

Gefördert durch:



Bundesministerium
für Forschung, Technologie
und Raumfahrt

Technische Universität Darmstadt

**Bioökonomie International: *Fungi 4 VectorControl*
Insektenpathogene Pilze zur biologischen Bekämpfung
von Stechmücken und Schaben**

Dr. Andreas Leclerque

031B1130

„Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 031B1130 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.“

Sachbericht zu Förderung 031B1130

Projekttitle: Insektenpathogene Pilze zur biologischen Bekämpfung von Stechmücken und Schaben

(Bioökonomie International: *Fungi 4 VectorControl*)

Laufzeit: 01.09.2021 – 31.12.2024

Aufgabenstellung

Zielsetzung des vorliegenden Kooperationsvorhabens war es, insektenpathogene Hypocreales-Pilze und Oomyzeten der Gattung *Leptolegnia* zu isolieren und molekular zu identifizieren sowie das Potential ausgewählter Stämme zur Entwicklung biologischer Insektizide zur sowohl wirkeffizienten als auch nachhaltigen Bekämpfung von Stechmücken und Larven zu entwickeln. Zudem sollten maßgeschneiderte molekulare Identifikationsverfahren zur gezielten Isolation neuer Stämme und für Begleit- und Folgestudien entwickelt, angepasst oder optimiert werden.

Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die projekt-relevanten Hypocreales-Pilze, insbesondere die Gattung *Metarhizium*, sind hinsichtlich ihrer Eigenschaft als Insektenpathogene in zahlreichen, meist landwirtschaftlichen Anwendungskontexten gut untersucht. Für die Referenzart *Metarhizium anisopliae* liegen zudem zahlreiche Studien zu molekularen Pathogenesemechanismen vor. Erkenntnisse zu Risikofolgenabschätzung und Nachhaltigkeit der Anwendung sind allerdings zumeist unzureichend. Hypocreales-Pilze gelten als eine der erfolgversprechendsten Bioressourcen zur nachhaltigen Bekämpfung von Schaben und Stechmücken.

Im Gegensatz hierzu sind niedere Pilze der Gattung *Leptolegnia* wissenschaftlich ungleich schlechter untersucht. Die Systematik der Gattung, insbesondere die Einteilung in verschiedene Arten, ist unzureichend entwickelt, und zu Projektstart waren nur wenige genetische Daten und keine einzige Genomsequenz der Referenzart *Leptolegnia chapmanii* publiziert. Die wenigen verfügbaren Studien u.a. des argentinischen Projektpartners zu *Leptolegnia* beziehen sich auf die beträchtliche Virulenz einiger untersuchter Stämme für Stechmückenlarven, auf die sich die Einschätzung des Pilzes als mögliches biologisches Bekämpfungsmittel stützt.

Ablauf des Vorhabens

Das Projekt wurde im wesentlichen im geplanten zeitlichen Rahmen umgesetzt. Ausnahme waren die Arbeiten zur *Leptolegnia*-Genomsequenzierung und daran organisatorisch gekoppelt der Sequenzierung von Stechmücken-Mikrobiomen. Unvorhergesehener Arbeitsbedarf entstand durch die Entdeckung der neuen schabenpathogenen Spezies *Metarhizium lopezlastrae*, die mit Blick auf die Entwicklung maßgeschneiderter Diagnosemethoden zunächst genetisch charakterisiert werden musste.

Wertvolle Unterstützung erhielt das Projekt durch eine Gegenfinanzierung durch die argentinische CONICET, mit deren Hilfe zwei promovierte Wissenschaftler der Partnerinstitution CEPAVE 12- bzw. 6-monatige Forschungsaufenthalte an der TU Darmstadt absolvieren konnten. Der wissenschaftliche Austausch zwischen den Partnern wurde hierdurch erheblich gefördert.

