tage inkubiert. Das Ergebnis ist in **Abbildung 25** dargestellt.

Anhand von **Abbildung 25C** wird deutlich, dass die Trocknungsstabilität von *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmenten durch die Verkapselung in Calcium-Alginatkapseln signifikant verbessert werden konnte ( $t_{10} = 13,46$ ;  $p < 0,001$ ).

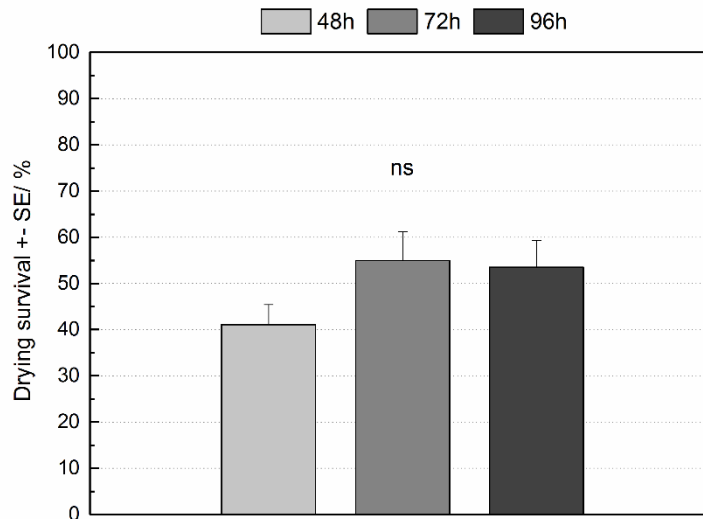


**Abbildung 25.** Einfluss der Verkapselung von *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmenten (myc) in Calcium-Alginatkapseln auf die Trocknungsstabilität. (A): Hyphenfragmente (Maßstab: 50 µm, Vergrößerung: 40x), (B): getrocknete Calcium-Alginatkapseln (Maßstab: 5 mm), (C): Überlebensrate von nicht-verkapselten (NF-myc) und verkapselten Hyphenfragmenten (F-myc). Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf einen T-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n = 9$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung); publiziert in (Krell et al., 2018c).

Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, ob das Kulturalter einen Einfluss auf die Trocknungsstabilität von verkapselten *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmenten hat. Es wurde angenommen, dass der Pilz in Abhängigkeit von der Wachstumsphase kompatible Solute, wie Arabitol, Erythritol, Mannitol und Trehalose, in unterschiedlichem Ausmaß in der Membran speichert und bei hohen endogenen Konzentrationen dieser Stoffe besser vor Trocknungsstress geschützt ist. Um dies zu überprüfen, wurden Hyphenfragmente nach einer Fermentationsdauer von 48h (exponentielle Wachstumsphase), 72h (stationäre Wachstumsphase) und 96h (Absterbephase) geerntet, in Calcium-Alginatkapseln verkapselt (s. Arbeitspaket 4.1), die Kapseln getrocknet und die cfu bestimmt (s.o.). Zusätzlich wurden die Konzentrationen von endogenem Arabitol, Erythritol, Mannitol und Trehalose für jedes Kulturalter mit Hilfe von GC-MS/MS bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 26** und **Abbildung 27** dargestellt.



**Abbildung 26.** Einfluss des Kulturalters auf den Gehalt endogener Polyole und Trehalose in *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmenten. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n = 6$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018a).

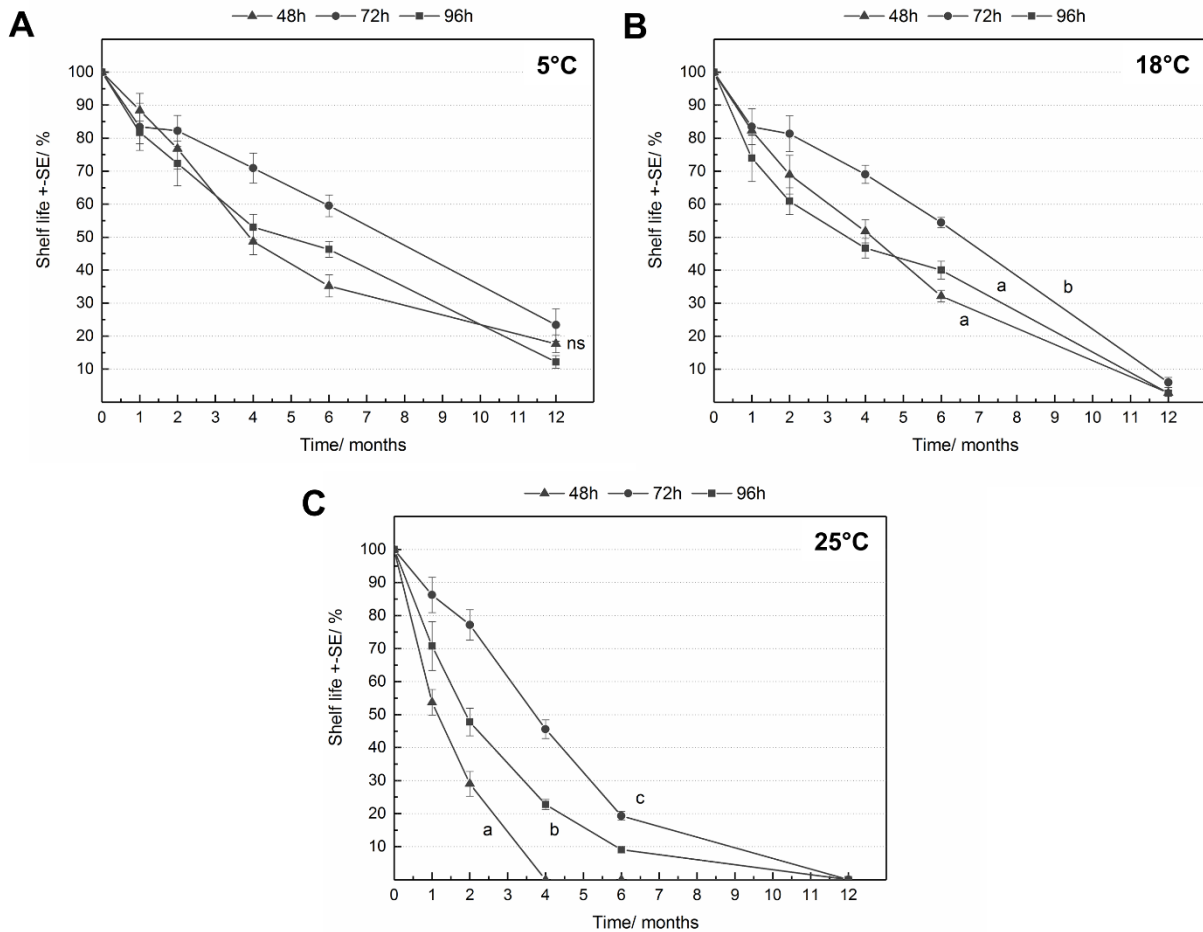


**Abbildung 27.** Einfluss des Kulturalters auf die Trocknungsstabilität von verkapselten *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmenten. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=5-6$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018a).

Die Ergebnisse in **Abbildung 26** verdeutlichen, dass der Gehalt von Arabitol ( $F_{2,15} = 4,41$ ;  $p < 0,05$ ) und Mannitol ( $F_{2,15} = 5,01$ ;  $p < 0,05$ ), jedoch nicht von Erythritol ( $F_{2,15} = 2,77$ ;  $p = 0,10$ ) und Trehalose ( $F_{2,15} = 2,64$ ;  $p = 0,10$ ), signifikant vom Kulturalter beeinflusst wurden. Trotz der signifikanten Unterschiede für Arabitol und Mannitol gab es keinen signifikanten Einfluss auf die Trocknungsstabilität verkapselter Hyphenfragmente ( $F_{2,14} = 1,70$ ;  $p = 0,22$ ; **Abbildung 27**).

Um festzustellen, ob ein erhöhter Arabitol- und Mannitolgehalt die Lagerfähigkeit verkapselter und in den Kapseln getrockneter *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmente verbessern kann, wurden je 0,3 g der bereits beschriebenen Kapseln in Sauerstoff- und Feuchtigkeit-impermeable Aluminium-Polyethylen-tüten (5x5 cm) eingeschweißt und für 12 Monate bei 5, 18 und 25°C gelagert. Die unterschiedlichen Lagertemperaturen wurden gewählt, um verschiedene Lagerbedingungen zu simulieren und um zu untersuchen, ob die Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die Lagerstabilität hat. Die cfu wurde ebenso bestimmt, wie für die Trocknungsstabilität. Die Ergebnisse sind nachfolgend in **Abbildung 28** dargestellt.

Bei jeder verwendeten Lagertemperatur nahm die Viabilität der verkapselten *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmente über die Zeit signifikant ab (5°C:  $F_{3,41} = 140,48$ ;  $p < 0,001$ ; 18°C:  $F_{2,34} = 256,53$ ;  $p < 0,001$ ; 25°C:  $F_{2,23} = 504,40$ ;  $p < 0,001$ ). Die beste Lagerstabilität wurde für Biomasse erreicht, die für 72h kultiviert wurde (5°C:  $F_{2,15} = 4,37$ ;  $p < 0,05$ ; 18°C:  $F_{2,15} = 9,65$ ;  $p < 0,01$ ; 25°C:  $F_{2,15} = 107,43$ ;  $p < 0,001$ ). Bei dem Einfluss der Lagertemperatur zeigten sich ebenfalls signifikante Effekte: die beste Lagerstabilität wurde bei 5°C erreicht, gefolgt von 18°C und 25°C (48h:  $F_{2,15} = 148,40$ ;  $p < 0,001$ ; 72h:  $F_{2,15} = 17,71$ ;  $p < 0,001$ ; 96h:  $F_{2,15} = 34,33$ ;  $p < 0,001$ ). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die beste Lagerstabilität bei 5°C mit Hyphenfragmenten erreicht wurde, die nach 72h Fermentationszeit geerntet wurden. Dies korrelierte mit erhöhten endogenen Konzentrationen von Arabitol und Mannitol (**Abbildung 26**).



**Abbildung 28.** Einfluss des Kulturalters auf die Lagerstabilität von verkapselten *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmenten bei verschiedenen Lagertemperaturen. (A): 5°C, (B): 18°C, (C): 25°C. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine RM-ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=6$ ; ns: nicht signifikant (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018a).

#### 4.4.3 Scale-Up technischer Formulierungen

Um große Kapselmengen von min. 150 kg Feuchtmasse pro Behandlung für die Feldversuche herzustellen, wurde ein Scale-Up für die Kapselproduktion basierend auf dem JetCutting-Prinzip verwendet. Dazu wurde das zu verkapselnde Material mithilfe einer Dickstoffpumpe gefördert. Mit einer rotierenden Scheibe wurden die geförderte Lösung in einzelne Tropfen separiert, bevor diese die Vernetzerlösung erreichten und die Kapseln geformt wurden. Damit war es möglich, die im Labormaßstab entwickelte Formulierung auch für Freilandexperimente (AP6) herstellen zu können.

### 4.5 Ergebnisse des Arbeitspaketes 5: Quantifizierung und Mykotoxin-Charakterisierung *in planta*

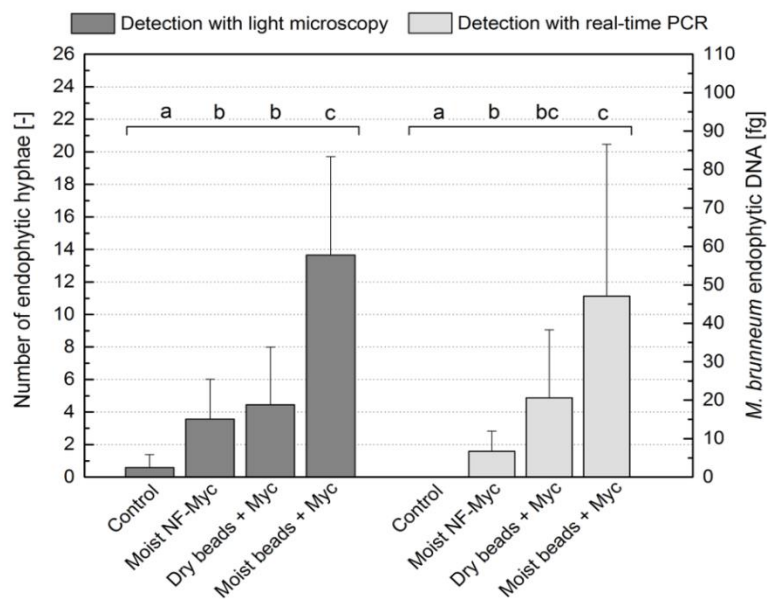
#### 4.5.1 Mykotoxin-Charakterisierung in verwerteten Pflanzenteilen

Im Arbeitspaket 1.3 konnte bereits gezeigt werden, dass Destruxine nicht in kolonisierten Pflanzen zu finden waren. Zusätzlich wurden jedoch während der Feldversuche an Kartoffeln Proben entnommen um eine Gefährdung des Verbrauchers durch mit Mykotoxinen belastete Kartoffeln auszuschließen. Hierfür wurden neu gebildete Kartoffelknollen während der Wachstumsphase BBCH 45 entnommen und durch die Arbeitsgruppe von Prof. Karlovsky auf erhöhte Destruxin- und Solanin-Gehalte hin untersucht. Die Untersuchungen konnten in keiner der Proben Destruxine nachweisen und es konnte keine Erhöhung der Solanin Gehalte durch die *M. brunneum* Behandlungen nachgewiesen werden.

