

Elektrogesponnene Nanofaser-Pheromon-Dispenser zur Regulierung des Bekreuzten Traubenwicklers (*Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller 1775))

Hein, D. F.¹, Lindner, I.¹, Deuker, A.¹, Hummel, H. E.¹, Leithold, G.¹, Vilcinskis, A.², Greiner, A.³, Wendorff, J. H.³, Hellmann, C.³, Breuer, M.⁴, Kratt, A.⁵ und Kleeberg, H.⁵

Keywords: mating disruption, pheromones, dispensers, nanofibers, electrospinning.

Abstract

*One of the main applications of pheromones in plant protection seeks disruption of natural male-female chemical communication. This behavioural communication disruption is species specific and is virtually free of biochemical resistance formation in target pests. Currently available dispensers for release of pheromones suffer from variable release rates and must be applied manually which restrict the application of the mating disruption technique in a wider range of insect pests, e.g. the "billion dollar beetle" *Diabrotica virgifera virgifera*. Biodegradable organic nanofibers used in our study were made by electrospinning and were charged with the insect sex pheromone during the electrospinning process itself. Here we present evidence for the principle efficiency of electrospun nanofibers for mating disruption purposes, using the example of *Lobesia botrana* in vine. In contrast to the established dispenser type, our nanofiber-pheromone-dispenser can be principally distributed in the field by non-manual means, a key demand for the commercial implementation of the mating disruption technique in annual row crops. Modifications of the fibres, currently under development, open up the possibility of extending the disruption effect to a period of several months duration and will lead to nanofibers distributed by direct electrospinning in the field.*

Einleitung und Zielsetzung

Sexualpheromone zur Verwirrung von Schadinsekten werden seit den 1980er Jahren weltweit mit großem Erfolg im Pflanzenschutz eingesetzt, insbesondere im Anbau von Baumwolle, in der Produktion von Schalenfrüchten und im Obst- und Weinbau. Als wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens ist die fehlende Anwendbarkeit von Lockstoffen in Flächenkulturen (z.B. Mais) im integrierten und ökologischen Landbau zu sehen, da die Applikation der Wirkstoffe nur manuell erfolgen kann. Daher ist die Entwicklung von Verfahren zur *mechanischen* Applikation von Sexualpheromonen notwendig, um deren Anwendungsmöglichkeiten zu erweitern und die Verfahrenskosten, insbesondere durch die Einsparung von Handarbeit, zu senken. Im Rahmen des vom BMELV geförderten Forschungsprojektes „Nanofasern als neuartige Träger für flüchtige Signalstoffe zur biotechnischen Regulierung von Schadinsekten im integrierten und ökologischen Landbau“ werden aktuell von einem Konsortium

¹ Justus-Liebig-Universität Gießen, Professur für Organischen Landbau, Karl-Glöckner-Str. 21 C, 35394 Gießen, organ.landbau@agr.uni-giessen.de

² Justus-Liebig-Universität Gießen, Professur für Angewandte Entomologie, Heinrich-Buff-Ring 26, 35394 Gießen, Andreas.Vilcinskis@agr.uni-giessen.de

³ Philipps-Universität Marburg, Institut für physikalische Chemie, Kernchemie und makromolekulare Chemie, Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg, Greiner@staff.uni-marburg.de, Wendorff@staff.uni-marburg.de

⁴ Staatliches Weinbauinstitut Freiburg, Referat Ökologie, Merzhauserstr. 119, 79100 Freiburg, Michael.Breuer@wbi.bwl.de

⁵ Trifolio-M GmbH, Dr.-Hans-Wilhelmi-Weg 1, 35633 Lahnau, Armin.Kratt@trifolio-m.de

aus Wissenschaftlern und klein- und mittelständischen Unternehmen erste Grundlagen zur Anwendung der Nanotechnologie im Pflanzenschutz erarbeitet (Hein *et al.* 2009b).

Die Idee zur Nutzung elektrogesponnener Nanofasern als Pheromon-Dispenser im Pflanzenschutz ist bisher einzigartig. Als Gesamtziel ist die Entwicklung von Verfahren zur mechanischen Applikation von Sexualpheromonen im Freiland unter Nutzung von Nanofasern als Trägermaterial zu sehen. Dabei werden bio-abbaubare, pheromonbeladene, elektrogesponnene Nanofasern als Dispensersystem in dem in einigen Kulturarten (z.B. im Weinbau) etablierten Verwirrungsverfahren eingesetzt. Im Moment fungieren die beiden wichtigsten Schaderreger im Weinbau, die Traubenwicklerarten *Eupoecilia ambiguella* Hübn. und *Lobesia botrana* Den. & Schiff. als Modellinsekten. In naher Zukunft aber soll durch den Einsatz direkt gesponnener Nanofaser-Pheromon-Dispenser die Möglichkeit bestehen, die Pheromonanwendung auch auf Schädlinge anderer Kulturen zu übertragen, so z.B. auf den westlichen Maiswurzelbohrer *Diabrotica virgifera virgifera*.