Wesentliche Ergebnisse

Ein wesentliches Projektergebnis ist es, dass vor dem Hintergrund fortgeschrittener genetischer Diagnose projekt-relevantes BioControl-Potential mit systematischen Klassifizierungen der Pilze korrelierte. So erwiesen sich Stämme der Art *Leptolegnia chapmanii*, nicht aber anderer *Leptolegnia*-Arten, als hochvirulent für Stechmückenlarven der Art *Aedes aegypti*. Ebenso konnte hohe Virulenz gegen *Blatella germanica*-Schaben mit der neu beschriebenen Art *Metarhizium lopezlastrae* in Verbindung gebracht werden. Diese Ergebnisse bedürfen der Absicherung mit heterogeneren Stichproben, insbesondere mit Pilzen anderer geographischer Herkunft: *Leptolegnia chapmanii* ist weiterhin nur vom amerikanischen Kontinent beschrieben, *Metarhizium lopezlastrae* bislang nur aus Argentinien. Methoden zur gezielten Identifikation dieser Organismen in Umweltproben wurden im Projekt im Grundsatz entwickelt und werden ständig weiter optimiert.

Sowohl zur Stechmückenbekämpfung mittels *Leptolegnia chapmanii* als auch zur Schabenbekämpfung mittels *Metarhizium lopezlastrae* wurden zur weiteren Bioinsektizid-Entwicklung geeignete BioControl-Stämme ausgewählt. Mit der Erprobung verschiedener Verfahren zur Herstellung von Produkt-Prototypen zur weiteren Entwicklung/Erprobung von Ausbringungstechniken und zur Lagerfähigkeit wurde in beiden Fällen begonnen, wobei im Falle von *Leptolegnia chapmanii* wesentlich mehr Entwicklungsarbeit zu leisten sein wird.

Aus dem Projekt sind bislang zwei Publikationen in international referierten Fachzeitschriften hervorgegangen, zwei weitere Manuskripte wurden eingereicht und sind z.Z. unter Begutachtung, mehrere weitere Publikationen sind in Vorbereitung.

Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Zur Durchführung von Biotests gegen verschiedene Stechmückenarten wurden Kooperationen mit dem Bernhard Nocht Institut für Tropenmedizin in Hamburg und dem Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT) in Puerto Iguazú, Argentinien, etabliert.

Verwendung der Zuwendung, erzielte Ergebnisse, vorgegebene Ziele

Anliegen des Projekts war es, auf der Basis insekten-pathogener Stämme der höheren Pilzgattungen *Metarhizium* und *Beauveria* sowie des niederen Pilzes *Leptolegnia chapmanii* Vorarbeiten zur Entwicklung marktfähiger Bioinsektizide zur Bekämpfung von Stechmücken bzw. Schaben zu leisten. Im Sinne einer Entwicklung entlang der Wertschöpfungskette sollte hierbei eine natürlich vorkommende Bio-Ressource über folgende drei Schritte in ein hochwertiges Produkt umgewandelt werden.

1. Reinkultur-Isolation von Pilzen aus der Umwelt sowie deren molekulare Identifikation und Charakterisierung des entomopathogenen Potentials machen definierte Bio-Ressourcen für weitere F&E-Aktivitäten verfügbar.
2. Technische Entwicklung mit Hilfe verschiedener Fermentations- und Formulierungsmethoden erzeugt aus diesen Bio-Ressourcen marktfähige Produkte in Form nicht nur wirk-effizienter, sondern auch potentiell nachhaltiger und öko-effizienter Bio-Insektizide.
3. Wissenschaftliche Forschung leistet einen weiteren Beitrag zur Wertschöpfung, indem sie die Bedingungen erforscht und Anwendungsstrategien entwickelt, unter denen die Bio-Insektizide in einem bestimmten Agrar-Ökosystem ihr volles Effizienz- und Nachhaltigkeitspotential entfalten können.

Aufgrund von Verzögerungen in der meta-genomischen Mikrobiomsequenzierung von Stechmücken und Schaben, welche die Grundlage für die zu Stufe 3 geplanten Untersuchungen darstellen, konnten zum letzten Punkt im Förderzeitraum noch keine Ergebnisse erzielt werden. Die Analyse der Mikrobiomsequenzdaten dauert z.Z. noch an, so dass im Nachgang noch Ergebnisse zu erwarten sind.