#### 4.5.2 Abschließende Quantifizierung der EEPs mittels q-PCR

In diesem Arbeitspaket wurde untersucht, ob die in Arbeitspaket 4.1 produzierten Kapseln die endophytische Kolonisierung von Tomaten- und Kartoffelpflanzen durch *M. brunneum* unterstützen können. Dazu wurden zunächst Calcium-Alginatkapseln mit *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmenten hergestellt und ein Teil dieser Kapseln getrocknet (s. Arbeitspaket 4.2). Von den Kapseln wurden 4 g feucht und die äquivalente Menge getrocknet an Wurzeln von Tomatenpflanzen (Var. Ruthje) appliziert, um die Auswirkung der Trocknung und damit einer reduzierten Viabilität des Pilzes auf die Pflanzenkolonisierung zu untersuchen. Darüber hinaus wurde der Frage nachgegangen, ob durch eine Verkapselung der Hyphenfragmente die Kolonisierungseffizienz gesteigert werden kann, da der Pilz in der Kapsel vor anderen Mikroorganismen geschützt ist und zusätzlich durch die Verkapselung von Nährstoffen in Form von Maisstärke beim Wachstum aus der Kapsel unterstützt wird. Dazu wurden zum Vergleich auch nicht-formulierte Hyphenfragmente mit der gleichen Dosis wie in feuchten Kapseln appliziert. Alle Pflanzen wurden in unsteriler Fruchstorfer Erde Typ T mit 10% Sand kultiviert. 21 Tage nach Applikation des Pilzes wurden Proben aus dem Stängel der Pflanzen etwa 3 cm über der Erde genommen und die Kolonisierungseffizienz mikroskopisch durch Quantifizierung endophytischer Hyphen und molekular durch Quantifizierung des endophytischen Pilzes mittels qPCR und *M. brunneum* spezifischen Primern analysiert. Die zusätzliche molekulare Analytik wurde verwendet, um die Ergebnisse des mikroskopischen Nachweises zu verifizieren, da es sich bei der mikroskopischen Quantifizierung um einen unspezifischen Nachweis von Hyphen verschiedenster endophytischer Pilze handelt. Die Ergebnisse sind in

**Abbildung 29** dargestellt.

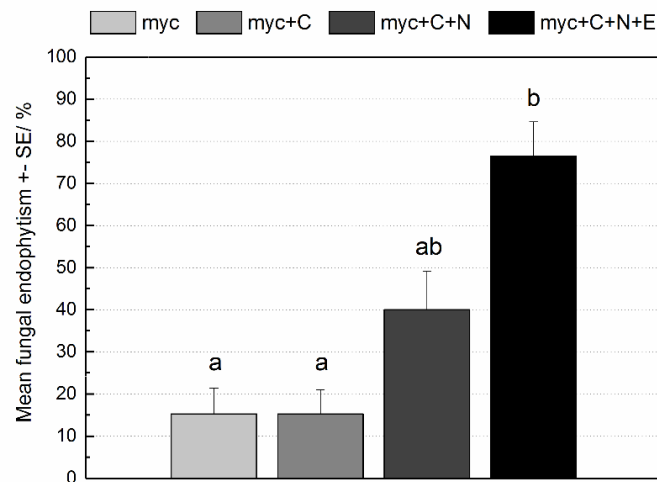


**Abbildung 29.** Einfluss von Verkapselung von *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmenten in Calcium-Alginatkapseln auf die endophytische Kolonisierung von Stängeln von Tomatenpflanzen 21 Tage nach Wurzelinokulation. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA und Bonferroni Post-Hoc-Test oder Kruskal-Wallis-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=25$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung); publiziert in (Krell et al., 2018c).

Anhand der Ergebnisse in **Abbildung 29** wird deutlich, dass durch *M. brunneum* Bipesco5 Hyphenfragmente eine erfolgreiche Kolonisierung von Tomatenpflanzen erreicht wurde. Dabei war die Kolonisierungseffizienz nach der Applikation von feuchten Kapseln im Gegensatz zu nicht-formulierten, feuchten Hyphenfragmenten sowohl bei dem mikroskopischen ( $F_{3,99}=133,91$ ;  $p < 0,001$ ), als auch bei dem molekularen Nachweis ( $\chi^2 = 48,40$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,05$ ) signifikant erhöht was für die Hypothese spricht, dass der Pilz durch die Verkapselung vor antagonistischen Mikroorganismen geschützt wird und das Nährstoffdepot in den Kapseln den Pilz beim Auswuchs unterstützt. Zwischen der erreichten Kolonisierungseffizienz nach der Anwendung von feuchten und getrockneten Kapseln wurden beim mikroskopischen Nachweis ebenfalls signifikante Unterschiede festgestellt. Diese sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass während der Trocknung etwa 50% der aktiven Biomasse abgestorben ist (s. Arbeitspaket 4.2). Mit diesem Experiment wurde also gezeigt, dass nach Applikation von Hyphenfragmenten eine Kolonisierung von Tomatenpflanzen erreicht werden kann. Zusätzlich wurde

erfolgreich bewiesen, dass durch Verkapselung die Kolonisierung des endophytischen Pilzes signifikant verbessert werden kann.

In einem weiteren Experiment wurde der Frage nachgegangen, ob durch induzierte Cellulaseaktivität in Calcium-Pektinamidkapseln die endophytische Kolonisierung von Kartoffelpflanzen durch *M. brunneum* Cb15 verbessert werden kann. Dieses Experiment basiert auf der Hypothese, dass Cellulase als Penetrationshilfsmittel dient, ähnlich wie bei phytopathogenen Pilzen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst Calcium-Pektinamidkapseln entsprechend der Angaben in Arbeitspaket 4.1 hergestellt. Pro oberflächensterilisierten Kartoffelknolle (Var. Linda) wurden 5 g feuchte Kapseln eingesetzt und in einem Weckglas auf Wasseragar für 21 Tage bei 18-23°C und einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16h:8h inkubiert. Die endophytische Kolonisierung des Pflanzengewebes (Wurzel, Knolle, Spross) wurde durch Re-Isolierung des Pilzes auf Selektivmedium bestimmt. Zusätzlich wurde DNS aus der re-isolierten Pilzbiomasse gewonnen und mit Hilfe von PCR und *M. brunneum* spezifischen Primern analysiert, um eine Identifizierung des Pilzes zu gewährleisten. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 30** dargestellt.



**Abbildung 30.** Einfluss der Formulierungsadditive Cellulose (C), inaktivierte Bäckerhefe (N) und Cellulase (E) auf die endophytische Kolonisierung von Kartoffelpflanzen durch *M. brunneum* Cb15 21 Tage nach Applikation von Kapseln mit amidierten Pektin, Stärke und *M. brunneum* Cb15 Myzel (myc). Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf einen Kruskal-Wallis-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=6$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018b).

Wie in **Abbildung 23** bereits gezeigt wurde, führte die Zugabe von Cellulose (C) und inaktiverter Bäckerhefe (N) zu einer geringen Cellulaseaktivität in Calcium-Pektinamidkapseln. Durch Supplementierung von Cellulase (E) erhöhte sich die Cellulaseaktivität signifikant, was mit einer vermehrten Sporenbildung an der Kapseloberfläche einherging (**Abbildung 24**). Wie in **Abbildung 30** deutlich wird, führte die Applikation von Cellulase auch zu einer signifikant verbesserten endophytischen Kolonisierung von Kartoffelpflanzen durch *M. brunneum* Cb15 um 61,2% ( $\chi^2 = 26,92$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ) im Vergleich zu Kontrollkapseln (myc). Kontrollpflanzen, die mit Leerkapseln behandelt wurden, waren negativ für *M. brunneum*. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Co-Verkapselung von Cellulase und Applikation dieser Kapseln an Kartoffelpflanzen zu einer signifikanten Verbesserung der endophytischen Kolonisierung durch *M. brunneum* Cb15 führte. Da eine erhöhte Cellulaseaktivität mit einer vermehrten Sporenbildung einherging, kann die verbesserte Kolonisierung allerdings nicht ausschließlich auf die Aktivität der Cellulase zurückgeführt werden, sondern könnte eine Kombination aus beiden Faktoren gewesen sein.

## 4.6 Ergebnisse des Arbeitspaketes 6: Praxisnahe Versuche

### 4.6.1 Praxisnahe Versuche im Gewächshaus

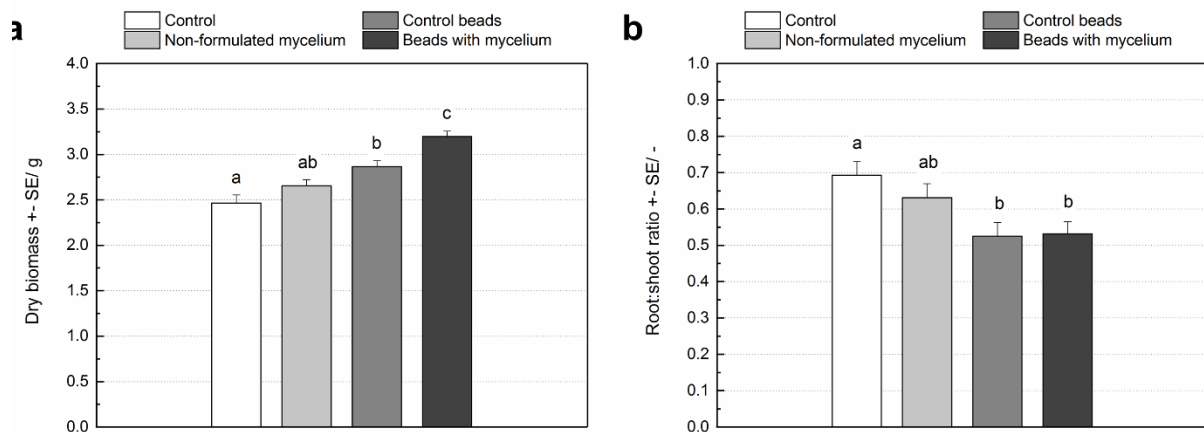
Während des Projektes wurden verschiedene Experimente unter Gewächshausbedingungen durchgeführt, um die Reaktionen von Kartoffelpflanzen auf endophytische entomopathogene *Metarhizium* spp. Isolate und Formulierungen dieser Nutzpilze zu untersuchen. So wurde z.B. der Frage nachgegangen, ob sich die Wurzelarchitektur von Kartoffelpflanzen nach Inokulation mit Calcium-Pektinamidkapseln und *M. brunneum* Cb15 (s. Arbeitspaket 4.1) und anschließender endophytischer Kolonisierung durch den Pilz ändert, wie es für Mykorrhiza-klassifizierte Pflanzen beschrieben ist.

Darüber hinaus wurde die Hypothese aufgestellt, dass mit *M. brunneum* Cb15 endophytisch kolonisierte Pflanzen aufgrund einer verbesserten Nährstoffversorgung durch den Pilz ein reduziertes Wurzel-zu-Spross-Verhältnis aufweisen.