Als Vorteile dieses Lösungsansatzes sind zu nennen:

- die Vermeidung des Einsatzes von chemischen Pflanzenschutzmitteln,
- die Maßanfertigung der Polymernanofasern mit bestmöglicher Funktionsweise im Pflanzenschutz,
- die minimalen Applikationsmengen an Fasermaterial und Wirkstoff,
- die Möglichkeit der kostengünstigen mechanischen Dispenserausbringung sowie
- die hohen Erfolgsaussichten für die technische Umsetzbarkeit.

Das bundeseigene Julius Kühn-Institut überwacht durch eine Folgenabschätzung zum Einsatz von Nanofasern in der Landwirtschaft diesen Forschungsansatz.

Material und Methoden

Pheromon-Dispenser

Die verwendeten Nanofaser-Pheromon-Dispenser wurden durch Elektrospinnen (Greiner & Wendorff 2007) aus dem kommerziell erhältlichen, bioabbaubaren Polymer Ecoflex® (BASF) erzeugt. Der Einbau des *L. botrana*-Sexpheromons (E,Z)-7,9-Dodecadienylacetat in die Nanofasern geschah während des eigentlichen Elektrospinnprozesses (Hellmann *et al.* 2009). Die Nanofaser-Dispenser wurden im Labor hergestellt und dann im Weinberg ausgebracht. Kommerziell erhältliche Isonet LE-Dispenser (Shin-Etsu Chemicals) dienen als Vergleichsmittel. Laboruntersuchungen zum Abgabeverhalten der Nanofaser-Pheromon-Dispenser wurden von Hein *et al.* (2009a) beschrieben.

Käfigversuche

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der pheromonbeladenen Nanofasern als Verwirrungsdispenser wurde ein am Staatlichen Weinbauinstitut Freiburg (WBI) neu entwickelter Käfigversuch (Doyé & Koch 2005, Doyé 2006) angewandt. Als Prüfkriterium dient die Fähigkeit der Traubenwickler-Männchen, sich auf eine Pheromon-Punktquelle hin zu orientieren. Jeder Flugkäfig inmitten der Versuchsparzelle wurde mit zwei Klebefallen bestückt, in denen frisch geschlüpfte *L. botrana*-Weibchen als natürliche Lockstoffquelle dienten (Götz 1941) und in die in regelmäßigen Abständen *L. botrana*-Männchen freigelassen wurden. In der 2.000 m² großen Versuchsparzelle um den Käfig herum wurden die Dispenser gleichmäßig verteilt. Die Dispenserdichte betrug ein Stück je 20 m², was der empfohlenen Ver-

teilung und Aufwandmenge der kommerziell erhältlichen Pheromon-Dispenser von 112 g/ha (E,Z)-7,9-Dodecadienylacetat entsprach. Die Prüfmittel wurden als feine Schicht pheromonhaltiger Ecoflex®-Fasern mit einem Pheromongehalt von 333 g/ha ausgebracht. Eine dritte Variante ohne Dispenser diente als Kontroll-Variante. Insgesamt erfolgten in dem Käfig vier Freilassungen von je 40 Männchen. Die in diesen Versuchen eingesetzten Insekten entstammten der Laborzucht des WBI. Werden *keine* Männchen in der Klebefalle gefangen, ist eine 100 %-ige Verwirrung gegeben. Um die unterschiedlichen Rückfangzahlen in der Kontrollvariante zu berücksichtigen, wurden diese Rückfänge gleich 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

Ergebnisse

In den ersten drei Wochen des Experimentes lag die Wirksamkeit der Nanofaser-Pheromon-Dispenser auf dem gleichen Niveau wie diejenige der Isonet LE-Dispenser.

Tabelle 1: Rückfänge männlicher Traubenwickler in der Nanofaser- sowie der Isonet LE-Variante, Mittelwert aus drei Experimenten, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

	Nanofasern	Isonet LE	Kontrolle
Woche 1*	11 %	6 %	100 %
Woche 2*	12 %	7 %	100 %
Woche 3*	7 %	2 %	100 %
Woche 4	56 %	9 %	100 %

* Nanofasern und unbehandelte Kontrolle signifikant verschieden, $P < 0,001$,

zwischen Nanofasern und Isonet LE keine signifikanten Unterschiede, $P > 0,05$;

10 % der in der Nanofaser-Variante freigelassenen Männchen und 5 % in der Isonet LE-Variante wurden im Durchschnitt zurückgefangen, verglichen mit 100 % in der unbehandelten Kontrolle (s. Tab. 1). In der vierten Woche fiel der Verwirrungseffekt in der Prüfmittel-Variante, mit 56 % Rückfang, ab. Zu dieser Zeit betrug der Rückfang in der Vergleichsvariante 9 %.