Bzgl. der anderen beiden vorgegebenen Ziele wurden die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse erzielt.

Insektenpathogene *Leptolegnia chapmanii* - Pilze zur biologischen Bekämpfung von Stechmücken

Vorgängige Labor-Virulenzbiotests gegen Larven der Stechmückengattungen *Aedes* und *Culex* mit Pilzstämmen der Gattungen *Metarhizium*, *Beauveria* und *Leptolegnia* zeigten, dass sich mit *Metarhizium*- und *Beauveria*-Pilzen nur sehr begrenzte Effekte erzielen ließen, wohingegen mehrere *Leptolegnia*-Stämme des argentinischen Partners eine hohe Virulenz gegen Stechmückenlarven aufwiesen.

Zur spezifischen genetischen Identifikation von *Leptolegnia*-Pilzen wurde ein PCR-Protokoll ausgearbeitet.

Im Rahmen der Bioprospektion in den Partnerländern wurden in Argentinien (Provinz Misiones) 14 neue *Leptolegnia*-Stämme aus Stechmückenlarven identifiziert, von denen gem. molekular-taxonomischer Analyse neun der Art *Leptolegnia chapmanii* und fünf mindestens zwei weiteren *Leptolegnia*-Arten zuzurechnen sind. Bestätigt wurden diese molekulartaxonomischen Ergebnisse durch die Ausbildung für *Leptolegnia*-Pilze typischer morphologischer Merkmale. Virulenz-Biotests gegen Larven der Stechmückenart *Aedes aegypti* belegten, dass nur die als *Leptolegnia chapmanii* charakterisierten Pilzstämmen ausgeprägte Virulenz zeigten.

Im Rahmen einer ersten Bioprospektions-Runde in Deutschland von Stechmückenlarven isolierte Pilzstämmen erwiesen sich ausnahmslos als zu anderen Oomyceten-Gattungen, meist *Saprolegnia*, gehörig, die für die Stechmückenbekämpfung nicht geeignet sind. Eine zweite Bioprospektionsrunde unter Einsatz der inzwischen entwickelten PCR-gestützten Identifikationsmethode

fürte zur Isolation acht unabhängiger *Leptolegnia*-Stämme aus *Culex*-Larven. Die molekular-taxonomische Analyse ergab, dass diese Stämme zu anderen *Leptolegnia*-Arten als *L. chapmanii* gehören. Ihre Virulenz gegen sowohl *Aedes*- als auch *Culex*-Mosquitolarven war im Vergleich zu derjenigen der argentinischen *L. chapmanii*-Stämme nur mäßig, so dass sie für eine Bioinsektizid-Entwicklung kaum von Bedeutung sein dürften.

Das Genom des argentinischen Stammes *Leptolegnia chapmani* CEP010 wurde als Leitgenom der Art *ab initio* sequenziert. Darüber hinaus wurden die Genome von sieben weiteren *Leptolegnia*-Stämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft (Argentinien, Deutschland, USA), Artzugehörigkeit und Pathogenität gegen *Aedes aegypti*-Mosquitos sequenziert. Komparative Genomanalysen u.a. mit dem Ziel der Identifikation virulenz-determinierender genetischer Faktoren sind gegenwärtig in Arbeit.

Bakterielle und pilzliche Mikrobiome von 16 Proben aus Stechmückenpopulationen von verschiedenen Orten in Deutschland wurden meta-genomisch sequenziert. Die noch andauernde Analyse der Mikrobiomdaten zielt sowohl auf eine Verbesserung der genetischen Identifikation von *L. chapmanii* als auch auf die Identifikation sekundärer Symbionten mit potenzieller Bedeutung für die Wirt-Pathogen-Wechselwirkung.