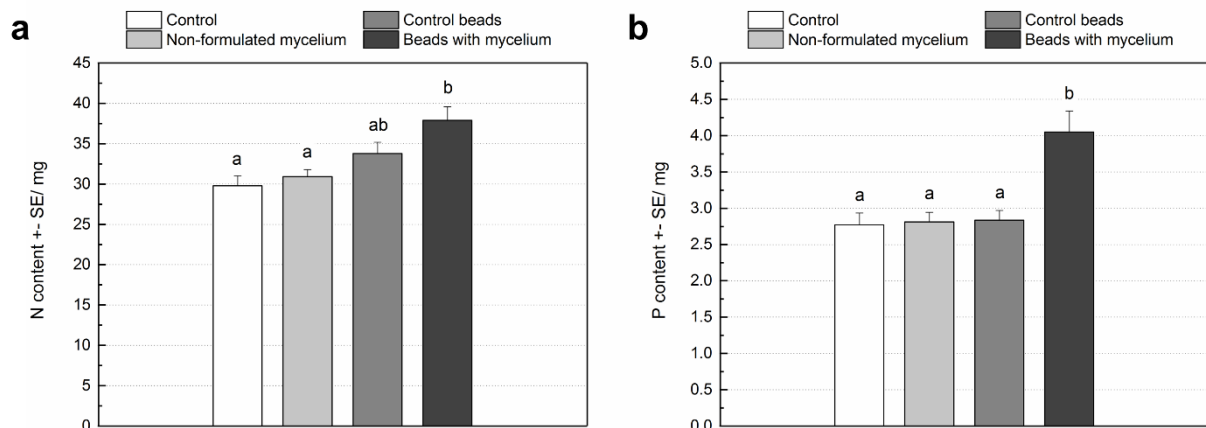
Um den Einfluss von *M. brunneum* Cb15 auf Kartoffelpflanzen zu untersuchen, wurden zunächst 3 g getrocknete Calcium-Pektinamidkapseln und *M. brunneum* Cb15 Myzel (s. Arbeitspaket 4.1) in ein etwa 8 cm tiefes Pflanzloch appliziert, eine oberflächensterilisierte Kartoffelknolle (Var. Bintje) darübergelegt und diese mit sterilisiertem Sand bedeckt. Weitere Behandlungen umfassten feuchtes nicht-formuliertes Myzel mit der gleichen Dosis an Biomasse wie in feuchten Calcium-Pektinamidkapseln, getrocknete Calcium-Pektinamidkapseln ohne Biomasse, sowie Kontrollpflanzen ohne Behandlung. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 18-23°C, einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16h:8h und einer relativen Feuchtigkeit von etwa 60% für 35 Tage kultiviert. Alle Pflanzen erhielten 50 ml vollentsalztes Wasser pro Tag.

In diesem Experiment wurde zunächst evaluiert, ob eine endophytische Kolonisierung von Wurzeln durch *M. brunneum* Cb15 stattgefunden hatte. Dies erfolgte wie in Arbeitspaket 5.1 für Kartoffelpflanzen beschrieben wurde. Die Analyse ergab, dass lediglich die Applikation von Calcium-Pektinamidkapseln mit *M. brunneum* Cb15 zu einer erfolgreichen endophytischen Kolonisierung von Wurzeln mit 7,5% führte. Dies korrelierte mit einem signifikant verbesserten Pflanzenwachstum ( $F_{3,33} = 17,11$ ;  $p < 0,001$ , **Abbildung 31A**). Das Wurzel-zu-Spross-Verhältnis wurde durch die Kapselapplikation ebenfalls signifikant beeinflusst, wobei Kapseln ohne *M. brunneum* Cb15 einen vergleichbaren Effekt erzielten, wie Kapseln mit *M. brunneum* Cb15 ( $F_{3,36} = 5,61$ ;  $p < 0,01$ , **Abbildung 31B**). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Pflanzen in der Lage waren, auf Nährstoffe in der Kapsel ohne Einwirkung des Pilzes zuzugreifen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde der Stickstoff- und Phosphorgehalt in den Pflanzen quantifiziert (**Abbildung 32**).

Tatsächlich führte die Applikation von Kapseln ohne *M. brunneum* Cb15 ebenfalls zu einem erhöhten Stickstoffgehalt in den Pflanzen, wobei ein signifikanter Unterschied zu Kontrollpflanzen und Pflanzen, die mit nicht-formuliertem Myzel inokuliert wurden, nur bei Kapselanwendung mit *M. brunneum* Cb15 bestimmt wurde ( $F_{3,36} = 5,61$ ;  $p < 0,01$ , **Abbildung 32A**). Wie anhand von **Abbildung 32B** deutlich wird, führte die Kapselanwendung mit *M. brunneum* Cb15 ebenfalls zu dem höchsten Phosphorgehalt mit einem signifikanten Unterschied zu allen anderen Behandlungen ( $F_{3,34} = 6,29$ ;  $p < 0,01$ ). Dies lässt sich dadurch erklären, dass Stickstoff in der Form von inaktivierter Bäckerhefe in den Kapseln vorhanden war, Phosphor jedoch nicht durch die Kapsel zur Verfügung gestellt wurde und nur durch den Pilz aus dem Sand mobilisiert und zu den Pflanzen transferiert werden konnte.



**Abbildung 31.** Einfluss von *M. brunneum* Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf das Wachstum von Kartoffelpflanzen. (A): Trockenbiomasse mit Wurzeln, Stängel und Blättern, (B): Wurzel-zu-Spross-Verhältnis. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=8-10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018e).

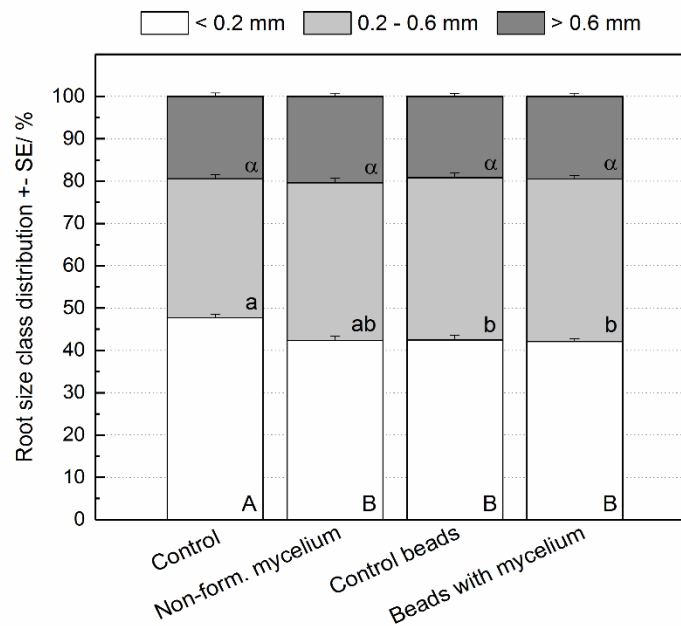


**Abbildung 32.** Einfluss von *M. brunneum* Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf den Stickstoff- und Phosphorgehalt in Kartoffelpflanzen. (A): Stickstoffgehalt, (B): Phosphorgehalt. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=8-10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); Publiziert in (Krell et al., 2018d).

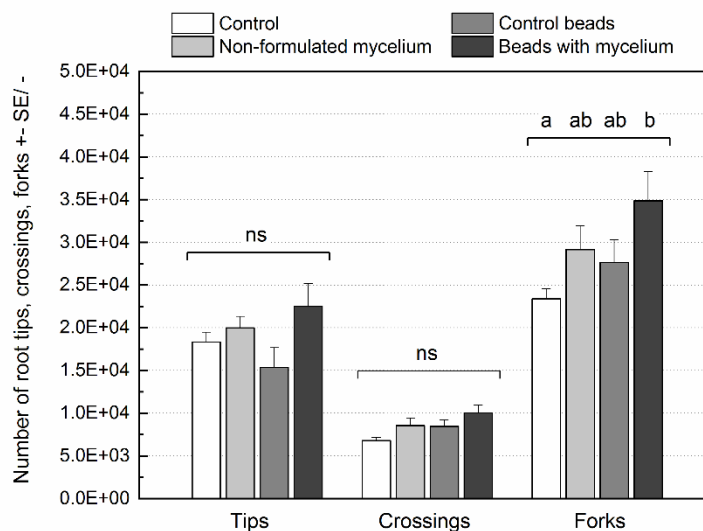
Zusätzlich zu dem Pflanzenwachstum und dem Nährstoffgehalt wurde die Wurzelarchitektur analysiert. Es wurde angenommen, dass sich der Anteil an Feinwurzeln und Wurzelverzweigung durch die verbesserte Pflanzenernährung verringert, wie es oft für Mykorrhiza-klassifizierte Pflanzen beobachtet wird.

Anhand von **Abbildung 33** wird deutlich, dass durch die Kapselapplikation der Anteil an Feinwurzeln im Vergleich zu Kontrollpflanzen signifikant ab- ( $F_{3,31} = 8,00$ ;  $p < 0,001$ ) und der Anteil an mitteldicken Wurzeln signifikant zunahm ( $F_{3,31} = 6,72$ ;  $p < 0,001$ ), wobei kein Unterschied zwischen Kapseln mit und ohne *M. brunneum* Cb15 festgestellt werden konnte. Der Anteil dicker Wurzeln blieb von den Behandlungen unbeeinflusst ( $F_{3,31} = 0,52$ ;  $p = 0,67$ ). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Unterschiede in den Wurzelgrößenklassen eher auf einen Nährstoffeffekt durch die Kapsel, als auf Effekte induziert durch *M. brunneum* Cb15 zurückzuführen sind.





**Abbildung 33.** Einfluss von *M. brunneum* Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf die Wurzelklassenverteilung von Kartoffelpflanzen. Unterschiedliche Buchstaben in den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n = 9-10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler). Großbuchstaben: Feinwurzeln ( $< 0,2$  mm), Kleinbuchstaben: mitteldicke Wurzeln ( $0,2-0,6$  mm), Griechische Buchstaben: dicke Wurzeln ( $> 0,6$  mm); publiziert in (Krell et al., 2018e).



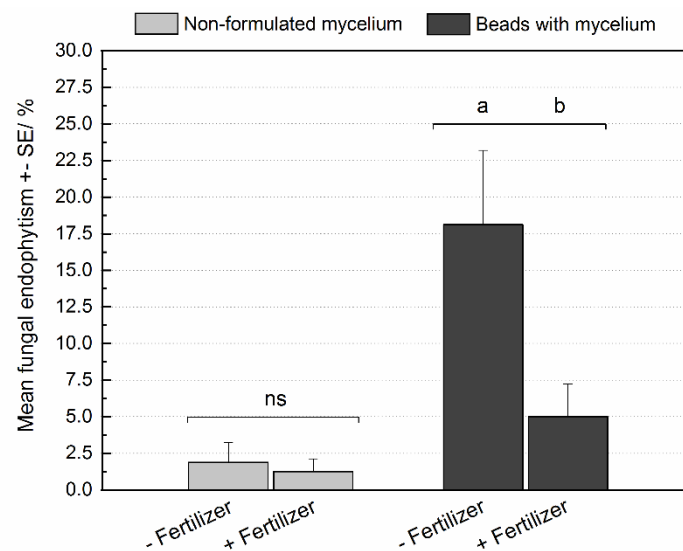
**Abbildung 34.** Einfluss von *M. brunneum* Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf die Anzahl von Wurzelspitzen, -kreuzungen und -gabelungen von Kartoffelpflanzen. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n = 8-10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018e).

Die Ergebnisse der Analyse der Wurzelverzweigung sind in **Abbildung 34** dargestellt. Es wird deutlich, dass nach Applikation von Calcium-Pektinamidkapseln mit *M. brunneum* Cb15 signifikant mehr Gabelungen im Vergleich zu Kontrollpflanzen aufgetreten sind ( $F_{3,34} = 3,07$ ;  $p < 0,05$ ). Allerdings blieben sowohl Wurzelspitzen ( $F_{3,36} = 2,31$ ;  $p = 0,93$ ), als auch -kreuzungen ( $F_{3,32} = 2,59$ ;  $p = 0,07$ ) von den Behandlungen unbeeinflusst. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Haupteffekte auf die Wurzelarchitektur durch die verbesserte Nährstoffversorgung durch die Kapsel und weniger durch *M. brunneum* Cb15 hervorgerufen wurden. Dies hing vermutlich mit der geringen endophytischen Kolonisierung in diesem Experiment zusammen.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob Kartoffelpflanzen nach Inokulation mit Calcium-Pektinamidkapseln und *M. brunneum* Cb15 (s. Arbeitspaket 4.1) eine verbesserte Pflanzengesundheit aufweisen. Es wurde angenommen, dass die endophytische Kolonisierung durch den Pilz unter

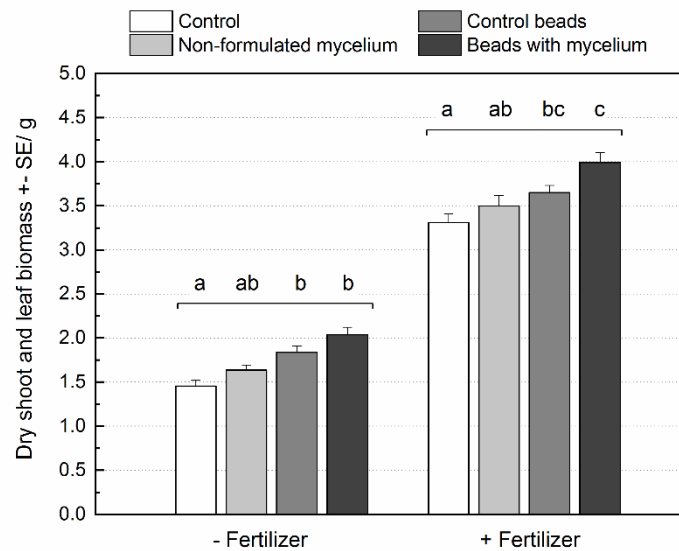
nährstoffarmen im Vergleich zu nährstoffreichen Bedingungen signifikant verbessert ist und dies mit einer besseren Pflanzengesundheit korreliert. Das Experiment wurde ebenso mit 3 g getrockneten Calcium-Pektinamidkapseln und *M. brunneum* Cb15 Myzel, getrockneten Calcium-Pektinamidkapseln ohne Pilz, feuchtem nicht-formuliertem Myzel, sowie Kontrollpflanzen ohne Behandlung durchgeführt. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei 18-23°C, einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16h:8h und einer relativen Feuchtigkeit von etwa 60% für 35 Tage kultiviert. Ein Teil der Pflanzen erhielt täglich 50 ml vollentsalztes Wasser (nährstoffarme Bedingungen). Der andere Teil der Pflanzen erhielt drei Mal pro Woche 50 ml Düngerlösung und an den anderen Tagen 50 ml vollentsalztes Wasser (nährstoffreiche Bedingungen).