Diskussion und Schlussfolgerungen

Der Verwirrungserfolg der Nanofaser-Pheromon-Dispenser ist in den ersten drei Wochen des Versuchs ausgezeichnet (hoch-signifikant verschieden zur Kontrolle, $P < 0,001$) und vergleichbar mit dem Ergebnis des Isonet LE-Dispensers (kein signifikanter Unterschied zwischen Prüf- und Vergleichsmittel, $P > 0,05$). In der vierten Woche finden wir jedoch eine Reduktion des Verwirrungserfolges in der Nanofaser-Variante auf ein nicht mehr zufriedenstellendes Niveau. Insgesamt ließ sich anhand dieser Versuchsergebnisse die prinzipielle Tauglichkeit von Dispensern aus elektrogewebenen, organischen Nanofasern zur Insektenverwirrung nachweisen. Durch Modifikationen in der Nanofaser-Zusammensetzung streben wir eine deutliche Wirkungsverlängerung und einen reduzierten Wirkstoffbedarf an.

Die in diesen Experimenten eingesetzten Nanofasern wurden vorab im Labor gesponnen und dann manuell im Feld verteilt. Um Handarbeit einzusparen, wird auch an einem Verfahren gearbeitet, mit dem die vorgefertigten Fasern mechanisch im Weinberg ausgebracht werden können.

Die Regulation von *L. botrana* im Weinberg durch elektrogewebene Nanofaser-Pheromon-Dispenser dient lediglich als Modellsystem. Das wesentlichere Ziel ist die Ausweitung der Verwirrungsmethode auf Flächenkulturen, wie z.B. Mais mit dem Westlichen Mais-

wurzelbohrender *Diabrotica virgifera virgifera* (Hummel et al. 2009) oder dem Roten Baumwollkapselwurm *Pectinophora gossypiella* in Baumwolle (Gaston et al. 1977). Jedoch ist in großflächigen Beständen die manuelle Verteilung vorgefertigter Verwirrungsdispenser unwirtschaftlich. Daher wird ein Verfahren entwickelt, das die gleichzeitige Herstellung und Ablage der Nanofaser-Pheromon-Dispenser auf den Pflanzen ermöglicht. Dieses direkte Elektrosponnen ist die Voraussetzung für eine wirtschaftlich erfolgreiche Einführung dieses technischen Verfahrens in einjährigen Flächenkulturen.

Parallel zu den technischen Entwicklungen werden durch das Julius Kühn-Institut ökotoxikologische Untersuchungen zum Einfluss des Verfahrens auf Mensch und Natur durchgeführt, wodurch negative Auswirkungen ausgeschlossen werden sollen.

Danksagung

Die Förderung des Vorhabens „Nanofasern als neuartige Träger für flüchtige Signalstoffe zur biotechnischen Regulierung von Schadinsekten im integrierten und ökologischen Landbau“ erfolgt aus Mitteln des deutschen Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) im Rahmen des Programms zur Innovationsförderung.

Literatur

- Doyé E, Koch U (2005) A reliable field test for the efficiency of mating disruption techniques. IOBC/WPRS Bulletin Vol. 28:325-329
- Doyé E (2006) Entwicklung eines Freilandtests zur Überprüfung der Wirksamkeit von Pheromonanwendungen im Weinbau. Dissertation Universität Kaiserslautern, Fachbereich Biologie. URL: http://www.landwirtschaft-mlr.baden-wuerttemberg.de/servlet/PB/show/1194179_11/WBI_Dissertation%20Doye%202006.pdf
- Gaston LK, Kaae RS, Shorey HH, Sellers D (1977) Controlling the pink bollworm by disrupting sex pheromone communication between adult moths. Science 196:904–905
- Götz B (1941) Der Sexuallockstoff als Bekämpfungsmittel gegen die Traubenwickler im Freiland. Wein und Rebe 23:75-89
- Greiner A, Wendorff JH (2007) Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. Angew. Chem. Int. Ed. 46:5670-5703
- Hein DF, Leithold G, Hummel HE, Vilcinskas A, Greiner A, Wendorff JH, Dersch R, Hellmann Ch, Breuer M, Kratt A (2009a) Nanofibers as novel carriers for semiochemicals in plant protection. Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent. 17:105-108
- Hein DF, Leithold G, Hummel HE, Vilcinskas A, Greiner A, Wendorff JH, Dersch R, Hellmann Ch, Breuer M, Beer H, Schroer S, Kratt A, Kleeberg H, Schulze Ch, Wahl F (2009b) Nanofasern als neuartige Träger für flüchtige Signalstoffe zur biotechnischen Regulierung von Schadinsekten im integrierten und ökologischen Landbau. In: Mayer J et al. (Hrsg.): Beiträge zur 10. WiTa Organischer Landbau, Zürich 2009, Dr. Köster Berlin, S. 308-311
- Hellmann C, Greiner A, Wendorff JH (2009) Design of pheromone releasing nanofibers for plant protection. Polymers for Advanced Technologies, published online in Wiley InterScience, DOI: 10.1002/pat.1532
- Hummel HE, Deuker A, Leithold G (2009) The leaf beetle *Diabrotica virgifera virgifera*: a merciless entomological challenge for agriculture. IOBC/WPRS Bulletin 41:103-110