Insektenpathogene *Metarhizium lopezlastrae* - Pilze zur biologischen Bekämpfung von Schaben

Vorgängige Labor-Virulenzbiotests gegen Schaben der Art *Blattella germanica* mit Pilzstämmen der Gattungen *Metarhizium* und *Beauveria* zeigten, dass sich mit *Beauveria*-Pilzen nur vergleichsweise geringe Effekte erzielen ließen, wohingegen einige getestete *Metarhizium*-Stämme zumindest vielversprechende Virulenz zeigten. Für die weitere Untersuchung wurden daher vor allem *Metarhizium*-Stämme herangezogen, die vom argentinischen Partner in einem umfangreichen Screening isoliert wurden. Im Biotest gegen Schaben zeigte insbesondere eine Gruppe von 27 Stämmen, die aus Bodenproben aus den Provinzen Buenos Aires, Entre Rios und San Juan isoliert und sowohl morphologisch als auch molekular-taxonomisch der Art *Metarhizium robertsii* zugeordnet worden waren, mittlere bzw. hohe Virulenz. Die Art *Metarhizium robertsii* ist Teil eines Artkomplexes, der sog. „PARB-Klade“, der die für den biologischen Pflanzenschutz relevantesten *Metarhizium*-Arten umfasst.

Zeitlich parallel zu diesen Untersuchungen wurde in Zusammenarbeit mit einem kubanischen Partner im Rahmen des Projekts *BioÖkonomie International: FUNGI 4 FOOD* eine sequenzierungs-unabhängige diagnostische Methode zur Identifikation von *Metarhizium*-Pilzen auf Art-Ebene etabliert (publiziert: Schuster et al. 2023). Zunächst zur Unterscheidung der vier für die biologische Insektenbekämpfung prominentesten *Metarhizium*-Arten entwickelt, wurde die Methode inzwischen zur Identifikation weiterer Spezies (u.a. *M. caribense*, *M. hybridum*, *M. parapingshaense*) adaptiert.

Bei Anwendung dieser Methode auf die Stammsammlung des argentinischen Partners stellte es sich heraus, dass die 17 gegen Schaben hoch-virulenten unter den o.g. 27 Pilzisolaten einer bislang unbekanntes *Metarhizium*-Art angehören, wohingegen sich für die 10 nur mäßig virulenten Stämme die Zugehörigkeit zur Art *Metarhizium robertsii* bestätigen ließ. Für die neue Art wurde provisorisch die Bezeichnung „*Metarhizium lopezlastrae*“ vorgeschlagen. Zur detaillierten Charakterisierung der neuen Art ist derzeit ein Manuskript in Vorbereitung.

Mit der Erweiterung der art-unterscheidenden Identifikationsmethode auf die neue Spezies steht ein Werkzeug zur Verfügung, zur Bekämpfung von Schaben potentiell geeignete *Metarhizium lopezlastrae* – Pilze gezielt in der Umwelt zu identifizieren und zu isolieren.

Der argentinische Partner führt z.Z. eine breit angelegte Studie zur Optimierung der Fermentierung ausgewählter schaben-pathogener *Metarhizium*-Stämme mit Ziel der Produktion geeigneter Bioinsektizid-Prototypen durch. Eine erste Publikation mit Daten zur Produktion von Blastosporen in Submerskultur ist gegenwärtig unter Begutachtung.

Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der weitaus größte Teil der Förderung bestand in Personalmitteln. Dies spiegelt den personalintensiven Charakter von im Projekt wichtigen Forschungsaktivitäten (Methodenentwicklung und -optimierung bei molekularer Diagnose und Bioinsektizid-Formulierung, Biotests) wider. Der zweitgrößte Posten, allg. Verwaltungsausgaben, umfasst Laborverbrauchsmittel für ebenfalls kostenintensive molekularbiologische Experimente.

Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Unter der Zielsetzung der Entwicklung entsprechender Bio-Insektizide und der notwendig zu leistenden Technikfolgenabschätzung sollten die durchgeführten Arbeiten als notwendig wie auch angemessen erkennbar sein.

Voraussichtlicher Nutzen/Verwertbarkeit der Ergebnisse

Anschlussfähig sind die Projektergebnisse für die Entwicklung von Bioinsektiziden auf der Basis der identifizierten BioControl-Stämme. Die im Projekt identifizierten und z.T. in Fermentation getesteten *Metarhizium*- bzw. *Leptolegnia*-Stämme werden derzeit in Argentinien für die Anwendung weiterentwickelt.