Zunächst wurde der Einfluss der Bodenfruchtbarkeit auf die endophytische Kolonisierung von Kartoffelpflanzen (Wurzeln, Knolle, Spross, Blätter) durch *M. brunneum* Cb15 untersucht. Dies erfolgte wie in Arbeitspaket 5.1 für Kartoffelpflanzen beschrieben wurde. In **Abbildung 35** ist die Kolonisierung nach Applikation von nicht-formuliertem und verkapseltem Myzel dargestellt. Es wird deutlich, dass nach Anwendung von nicht-formuliertem Myzel nur geringe Kolonisierungsraten erreicht wurden mit keinen Unterschieden zwischen nährstoffarmen und -reichen Bedingungen ( $t_{78} = 0,22$ ,  $p = 0,83$ ). Hingegen wurde nach Applikation von Kapseln mit *M. brunneum* Cb15 eine höhere Kolonisierungsrate erreicht, die unter nährstoffarmen Bedingungen signifikant höher war, verglichen zu nährstoffreichen Bedingungen ( $t_{55} = 2,35$ ,  $p < 0,05$ ). Kontrollpflanzen und Pflanzen, die mit Kapseln ohne *M. brunneum* Cb15 behandelt wurden, waren negativ für *M. brunneum*.

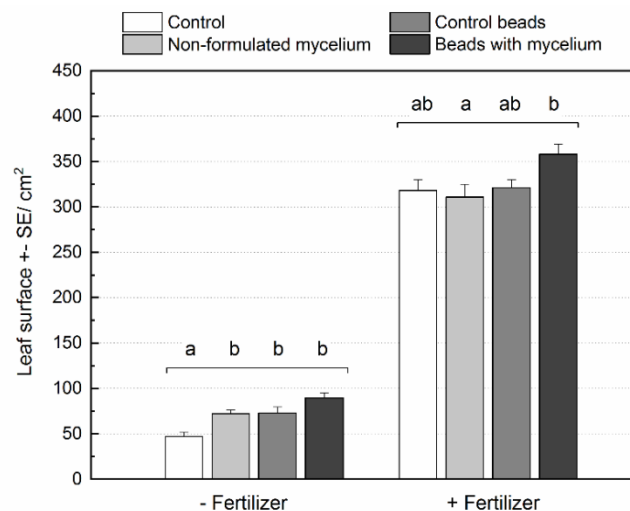


**Abbildung 35.** Einfluss der Bodenfruchtbarkeit (nährstoffarm: -Fertilizer, nährstoffreich: +Fertilizer) auf die endophytische Kolonisierung von Kartoffelpflanzen durch *M. brunneum* Cb15. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf einen T-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018d).

Um eine erhöhte endophytische Pflanzenkolonisierung durch *M. brunneum* Cb15 mit einer verbesserten Pflanzengesundheit in Verbindung zu bringen, wurden Pflanzenbiomasse, Blattoberfläche, Quantenausbeute vom Photosystem II sowie Pflanzennährstoffversorgung analysiert. Wie anhand von **Abbildung 36** und **Abbildung 37** deutlich wird, führte die Applikation von Kapseln mit *M. brunneum* Cb15 sowohl unter nährstoffarmen als auch unter nährstoffreichen Bedingungen zu den höchsten Werten von Pflanzenbiomasse mit  $2,04 \pm 0,08$  g ( $F_{3,36} = 7,14$ ;  $p < 0,01$ ) und  $3,99 \pm 0,11$  g ( $F_{3,36} = 8,39$ ;  $p < 0,001$ ), sowie von Blattoberflächen mit  $89,50 \pm 5,99$  cm<sup>2</sup> ( $F_{3,36} = 12,54$ ;  $p < 0,001$ ) und  $357,98 \pm 8,97$  cm<sup>2</sup> ( $F_{3,36} = 3,29$ ;  $p < 0,05$ ). Diese Ergebnisse waren unabhängig von einer erhöhten endophytischen Kolonisierung des Pilzes unter nährstoffarmen Bedingungen.

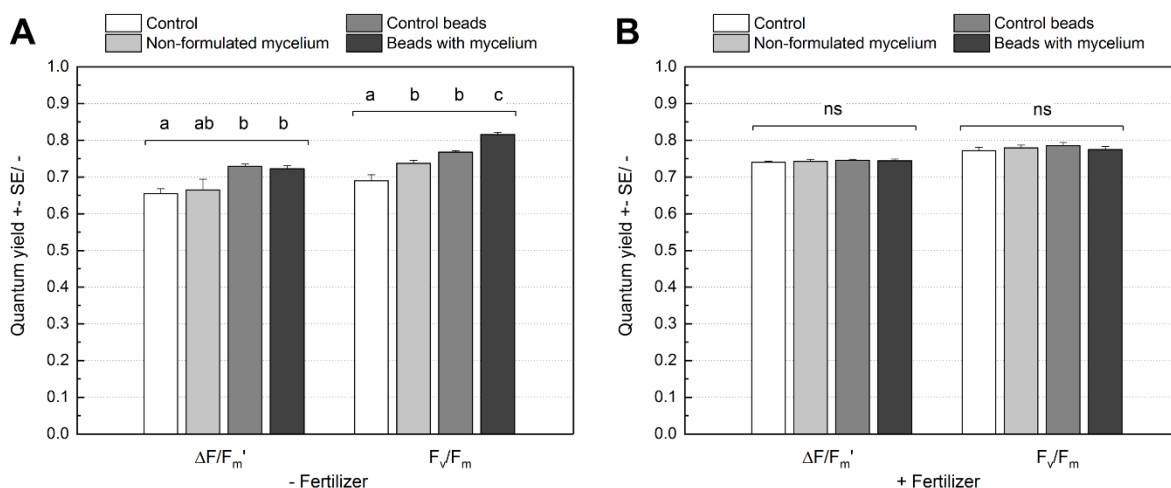


**Abbildung 36.** Einfluss von *M. brunneum* Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf die Trockenbiomasse von Kartoffelpflanzen, die in nährstoffarmen (-Fertilizer) und nährstoffreichen Bedingungen (+Fertilizer) kultiviert wurden. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018d).



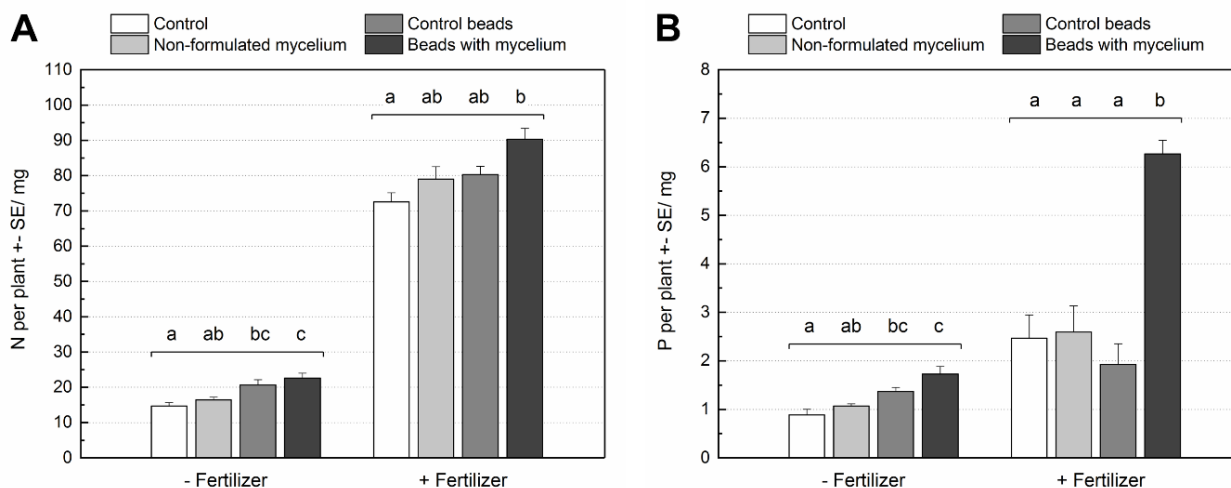
**Abbildung 37.** Einfluss von *M. brunneum* Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf die Blattoberfläche von Kartoffelpflanzen, die in nährstoffarmen (-Fertilizer) und nährstoffreichen Bedingungen (+Fertilizer) kultiviert wurden. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018d).

Wie in **Abbildung 38A** deutlich wird, wurde unter nährstoffarmen Bedingungen sowohl die effektive ( $F_{3,19} = 8,92$ ;  $p < 0,01$ ), als auch die maximale Quantenausbeute ( $F_{3,18} = 29,22$ ;  $p < 0,001$ ) durch die Applikation von Kapseln signifikant beeinflusst. Die Anwendung von verkapseltem *M. brunneum* Cb15 wirkte sich insbesondere positiv auf die maximale Quantenausbeute aus. Unter nährstoffreichen Bedingungen blieben hingegen sowohl die effektive, als auch die maximale Quantenausbeute von den Behandlungen unbeeinflusst (**Abbildung 38B**). Die Abwesenheit positiver Effekte von *M. brunneum* Cb15 auf die Quantenausbeute unter nährstoffreichen Bedingungen lässt sich vermutlich auf einen starken Effekt der angewendeten Düngerlösung zurückführen, durch den bereits optimale Quantenausbeuten erreicht wurden. Zudem ist denkbar, dass für signifikante Effekte des Pilzes auf die Quantenausbeute eine höhere endophytische Kolonisierung von Kartoffelpflanzen nötig ist, so wie sie unter nährstoffarmen Bedingungen erzielt wurde (**Abbildung 35**).



**Abbildung 38.** Einfluss von *M. brunneum* Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf die effektive ( $\Delta F/F_m'$ ) und maximale Quantenausbeute ( $F_v/F_m$ ) von Photosystem II in Kartoffelpflanzen. (A): Nährstoffarme Bedingungen (-Fertilizer), (B): nährstoffreiche Bedingungen (+Fertilizer). Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018d).

Abschließend wurde die Pflanzennährstoffversorgung analysiert. Die Kapselapplikation mit *M. brunneum* Cb15 führte sowohl unter nährstoffarmen ( $F_{3,36} = 9,42$ ;  $p < 0,001$ ), als auch unter nährstoffreichen Bedingungen ( $\chi^2 = 14,03$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,01$ ) zu maximalen Stickstoffkonzentrationen in Kartoffelpflanzen (**Abbildung 39A**). Ebenso wurden für den Phosphorgehalt unter nährstoffarmen ( $F_{3,18} = 8,74$ ;  $p < 0,01$ ) und unter nährstoffreichen Bedingungen ( $\chi^2 = 18,56$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,001$ ) maximale Konzentrationen bestimmt (**Abbildung 39B**). Interessanterweise war der Phosphorgehalt insbesondere unter nährstoffreichen Bedingungen durch die Kapselapplikation mit *M. brunneum* Cb15 erhöht. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass im Vergleich zu nährstoffarmen Bedingungen Phosphor durch die Anwendung der Düngertlösung nicht limitiert vorlag und somit mehr durch *M. brunneum* Cb15 mobilisiert und zu den Pflanzen transferiert werden konnte.



**Abbildung 39.** Einfluss von *M. brunneum* Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf den Stickstoff- und Phosphorgehalt in Kartoffelpflanzen, die in nährstoffarmen (-Fertilizer) und nährstoffreichen Bedingungen (+Fertilizer) kultiviert wurden. (A): Stickstoffgehalt, (B): Phosphorgehalt. Unterschiedliche Buchstaben über den Balken zeigen signifikante Unterschiede bezogen auf eine ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Test mit  $p < 0,05$ ;  $n=10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler); publiziert in (Krell et al., 2018d).

Zusammenfassend wurde mit diesem Experiment gezeigt, dass das Potential von *M. brunneum* Cb15 Kartoffelpflanzen endophytisch zu kolonisieren von der Bodenfruchtbarkeit beeinflusst wurde. Eine verbesserte endophytische Kolonisierung unter nährstoffarmen im Vergleich zu nährstoffreichen Bedingungen korrelierte mit signifikant erhöhten Quantenausbeuten des Photosystems II. Unabhängig von der Bodenfruchtbarkeit und der endophytischen Kolonisierung von Kartoffelpflanzen wurden durch *M. brunneum* Cb15 die Trockenbiomasse, Blattoberfläche, sowie der Stickstoff- und Phosphorgehalt erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, dass endophytische entomopathogene Pilze, wie *M. brunneum* Cb15, zusätzlich zu ihrer Fähigkeit Insekten zu kontrollieren, auch die Pflanzengesundheit verbessern können.

#### 4.6.2 Praxisnahe Versuche unter Feldbedingungen

Im Berichtszeitraum wurde ein Feldversuch gegen Drahtwürmer an drei verschiedenen niedersächsischen Standorten durchgeführt. Das Versuchsdesign orientierte sich an den EPPO-Richtlinien für die Durchführung von Feldversuchen gegen den Drahtwurm (*Agriotes* spp.). Nach Absprache mit landwirtschaftlichen Beratern und Landwirten wurden für die Versuche Kartoffelfelder ausgewählt, die durch ihre besondere Lage und ackerbauliche Vorgeschichte als besonders belastet durch Drahtwürmer eingestuft werden konnten. Die Versuchsfelder befanden sich in der Nähe von Waake, Hameln sowie Barnstedt. An jedem der genannten Standorte wurden zwei Behandlungen mit fein-dispersen Myzel des *M. brunneum* Isolates Cb15III, sowie eine unbehandelte Kontrolle getestet. Eine Variante bestand aus freiem fein-dispersen Myzel in einer unformulierten Suspension, die andere aus getrockneten Kapseln in die fein-disperses Myzel eingebettet worden waren. Es wurden 3 g der Kapseln als „Spott-Applikation“ mit der Hand unter den Kartoffelknollen abgelegt. In der flüssigen Variante wurde eine äquivalente Menge appliziert. Die Behandlungen wurden im Block randomisiert und acht Mal je Feld wiederholt. Die Aussaat und Applikation fand in den Monaten April bis Mai statt und die Ernte/Bonitur in den Monaten August bis September. Bonitiert wurde der durch die Drahtwürmer entstandene Schaden an den neu gebildeten Knollen, sowie die Dichte der Kolonien bildenden *Metarhizium* spp. Einheiten (cfu) im Boden, zu Beginn und zum Ende der Feldversuche. Bis zur Ernte wurden zusätzlich Pflanzenproben gesammelt, um eine eventuelle Kolonisierung der Pflanzen nachzuweisen. Die genommenen Pflanzenproben, jeweils Wurzel, Stängel und Blatt, wurden nach einer Oberflächensterilisation auf selektives Medium aufgebracht, um ein Auswachsen des Pilzes aus dem Pflanzengewebe zu ermöglichen. Ein Auswachsen des Isolates konnte aus keiner der Proben beobachtet werden. Die gentechnische Analyse mithilfe einer Nested-PCR konnte keine *Metarhizium* spp. DNS in den Proben nachweisen. Anhand der Bodenproben lässt sich allerdings zeigen, dass sich die Anzahl der cfu im Boden zwischen der Aussaat und der Ernte teils erheblich erhöht hat. So konnte auf dem Versuchsfeld in Waake ein Anstieg der cfu um den Faktor  $1 \times 10^2$  beobachtet werden (Tabelle 6). Diese deutliche Steigerung konnte jedoch nicht auf allen Feldern nachgewiesen werden. In Barnstedt hat sich die Anzahl der cfu nur um etwas mehr als das Doppelte steigern können, während in Hameln nur ein marginaler Anstieg bei der Behandlung mit freiem fein-dispersen Myzel zu beobachten war.

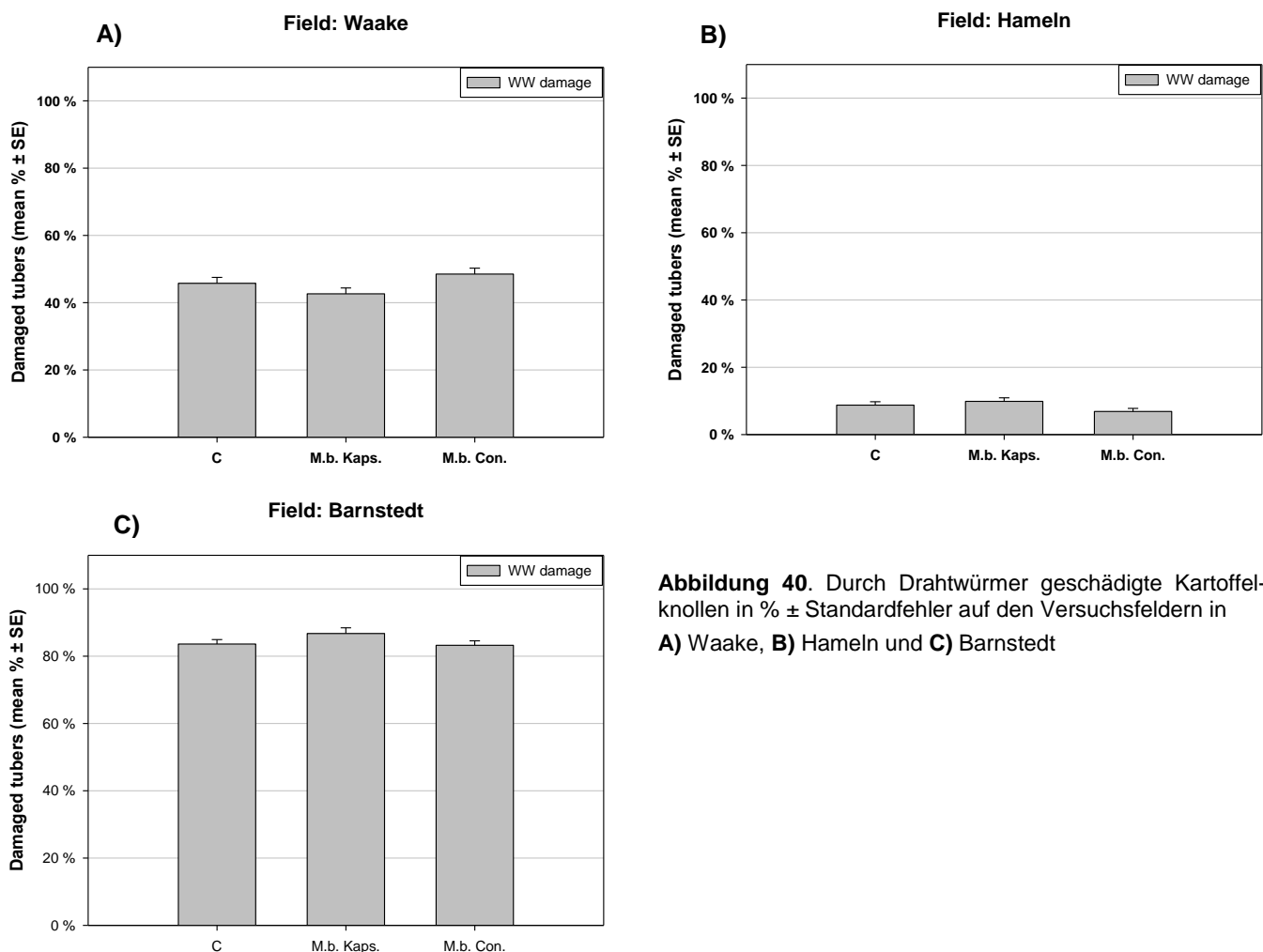
**Tabelle 6.** Durchschnittliche Anzahl der Kolonien bildenden *Metarhizium* spp. Einheiten (cfu) pro 1 g Boden zum Zeitpunkt der Aussaat und der Ernte je Behandlung und Standort.

	cfu pro 1 g Boden (Aussaat)	cfu pro 1 g Boden (Ernte)
<b>Waake</b>		
Kontrolle	3,1	0,0
Freies fein-disperses Myzel	0,0	0,0
Verkapseltes fein-disperses Myzel	31,2	3375,0
<b>Hameln</b>		
Kontrolle	0	0,0
Freies fein-disperses Myzel	0	12,5
Verkapseltes fein-disperses Myzel	0	0,0
<b>Barnstedt</b>		
Kontrolle	43,8	106,3
Freies fein-disperses Myzel	43,8	25,0
Verkapseltes fein-disperses Myzel	50,0	183,3

Die Auswertung der Kartoffeln zeigte, dass der Anteil der durch Drahtwürmer beschädigten Kartoffelknollen sehr stark zwischen den verschiedenen Standorten schwankte. Die meisten geschädigten Kartoffeln,

zwischen 80% und 90%, wurden auf dem Versuchsfeld in Barnstedt gefunden (**Abbildung 40 C**), die wenigsten in Hameln (**Abbildung 40 A**). In Waake waren zwischen 40% und 50% der Knollen durch Drahtwürmer beschädigt (**Abbildung 40 B**). An keinem der Standorte konnte der Anteil an beschädigten Knollen durch die Behandlungen signifikant reduziert werden.

Während in Barnstedt der Drahtwurmbefall so hoch war, dass eine wirkungsvolle Reduktion der Population, und damit des Schadens, als unwahrscheinlich gilt, scheint der gegenteilige Effekt in Hameln aufgetreten zu sein. Dort erscheint die Drahtwurmpopulation und damit der entstandene Schaden so gering zu sein, dass Effekte zwischen den Behandlungen nicht nachweisbar sind. Auf dem Versuchsfeld in Waake scheint die Behandlung mit *M. brunneum* Kapseln zu einer geringen Abnahme des Schadbildes geführt zu haben. Da bei dieser Behandlung die meisten cfu im Boden nachgewiesen werden konnten, könnte man von einer leichten Verminderung der Population ausgehen. Gründe für die schlechte Wirkung der Behandlungen könnten eine ausgeprägte Trocken- und Kälteperiode im Frühjahr 2018 gewesen sein. Insbesondere die applizierten Kapseln müssen, um wirksam zu sein, adäquat rehydrieren. Bei einer zu langsamen Aufnahme von Wasser, kann man von einer verzögerten Aktivierung des Pilzes und somit seiner Wirksamkeit ausgehen. Die Zusammenhänge müssen allerdings in weiteren (Feld-) Versuchen geklärt werden.

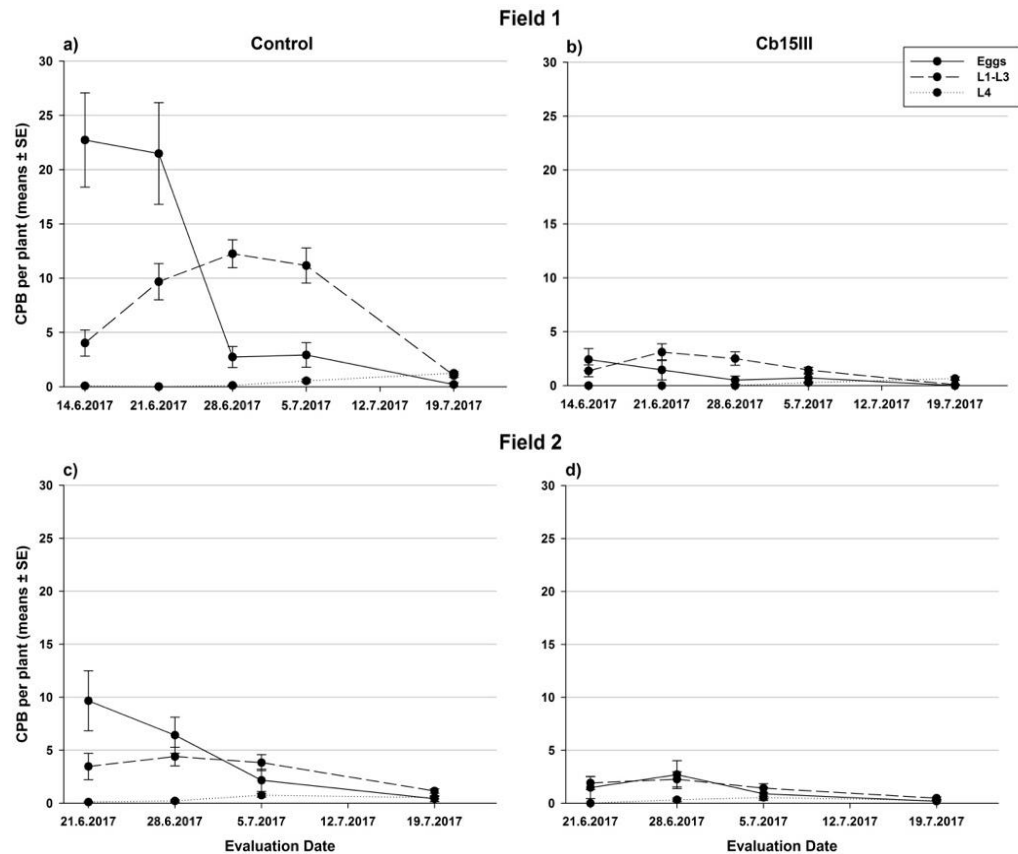


**Abbildung 40.** Durch Drahtwürmer geschädigte Kartoffelknollen in % ± Standardfehler auf den Versuchsfeldern in **A) Waake, B) Hameln und C) Barnstedt**

Basierend auf den vielversprechenden Ergebnissen aus dem Gewächshausversuch gegen Kartoffelkäfer, wurde ein weiterer Feldversuch gegen diesen Schädling durchgeführt. Insgesamt wurde zwei Standorte in der Nähe des Südniedersächsischen Ortes Etzenborn durchgeführt. Die Durchführung des Feldversuches orientierte sich an den EPPO-Richtlinien für *Leptinotarsa decemlineata*.