Die im Projekt entwickelten diagnostischen Methoden können zur gezielten Identifikation und Isolation neuer BioControl-Stämme eingesetzt werden und als Modell für die Entwicklung analoger Verfahren für andere Pilz-Gruppen auch in anderen Anwendungskontexten als dem der Biologischen Insektenbekämpfung dienen.

Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Seit Antragstellung wurden von Seiten Dritter mehrere neue *Metarhizium*-Arten

beschrieben. Dies ist von wissenschaftlichem Interesse und wurde z.T. bereits in die laufende Methodenentwicklung zur art-spezifischen Diagnose einbezogen. Ein Einfluss auf die Zielsetzung des Projekts ist aber nicht zu erkennen. Sonstige relevante Fortschritte anderer Stellen zum Thema sind uns bis dato nicht bekannt.

Veröffentlichungen der Ergebnisse

Fachpublikationen der Projektpartner:

- Schuster C, Baro Robaina Y, Ben Gharsa H, Bobushova S, Manfrino RG, Gutierrez AC, Lopez Lastra C, Doolotkeldieva T, Leclerque A (2023) Species discrimination within the *Metarhizium* PARB clade: ribosomal intergenic spacer (rIGS) based diagnostic PCR and single marker taxonomy. *Journal of Fungi* 9, 996. <https://doi.org/10.3390/jof9100996>.
- Manfrino R, Gutierrez AC, Ben Gharsa H, Schuster C, López Lastra CC, Leclerque A (2024) Molecular taxonomic characterization and infra-specific diversity of entomopathogenic *Beauveria bassiana* fungi from Argentina. *Fungal Biology* 128: 1800–1805.
- Lozano F, Manfrino RG, Leclerque A, Schuster C, Rivas-Franco F, Gutierrez AC. Argentinian *Metarhizium* strains: molecular identification, blastospore production and pathogenicity against the cockroach *Blattella germanica*. *Journal of Invertebrate Pathology*, unter Begutachtung.
- Rueda-Páramo M, Schuster C, Balcazar D, Diez del Valle F, Gutierrez AC, Heitmann A, Salomon D, Leclerque A. New Isolates of *Leptolegnia chapmanii* from Misiones Province, Argentina, as Potential Biocontrol Agents for Mosquito Larvae. *BioControl*, unter Begutachtung.
- Gutierrez AC, Schuster C, Eitel A, Manfrino RG, Lopez Lastra C, Leclerque A. *Metarhizium lopezlastrae* sp. nov., a new member of the PARB clade in the *Metarhizium anisopliae* complex from Argentina. In Vorbereitung.
- Schuster C, Ben Gharsa H, Eitel A, Leclerque A. A species-discriminating diagnostic PCR and single marker taxonomy for the new *Metarhizium* species *M. hybridum* and *M. parapingshaense*. In Vorbereitung.

Fachpublikationen unter Verwendung der im Projekt etablierten Methoden:

- Manfrino R, Gutierrez A, Diez del Valle F, Schuster C, Ben Gharsa H, López Lastra C, Leclerque A (2022) First Description of *Akanthomyces uredinophilus comb. nov.* from Hemipteran Insects in America. *Diversity* 14, 1118. <https://doi.org/10.3390/d14121118>.
- Yamilé Baró Robaina¹, Christina Schuster², Rafael F. Castañeda-Ruiz¹, Yohana Gato Cárdenas¹, María Elena Márquez Gutiérrez¹, Amaia Ponce de la Cal¹, Andreas Leclerque². *Metarhizium caribense* sp. nov., a novel fungal entomopathogen associated with weevils impairing coffee, sugar cane and sweet potato cultivation. *Journal of Fungi* 10, 612. <https://doi.org/10.3390/jof10090612>.
- Gutierrez A, Manfrino R, Scelsio N, Ibáñez Shimabukuro M, Parodi E, Rodríguez Gil S, Hywel-Jones N, Leclerque A. Unraveling the Diversity: Natural Infections of *Metarhizium pemphigi* and *Beauveria pseudobassiana* of spider in Argentina. In Vorbereitung.