Es wurden zwei Behandlungen ausgewählt: eine Beimpfung der Saat-Kartoffelknollen mit einer Cb15III Sporensuspension (**Cb15III**) und eine unbehandelte Kontrolle (**Control**), jeweils mit acht Wiederholungen je Feld. Die Behandlung der vorgekeimten Saatkollen wurde wenige Tage vor dem Einpflanzen durchgeführt. Die erste Bonitur der Kartoffelpflanzen wurde beim ersten Zuflug der adulten Käfer vorgenommen und wurde danach wöchentlich wiederholt bis die Kartoffelbestände zusammengebrochen waren. Für die Bonitur wurde sowohl Anzahl der abgelegten Eier als auch die Anzahl der L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> sowie der adulten Käfer aufgenommen.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Anzahl der abgelegten Eier auf behandelten Pflanzen teils signifikant von unbehandelten Pflanzen unterscheidet (**Field 1**: RM-ANOVA  $F_{(5,10)} = 9,233$ ,  $p < 0,01$ ; **Field 2**: RM-ANOVA  $F_{(4,11)} = 3,006$ ,  $p = 0,067$ ) (**Abbildung 41**). Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Anzahl der L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub> Larven beobachtet werden (RM-ANOVA  $F_{(5,10)} = 11,523$ ,  $p < 0,001$ ), auch wenn dieser Effekt durch die verringerte Eiablage erklärt werden kann. Aufgrund eines sehr geringen Gesamtbefalles in Feld zwei, konnten hier nur geringe Unterschiede zwischen den Behandlungen beobachtet werden. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse von beiden Feldern, dass eine Knollenbehandlung mit dem *M. brunneum* Isolat einen erheblichen Effekt auf die Populationsentwicklung von Kartoffelkäfern hat. Die genauen Ursachen für den Rückgang der Eiablage an behandelten Pflanzen muss allerdings in weiterführenden Versuchen untersucht werden.



**Abbildung 41.** Durchschnittliche Anzahl an gezählten Kartoffelkäferstadien, L<sub>1</sub>-L<sub>3</sub> und L<sub>4</sub> Larven pro Pflanze (Mittelwert  $\pm$  SE) in Feld 1 (**a**) Kontrolle und **b**) Cb15III Behandlung) und Feld 2 (**c**) Kontrolle und **d**) Cb15III Behandlung) Anzahl Eier (RM-ANOVA  $F_{(5,10)} = 9,233$ ,  $p < 0,01$ ) und L<sub>1</sub> – L<sub>3</sub> Larven (RM-ANOVA  $F_{(5,10)} = 11,523$ ,  $p < 0,001$ ) auf Feld 1 unterscheiden sich signifikant zwischen Kontrolle und Treatment. Statistisch signifikante Unterschiede konnte auf Feld 2 nicht nachgewiesen werden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Inwieweit wurden die verfolgten Ziele erreicht?

Das Ziel des vorliegenden Projektes war die Entwicklung einer innovativen und vielfältig einsetzbaren Pflanzenschutzstrategie gegen verschiedene Schädlinge basierend auf der Wirkung endophytischer, entomopathogener Nutzpilze. Dieses Ziel wurde weitestgehend erreicht.

Als Ergebnis des Projektes liegt eine trocknungs- und lagerfähige Kapsel Formulierung mit einem endophytischen, entomopathogenen *Metarhizium brunneum* Isolat (CB 15 III) aus dem Göttinger Umland vor. Das Isolat tötet bei direktem Kontakt eine Vielzahl von Schadinsekten wie z.B. Kartoffelkäferlarven. Mit Hilfe der Kapsel Formulierung war es möglich, verschiedene Nutzpflanzen wie Kartoffeln und Tomaten systemisch zu kolonisieren. Im Feld verringerte die Ausbringung der entwickelten Formulierung leider nicht einen Fraßschaden durch den Drahtwurm, was jedoch z.T. mit dem Einfluss verschiedener biotischer und abiotischer Faktoren begründet werden kann. Demgegenüber konnte die Formulierung die Eiablage des Kartoffelkäfers reduzieren. Um diesen Sachverhalt weiter aufzuklären und die Formulierung weiterzuentwickeln besteht weiterer Forschungsbedarf. Zudem sollte in weiteren Projekten die

Erhöhung der Pflanzenkolonisierung durch Endophyten untersucht werden, da hier ein möglicher Schlüssel zur Verbesserung der Wirksamkeit der Formulierung liegen könnte.

Zusätzlich zu dem Einsatz gegen Schadinsekten bietet der Einsatz der entwickelten Formulierung weitere Vorteile. So kann die Verwendung der entwickelten Kapsel mit dem endophytischen *M. brunneum* Isolat das Pflanzenwachstum signifikant steigern, z.B. durch die Mobilisierung von Nährstoffen wie Stickstoff und Phosphat. Auch eine Erhöhung der Stresstoleranz z.B. gegen Trockenstress, oder eine erhöhte Resistenz gegenüber Pflanzenpathogenen erscheint aussichtsreich. Auch hier besteht weiterer Forschungsbedarf.

## **5.2 Woraus ergaben sich Abweichungen der erhaltenen Ergebnisse?**

Im Projekt ergaben sich keine größeren Abweichungen der Zielsetzung. Darüber hinaus wurden zusätzliche Ergebnisse erzielt. So konnte eine positive, zusätzliche Wirkung der Formulierung mit *M. brunneum CB 15 III* als Pflanzenstärkungsmittel ermittelt werden.

## **5.3 Wie gestaltete sich die Arbeit mit den eingebundenen Kooperationspartnern?**

Die Kooperationspartner trafen sich zusätzlich zu den gemeinsamen Gewächshaus- und Feldversuchen mindestens zwei Mal pro Jahr zu Projekttreffen. Hier wurde konstruktiv an der Umsetzung der Forschungsideen gearbeitet, Experimente ausgearbeitet und neue Erkenntnisse von/für z.B. Konferenzen diskutiert. Alle Partner beteiligten sich an den großen Experimenten mit personellen und sächlichen Ressourcen. So wurden z.B. die Fermentationen für die Freilandversuche aus Kapazitätsgründen von e-nema übernommen.

## **5.4 Wird das Vorhaben oder Teile davon weitergeführt?**

Nach Abschluss des Projektes wurde beim Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des zweistufigen Programmes FHprofUnt 2018 ein Projektantrag mit dem Titel: „Entwicklung von innovativen Formulierungsverfahren mit Nutzpilzen als neuartige Pflanzenstärkungsmittel für die Kartoffel-fruchtfolge (Akronym: FORK) gestellt. Derzeit befindet sich der Antrag bereits in der zweiten Bewilligungsphase. Der geplante Projektstart ist für Juli 2019 geplant. Neben dem Koordinator, der FH Bielefeld, sind als weitere Partner die Hochschule Rhein-Waal (Prof. Wichern) und die Unternehmen BIO-CARE und Freudenberg Saatgut im Projekt aktiv eingebunden. Das Projekt wird in Unteraufträgen vom JKI in Münster (Prof. Hallmann) und der Uni Kassel (Dr. Bruns) unterstützt. Das FORK Projekt wird inhaltlich an die Ergebnisse und aufgeworfenen Fragen des vorliegenden Projektes anknüpfen. So wird z.B. die Nährstoffmobilisierung durch einen Nutzpilz weiter beleuchtet.

Das Ziel des Projektes wird sein, Formulierungsverfahren für Nutzpilze zu entwickeln, die in die Fruchtfolge Kartoffel und Zwischenfrucht integriert werden können. So können nachhaltig gesunde Kartoffeln mit erhöhtem Ertrag produziert werden. Hierbei wird ein entomopathogener Nutzpilz im Kartoffelanbau und ein nematophager Pilz zur Verbesserung der Zwischenfrucht eingesetzt.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse zur Formulierungsmethoden, -materialien und -technologien werden zudem im neuen Projekt „Entwicklung und Einsatz von Smarten Düngemitteln und Pflanzenstärkungsmitteln für den ökologischen Heidelbeeranbau“ gefördert durch die Europäischen Innovationspartnerschaft „Produktivität und Nachhaltigkeit in der Landwirtschaft“ einfließen. Die erlangten Erkenntnisse zur Wachstumsverbesserung von Pflanzen durch verkapselte Pilze haben wir darüber hinaus in ein Projekt, in dem verkapselte Bakterien das Wachstum von Mikroalgen verbessern werden, integriert. Dieses Projekt, COMBINE, wurde soeben vom BMBF, Förderlinie IngenieurNachwuchs – Kooperative Promotion“ im Rahmen des Programms „Forschung an Fachhochschulen, bewilligt.



## 6. Öffentlichkeitsarbeit

Die erlangten Ergebnisse wurden in peer-reviewed Journals, Dissertationen, Buchartikeln und auf Fachkonferenzen in Form von Vorträgen und Postern veröffentlicht. Die besuchten Konferenzen finden sich in Tabelle 7 und Tabelle 8. Die Publikationen in Tabelle 9. Die Dissertationen in Tabelle 10.

**Tabelle 7.** Liste der besuchten Konferenzen mit Vorträgen.

Konferenzen 2015	Datum	Autoren	Titel
DPG-Tagung Pflanzenkrankheiten	11.-12.03.2015	Krell, Jakobs-Schönwandt, Patel	Entomopathogenic fungi as endophytes: enhancing their efficacy against herbivorous pests by novel fermentation and formulation strategies
7th International Symposium Plant Protection and Plant Health in Europe	12.-13.03.2015	Jakobs-Schönwandt, Krell, Lohse, Lemke, Spieth, Vidal, Patel	Entomopathogenic fungi as endophytes: supporting their biocontrol activity by novel fermentation and formulation strategies
International Plant Protection Congress	24.-27.08.2015	Krell, Jakobs-Schönwandt, Lohse, Lemke, Spieth, Hettlage, Vidal, Patel	Endophytic entomopathogenic fungi for biological crop protection: novel integrated fermentation and formulation strategies
15th Microbial and Nematode Control of Invertebrate WG Meeting	07.-11.06.2015	Jakobs-Schönwandt, Krell, Vidal, Patel	Endophytic <i>Metarhizium</i> strains against herbivorous insect pests: development of novel fermentation and formulation strategies
Biopesticides – Innovative technologies and strategies for pest control	07.- 09.09 2015	Jakobs-Schönwandt, Krell, Lohse, Lemke, Spieth, Hettlage, Vidal, Patel	Endophytic entomopathogenic fungi for biological crop protection: novel integrated fermentation and formulation strategies
International symposium “Microbe-assisted crop production – opportunities, challenges and needs”	23.-26.11.2015	Jakobs-Schönwandt, Krell, Lohse, Patel	Application techniques of fungal biocontrol endophytes
Konferenzen 2016	Datum	Autoren	Titel
Using three-way interactions between plants, microbes and arthropods to enhance crop protection and production (COST FA1405)	10.-12.02.2016	Krell, Jakobs-Schönwandt, Patel	Endophytic entomopathogenic <i>Metarhizium brunneum</i> for biological crop protection: a bioengineering approach
Society for Invertebrate Pathology (SIP)	24.-28.07.2016	Patel, Krell, Jakobs-Schönwandt, Hettlage, Vidal	Endophytic entomopathogenic <i>M. brunneum</i> against insect pests: novel integrated fermentation and formulation strategies
Plant-mediated communication between above and belowground foodwebs (COST FA1405)	14.-16.09.2016	Jakobs-Schönwandt, Krell, Hettlage, Vidal, Patel	Endophytic entomopathogenic <i>Metarhizium brunneum</i> against insect pests: novel integrated fermentation and formulation strategies
24th International Conference on Bioencapsulation	21.-23.09.2016	Krell, Jakobs-Schönwandt, Patel	Encapsulation of endophytic <i>M. brunneum</i> for biological crop protection
60. Deutsche Pflanzenschutztagung	20.- 23.09.2016	Jakobs-Schönwandt, Krell, Patel	Endophytic entomopathogenic <i>Metarhizium brunneum</i> Bipesco5 for biological crop protection: a bioengineering approach

Konferenzen 2017	Datum	Autoren	Titel
DPG-Arbeitskreis Kartoffel	01.03.2017	Hettlage, Vidal	Metarhizium behandelte Kartoffelknollen – eine neue Möglichkeit des Kartoffelkäfer Managements?
Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft (DPG) AK Biologischer Pflanzenschutz, Kiel	23.-24.03.2017	Hettlage, Vidal	New insight in the endophytic behavior of <i>Metarhizium brunneum</i> and the effects on <i>Solanum tuberosum</i> and their pests
Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft (DPG) AK Biologischer Pflanzenschutz, Kiel	23.- 24.03.2017	Krell, Jakobs-Schönwandt, Vidal, Patel	Improved penetration and colonization of potato plants with novel formulations of endophytic entomopathogenic <i>M. brunneum</i>
16th meeting of the IOBC-WPRS Working Group Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests	11.-15.06.2017	Krell, Jakobs-Schönwandt, Hettlage, Vidal, Patel	Exoenzymes improve penetration and colonization of potato plants by endophytic entomopathogenic <i>M. brunneum</i>
50th Golden Jubilee Conference of the Society for Invertebrate Pathology (SIP), San Diego, USA	13.-17.08.2017	Krell, Jakobs-Schönwandt, Vidal, Patel	Plant cell-wall degrading enzymes improve endophytic establishment of <i>Metarhizium brunneum</i> in potato plants
International Society of Chemical ecology (ISCE)/ Asian Pacific Association for Chemical Ecology (APACE)	23.-27.08.2017	Patel, Krell, Jakobs-Schönwandt, Hettlage, Vidal	Plant cell-wall degrading enzymes improve endophytism of entomopathogenic <i>M. brunneum</i> in potato plants
SUSTAIN: Endophytes for a growing world, Dublin, Irland	28.-29.08.2017	Krell, Jakobs-Schönwandt, Vidal, Patel	Plant cell-wall degrading enzymes improve endophytic establishment of <i>Metarhizium brunneum</i> in potato plants Hier entstand der Beitrag (Krell et al., 2019)
Konferenzen 2018	Datum	Autoren	Titel
61. Deutsche Pflanzenschutztagung, Hohenheim		Krell, Jakobs-Schönwandt, Vidal, Patel	Verbesserung der pflanzlichen Stresstoleranz durch eine Formulierung des endophytischen Nutzpilzes <i>Metarhizium brunneum</i> CB15
Annual Biocontrol Industry Meeting (ABIM) Basel, Switzerland		Jakobs-Schönwandt, Krell, Unger, Patel	Novel fermentation and formulation strategies to support plant colonization by fungal endophytes
DPG-Arbeitskreis Kartoffel	07.03.2018	Fischer, Hettlage, Vidal	Einsatz von mit <i>Metarhizium brunneum</i> beimpften Kartoffelknollen zur Bekämpfung von <i>Leptinotarsa decemlineata</i> im Freiland, DPG-Arbeitskreis Kartoffel
Konferenzen 2019	Datum	Autoren	Titel
COST Action: FA1405 Final Annual and MC Meeting. Thessaloniki, Griechenland	23.- 25.01.2019	Jakobs-Schönwandt, Krell, Unger, Patel	Novel fermentation and formulation strategies to support plant colonization by fungal endophytes
Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft (DPG) AK Biologischer Pflanzenschutz, Bielefeld	21.-22.03.2019	Jakobs- Schönwandt, Krell, Unger, Patel	Novel fermentation and formulation strategies to support plant colonization by fungal endophytes
Microbiota, Cartagena, Spanien	29-30.05.2019	Jakobs- Schönwandt, Krell, Unger, Patel	Formulation of agrobiologicals: Scientific and Technical aspects

**Tabelle 8.** Liste der besuchten Konferenzen mit Poster.

Konferenz 2015-2019	Datum	Autoren	Titel
Entomologentagung	03.-05.03.2015	Patel, Krell, Jakobs-Schönwandt, Hettlage, Vidal	Entomopathogenic fungi as endophytes: enhancing their efficacy against herbivorous pests by novel fermentation and formulation strategies
Science Fair	26.03.2015	Krell	Biological crop protection with fungi from within: novel strategies against insect pests
International Plant Protection Congress	24.-27.08.2015	Krell, Jakobs-Schönwandt, Hettlage, Vidal, Patel	Plant protection with endophytic <i>M. brunneum</i> Bipesco5: an integrated fermentation and formulation approach
Biopesticides – Innovative technologies and strategies for pest control	07.-11.06.2015	Krell, Jakobs-Schönwandt, Vidal, Patel	Crop protection with endophytic entomopathogenic <i>Metarhizium brunneum</i> : novel fermentation and formulation strategies
24th International Conference on Bioencapsulation	21.-23.09.2016	Krell, Jakobs-Schönwandt, Patel	Impact of culture age and endogenous polyol content on <i>M. brunneum</i> shelf life
60. Deutsche Pflanzenschutztagung	20.- 23.09.2016	Jakobs-Schönwandt, Krell, Patel	A bioprocess engineering approach to improve endophytic entomopathogenic <i>Metarhizium brunneum</i> Bipesco5 shelf life
60. Deutsche Pflanzenschutztagung	20.- 23.09.2016	Hettlage, Jakobs-Schönwandt, Krell, Patel, Vidal	Mit <i>Metarhizium brunneum</i> behandelte Saatknochen als neue Bekämpfungsstrategie gegen den Kartoffelkäfer ( <i>Leptinotarsa decemlineata</i> SAY)
16th meeting of the IOBC-WPRS Working Group Microbial and Nematode Control of Invertebrate Pests	11.-15.06.2017	Krell, Jakobs-Schönwandt, Hettlage, Vidal, Patel	Enhanced colonization of tomato plants by encapsulation of endophytic entomopathogenic <i>M. brunneum</i>
Tropentag, Bonn	20.-22.09.2017	Krell, Jakobs-Schönwandt, Vidal, Patel	Improved <i>M. brunneum</i> endophytism for biological protection of potato plants

**Tabelle 9:** Publikationen in peer reviewed Journals

Autoren	Titel
Krell, V., Jakobs-Schoenwandt, D., Persicke, M., Patel, A.V., 2018a.	Endogenous arabitol and mannitol improve shelf life of encapsulated <i>Metarhizium brunneum</i> . World Journal of Microbiology & Biotechnology 34.
Krell, V., Jakobs-Schoenwandt, D., Vidal, S., Patel, A.V., 2018b.	Cellulase enhances endophytism of encapsulated <i>Metarhizium brunneum</i> in potato plants. Fungal Biology 122, 373-378.
Krell, V., Jakobs-Schoenwandt, D., Vidal, S., Patel, A.V., 2018c.	Encapsulation of <i>Metarhizium brunneum</i> enhances endophytism in tomato plants. Biological Control 116, 62-73.
Krell, V., Unger, S., Jakobs-Schoenwandt, D., Patel, A.V., 2018d.	Endophytic <i>Metarhizium brunneum</i> mitigates nutrient deficits in potato and improves plant productivity and vitality. Fungal Ecology 34, 43-49.
Krell, V., Unger, S., Jakobs-Schoenwandt, D., Patel, A.V., 2018e.	Importance of phosphorus supply through endophytic <i>Metarhizium brunneum</i> for root:shoot allocation and root architecture in potato plants. Plant and Soil 430, 87-97.
Krell, V., Jakobs-Schoenwandt, D., Patel, A.V., 2019.	Application of Formulated Endophytic Entomopathogenic Fungi for Novel Plant Protection Strategies. Cambridge University Press.  (Buchbeitrag, in Endophytes for a Growing World (2019), Herausgeber: Hodkinson, Doohan, Saunders and Murphy, Cambridge University Press, ISBN: 1108471765

**Tabelle 10:** Aus dem Projekt entstandene Dissertationen

Autor/ Ort/ Jahr	Titel der Dissertation
Krell, Vivien Göttingen, 2018	Development of fermentation and formulation strategies for endophytic entomopathogenic <i>Metarhizium brunneum</i>
Hettlage, Laurenz, Göttingen, 2018	Use of an entomopathogenic, endophytic <i>Metarhizium brunneum</i> isolate (Cb15III) to manage wireworm and Colorado potato beetle

## 7. Fazit

### 7.1 Hat sich die Vorgehensweise bewährt?

Die Vorgehensweise des vorliegenden Projektes hat sich grundsätzlich bewährt. Für weitere Projekte wäre es allerdings empfehlenswert, einen größeren Fokus bzw. mehr Zeit und Personal in die Freilandversuche zu investieren, um ungünstige Faktoren wie Wetterphänomene, mangelnden oder zu starken Befallsdruck oder spezielle Bodenverhältnisse (mikrobielle Aktivität) kompensieren zu können. Auch fehlt es noch an Erkenntnissen in der Grundlagenforschung zur Interaktion von endophytischen entomopathogenen Pilzen mit Pflanzen sowie mit höheren trophischen Ebenen. Auch eine breitere Aufstellung in Form verschiedener regionaler Standorte erscheint sinnvoll. Mehr Personal und größere Feldflächen würden zudem auch noch die Untersuchung weiterer Formulierungen ermöglichen.

### 7.2 Welche Zielgruppen werden in welcher Form angesprochen?

Die Ergebnisse des Projektes wurden auf nationalen und internationalen Fachkonferenzen einem breiten Publikum zugänglich gemacht. Auf diesen Tagungen konnten so neben Forschern auch Firmen und Institute erreicht werden. Durch die aktive Arbeit aller Partner im Projekt wurden zudem auch Landwirte informiert und oft auch in die Freilandversuche mit eingebunden. Durch die Veröffentlichung in Fachzeitschriften und einem Buch sind die Ergebnisse zudem so gesichert, dass sie auch nach Beendigung des Projektes weiter abrufbar sind. Einen weiteren positiven Effekt hatte das Projekt außerdem. Durch die vielen guten Resultate wurden/werden die Projektpartner regelmäßig auf Konferenzen und zu Meetings eingeladen, um ihre Forschung vorzustellen.

Aus dem Projekt heraus ergaben sich viele neue Kontakte zu Hochschulen und der Industrie, die sicherlich in diversen neuen Projekten münden werden.

Vielen Dank für Ihre Unterstützung und die Förderung des Projektes.

## 8. Anlagen/Anhang

### 8.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Fließschema zum Ablauf des Projektes „Biologischer Pflanzenschutz mit innovativen Formulierungen von endophytischen entomopathogenen Pilzen gegen Schadinsekten“.	5
<b>Abbildung 2.</b> Zeitplan des Projektes „Biologischer Pflanzenschutz mit innovativen Formulierungen von endophytischen entomopathogenen Pilzen gegen Schadinsekten“.	6
<b>Abbildung 3.</b> Schematische Darstellung der Probenentnahme, die sowohl auf einer Grünlandfläche (G) als auch auf einer Ackerfläche (C) durchgeführt wurden.	7
<b>Abbildung 4</b> Hierarchische Clusteranalyse der isolierten	8
<b>Abbildung 5.</b> (A): <i>T. molitor</i> Larven in einem Plastikschrälchen mit Erde/ Vermiculit Gemenge (5:1), (B): <i>T. molitor</i> Larven mit ausgeprägter Mykose, ausgelöst durch den Befall mit <i>Metarhizium</i> spp.	8
<b>Abbildung 6.</b> Mittelwert der vitalen Larven $\pm$ SF (Standardfehler) nach Tagen: 0= Versuchsbeginn, 20= Ende des Versuchs. (*) zeigt signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollgruppe an, $p < 0,05$ (Dunnnett-post-hoc-Test)	8
<b>Abbildung 7.</b> (A): Abgeschnittenes Tomatenblatt in präparierten Petrischalen, (B): aus dem Tomatenblatt auswachsende Wurzeln.	9
<b>Abbildung 8.</b> Ergebnisse des „2. Petrischalenversuches“. In grün sind die vitalen Larven und Puppen dargestellt, die bei der Bonitur gefunden wurden.	10
<b>Abbildung 9</b> Überlebensrate von Kartoffelkäferlarven nach Behandlung mit einer <i>M. brunneum</i> Cb15III Sporensuspension. Die Überlebensrate war signifikant verkürzt im Vergleich zur Kontrollgruppe (Log-Rank test: ( $\chi^2 = 8.65$ ; DF = 1, $p < 0.01$ ).	11
<b>Abbildung 10.</b> Einfluss von Medienkompositionen und des pH-Wertes auf die Produktion von Blastosporen des Pilzisolates <i>M. brunneum</i> Bipesco5.	13
<b>Abbildung 11.</b> Einfluss von Medienzusätzen und deren Konzentrationen auf die Bildung von <i>Metarhizium brunneum</i> Bipesco5 Trockenmyzelbiomasse, Blastosporen und Myzelpelletedurchmesser. (A): 7,5% Glukose mit verschiedenen ANiPept-Konzentrationen (1,5%; 2,0%; 3,0%; 4,0%), (B): 7,5% Glukose, 4,0% ANiPept mit verschiedenen PEG 200-Konzentrationen (0%; 2,0%; 5,0%; 7,0%), (C): 7,5% Glukose, 4,0% ANiPept, 7,0% PEG 200 mit verschiedenen Kartoffelstärke-Konzentrationen (0%; 0,2%; 0,5%; 1,0%), (D): wie (C), aber mit vegetativer Vorkultur als Inokulum anstatt von Aeroconidien.	15
<b>Abbildung 12.</b> Beispielfermentation zu der Untersuchung des Einflusses der Gelöstsauerstoffkonzentration ( $rpO_2 = 60\%$ ) auf die selektive Bildung von <i>M. brunneum</i> Bipesco5 Hyphen im 2L-Rührkesselreaktor ( $n = 4$ ).	17
<b>Abbildung 13.</b> Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration auf die Bildung von <i>M. brunneum</i> Bipesco5 Biomasse im 2L-Rührkesselreaktor ( $n = 4$ ). (A): Hyphen, (B): Blastosporen. ant.	17
<b>Abbildung 14.</b> Einfluss der Gelöstsauerstoffkonzentration auf die Morphologie von <i>M. brunneum</i> Bipesco5 im 2L-Rührkesselreaktor. (A): $rpO_2 = 60\%$ , (B): $rpO_2 = 30\%$ , (C): $rpO_2 = 10\%$ , Verdünnung 1:10, (D): $rpO_2 = 10\%$ , Verdünnung 1:10 mit vergrößertem Ausschnitt aus C.	18
<b>Abbildung 15.</b> (A): Tomatenblatt mit neu ausgebildeter Wurzel, (B): Applikation der Wirkstoffkapseln in der Petrischale, (C): vollständig ausgebildetes Wurzelsystem in der Petrischale mit Kapseln.	19
<b>Abbildung 16.</b> Durchschnittlich geschlüpfte adulte Motten in % $\pm$ Standardfehler.	19
<b>Abbildung 17.</b> Durchschnittliche gefressene Blattfläche in $mm^2 \pm$ Standardfehler.	19
<b>Abbildung 18.</b> Anzahl der durchschnittlich geschlüpfte adulten Kartoffelkäfer $\pm$ Standardfehler nach Tagen nach dem Ansetzen der Larven.	20
<b>Abbildung 19.</b> Durchschnittliche Tibia-Länge der re-isolierten adulten Käfern in $mm \pm$ Standardfehler. ANOVA $F_{2,33} = 1,65$ ; $p = 0,21$ .	21
<b>Abbildung 20.</b> REM-Aufnahmen der inneren Strukturen in feuchten Calcium-Alginatkapseln mit eingeschlossenen <i>M. brunneum</i> Bipesco5 Hyphenfragmenten nach einer Inkubationszeit von 0, 7, 14 und 21 Tagen (Maßstab: 20 $\mu m$ , Vergrößerung: 1000x).	22
<b>Abbildung 21.</b> Stärkeabbau durch verkapselte <i>M. brunneum</i> Bipesco5 Hyphenfragmente in feuchten Calcium-Alginatkapseln über eine Inkubationszeit von 0, 7, 14 und 21 Tagen.	22
<b>Abbildung 22.</b> Einfluss der Kapselumgebung auf den Auswuchs von <i>M. brunneum</i> Bipesco5 aus feuchten Calcium-Alginatkapseln nach 21 Tagen. (A): Exemplarisches Bild einer Kapsel mit Myzelwachstum nach Inkubation auf unsterilem Zierpflanzensubstrat (Maßstab: 1 mm, Vergrößerung: 20x), (B): radiales Myzelwachstum von Kapseln auf drei standardisierten Böden (Schlicksand, lehmiger Sand, toniger Lehmboden), Kompostboden, Zierpflanzensubstrat (*sterilisiert) und Kontrollsubstrat (Wasseragar)..	23
<b>Abbildung 23.</b> Einfluss der Formulierungsadditive Cellulose (C), inaktivierte Bäckerhefe (N) und Cellulase (E) auf die Cellulaseaktivität von Kapseln mit amidiertem Pektin, Stärke und <i>M. brunneum</i> Cb15 Myzel (myc) nach 28 Tagen.	24

<b>Abbildung 24.</b> Einfluss der Formulierungsadditive Cellulose (C), inaktivierte Bäckerhefe (N) und Cellulase (E) auf das Wachstum des Pilzes von Kapseln mit amidiertem Pektin, Stärke und <i>M. brunneum</i> Cb15 Myzel (myc) nach 28 Tagen. (A): Radiales Myzelwachstum, (B): Sporenbildung an der Kapseloberfläche....	25
<b>Abbildung 25.</b> Einfluss der Verkapselung von <i>M. brunneum</i> Bipesco5 Hyphenfragmenten (myc) in Calcium-Alginatkapseln auf die Trocknungsstabilität. (A): Hyphenfragmente (Maßstab: 50 µm, Vergrößerung: 40x), (B): getrocknete Calcium-Alginatkapseln (Maßstab: 5 mm), (C): Überlebensrate von nicht-verkapselten (NF-myc) und verkapselten Hyphenfragmenten (F-myc).	26
<b>Abbildung 26.</b> Einfluss des Kulturalters auf den Gehalt endogener Polyole und Trehalose in <i>M. brunneum</i> Bipesco5 Hyphenfragmenten.....	26
<b>Abbildung 27.</b> Einfluss des Kulturalters auf die Trocknungsstabilität von verkapselten <i>M. brunneum</i> Bipesco5 Hyphenfragmenten.....	27
<b>Abbildung 28.</b> Einfluss des Kulturalters auf die Lagerstabilität von verkapselten <i>M. brunneum</i> Bipesco5 Hyphenfragmenten bei verschiedenen Lagertemperaturen. (A): 5°C, (B): 18°C, (C): 25°C. ....	28
<b>Abbildung 29.</b> Einfluss von Verkapselung von <i>M. brunneum</i> Bipesco5 Hyphenfragmenten in Calcium-Alginatkapseln auf die endophytische Kolonisierung von Stängeln von Tomatenpflanzen 21 Tage nach Wurzelinokulation.....	29
<b>Abbildung 30.</b> Einfluss der Formulierungsadditive Cellulose (C), inaktivierte Bäckerhefe (N) und Cellulase (E) auf die endophytische Kolonisierung von Kartoffelpflanzen durch <i>M. brunneum</i> Cb15 21 Tage nach Applikation von Kapseln mit amidiertem Pektin, Stärke und <i>M. brunneum</i> Cb15 Myzel (myc).....	30
<b>Abbildung 31.</b> Einfluss von <i>M. brunneum</i> Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf das Wachstum von Kartoffelpflanzen. (A): Trockenbiomasse mit Wurzeln, Stängel und Blättern, (B): Wurzel-zu-Spross-Verhältnis.....	32
<b>Abbildung 32.</b> Einfluss von <i>M. brunneum</i> Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf den Stickstoff- und Phosphorgehalt in Kartoffelpflanzen. (A): Stickstoffgehalt, (B): Phosphorgehalt.....	32
<b>Abbildung 33.</b> Einfluss von <i>M. brunneum</i> Cb15 Verkapselung .....	33
<b>Abbildung 34.</b> Einfluss von <i>M. brunneum</i> Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf die Anzahl von Wurzelspitzen, -kreuzungen und -gabelungen von Kartoffelpflanzen. ....	33
<b>Abbildung 35.</b> Einfluss der Bodenfertilität (nährstoffarm: -Fertilizer, nährstoffreich: +Fertilizer) auf die endophytische Kolonisierung von Kartoffelpflanzen durch <i>M. brunneum</i> Cb15. ....	34
<b>Abbildung 36.</b> Einfluss von <i>M. brunneum</i> Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf die Trockenbiomasse von Kartoffelpflanzen, die in nährstoffarmen (-Fertilizer) und nährstoffreichen Bedingungen (+Fertilizer) kultiviert wurden. ....	35
<b>Abbildung 37.</b> Einfluss von <i>M. brunneum</i> Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf die Blattoberfläche von Kartoffelpflanzen, die in nährstoffarmen (-Fertilizer) und nährstoffreichen Bedingungen (+Fertilizer) kultiviert wurden. ....	35
<b>Abbildung 38.</b> Einfluss von <i>M. brunneum</i> Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf die effektive ( $\Delta F/F_m$ ) und maximale Quantenausbeute ( $F_v/F_m$ ) von Photosystem II in Kartoffelpflanzen. (A): Nährstoffarme Bedingungen (-Fertilizer), (B): nährstoffreiche Bedingungen (+Fertilizer). ....	36
<b>Abbildung 39.</b> Einfluss von <i>M. brunneum</i> Cb15 Verkapselung in Calcium-Pektinamid auf den Stickstoff- und Phosphorgehalt in Kartoffelpflanzen, die in nährstoffarmen (-Fertilizer) und nährstoffreichen Bedingungen (+Fertilizer) kultiviert wurden. (A): Stickstoffgehalt, (B): Phosphorgehalt. ....	36
<b>Abbildung 40.</b> Durch Drahtwürmer geschädigte Kartoffelknollen in % $\pm$ Standardfehler auf den Versuchsfeldern in	38
<b>Abbildung 41.</b> Durchschnittliche Anzahl an gezählten Kartoffelkäferiern, L <sub>1</sub> -L <sub>3</sub> und L <sub>4</sub> Larven pro Pflanze (Mittelwert $\pm$ SE) in Feld 1 (a) Kontrolle und b) Cb15III Behandlung) und Feld 2 (c) Kontrolle und d) Cb15III Behandlung) Anzahl Eier (RM-ANOVA $F_{(5,10)} = 9.233$ , $p < 0.01$ ) und L <sub>1</sub> – L <sub>3</sub> Larven (RM-ANOVA $F_{(5,10)} = 11.523$ , $p < 0.001$ ) auf Feld 1 unterscheiden sich signifikant zwischen Kontrolle und Treatment . Statistisch signifikante Unterschiede konnte auf Feld 2 nicht nachgewiesen werden. ....	39

## 8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 LT <sub>50</sub> in Tagen (Median ± Standardfehler (SE) und 95% oberes und unteres Konfidenzintervall (CI)), Mortalität und Mykoserate (beides in %) von <i>Agriotes lineatus</i> , <i>A. obscurus</i> und <i>A. sputator</i> nach der Inokulation mit <i>M. brunneum</i> (Isolat: Cb15III und Gc2II)	10
Tabelle 2 Re-Isolierungsrate (in %) von <i>M. brunneum</i> und anderen Pilzen aus neuen Sprossen verschiedener Kartoffelsorten auf semi-selektiven Nährmedium (2 x 2 table Fisher's exact test $\alpha = 0.05$ ).	11
Tabelle 3. Zusammenstellung verschiedener Medienkompositionen und deren Einfluss auf die Bildung von Submerssporen und unerwünschter Myzelpellets des Isolates <i>M. brunneum</i> Bipesco5	13
Tabelle 4. Einfluss von Medienzusätzen und Konzentrationen auf die dynamische Viskosität und Osmolarität von Mediensuspensionen.	16
Tabelle 5. Kürzel, sowie die genaue Beschreibung der in dem Versuch verwendeten Behandlungen.	18
Tabelle 6. Durchschnittliche Anzahl der Kolonien formenden <i>Metarhizium</i> spp. Einheiten (cfu) pro 1 g Boden zum Zeitpunkt der Aussaat und der Ernte je Behandlung und Standort.	37
Tabelle 7. Liste der besuchten Konferenzen mit Vorträgen.	41
Tabelle 8. Liste der besuchten Konferenzen mit Poster.	43
Tabelle 9: Publikationen in peer reviewed Journals	44
Tabelle 10: Aus dem Projekt entstandene Dissertationen	44

## 8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
cfu	koloniebildenden Einheit
EEPs	endophytische entomopathogene Pilzisolare
LT50	median lethal time, mittlere Zeit bis zum Absterben von 50% der Insekten
Nested-PCR	Nested polymerase chain reaction, Modifizierte PCR zur Reduktion unspezifischer Bindungen
q-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
SE	standard error, Standardfehler
rpm	Umdrehungen pro Minute
mL	Milliliter
neonate	Neugeschlüpfte
w/w	Gewichtsprozent
v/w	Volumenprozent
REM	Rasterelektronenmikroskopie
$\Delta F/F_m'$	effektive Quantenausbeute von Photosystem II
$F_v/F_m$	maximale Quantenausbeute von Photosystem II
df	Freiheitsgrad
SE	Standardfehler