

# Schlussbericht

## zum Vorhaben

Thema:

**Verbundvorhaben: Entwicklung einer Push- and Pull-Strategie zur Bekämpfung von *Drosophila suzukii* mittels einer sprühfähigen Matrix und Extrakten aus Koniferen**

Akronym:

**Dsuzukii-Repell**

Zuwendungsempfänger:

**Teilvorhaben 1: RLP AgroScience GmbH / DLR Rheinpfalz**

**Teilvorhaben 2: Insect Services GmbH**

**Teilvorhaben 3: Nanopool GmbH**

Förderkennzeichen:

**Teilvorhaben 1: 2220HV088A**

**Teilvorhaben 2: 2220HV088B**

**Teilvorhaben 3: 2220HV088C**

Laufzeit:

**01.09.2022 bis 31.08.2025**

Monat der Erstellung:

**10/2025**

Gefördert durch:



Bundesministerium  
für Landwirtschaft, Ernährung  
und Heimat

aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Landwirtschaft, Ernährung und Heimat (BMLEH) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMLEH für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei der Autorenschaft.



## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Kurzbericht .....</b>	<b>2</b>
1.	Aufgabenstellung .....	2
2.	Planung und Ablauf des Vorhabens .....	2
3.	Resümee der wesentlichen Ergebnisse .....	2
a)	Arbeitspakete und Meilensteine .....	2
b)	Zusammenfassung .....	4
<b>II.</b>	<b>Ausführliche Darstellung der Ergebnisse .....</b>	<b>7</b>
1.	Erzielte Ergebnisse .....	7
	Arbeitspaket 1: Identifizierung repellenter synthetischer Duftstoffe im Labor und Gewächshaus .....	7
	Arbeitspaket 2: Identifizierung attraktiver synthetischer Duftstoffe .....	18
	Arbeitspaket 3: Optimierung der IS-Falle .....	23
	Arbeitspaket 4: Entwicklung einer SiO <sub>2</sub> -Cyclodextrin-Matrix zur Einbindung der Duftstoffe .....	34
	Arbeitspaket 5: Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der „push“- und der „pull“-Matrix .....	38
	Arbeitspaket 6: Validierung der Push&Pull-Strategie .....	47
2.	Verwertung .....	55
a)	Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen .....	55
b)	Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende .....	55
c)	Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende .....	56
d)	Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit .....	56
3.	Erkenntnisse von Dritten .....	57
4.	Veröffentlichungen .....	57
<b>ANHANG .....</b>	<b>58</b>	
	Teilvorhaben 1: Entwicklung einer Push-Methode zur Bekämpfung von <i>Drosophila suzukii</i> .....	58
1.	Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens .....	58
2.	Bearbeitete Arbeitspakete .....	58
3.	Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens .....	60
	Teilvorhaben 2: Entwicklung einer Pull-Methode zur Bekämpfung von <i>Drosophila suzukii</i> .....	61
1.	Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens .....	61
2.	Bearbeitete Arbeitspakete .....	61
3.	Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens .....	63
	Teilvorhaben 3: Entwicklung einer SiO <sub>2</sub> -Cyclodextrin-Matrix zur Einbindung repellenter und attraktiver Duftstoffe für <i>Drosophila suzukii</i> .....	64
1.	Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens .....	64
2.	Bearbeitete Arbeitspakete .....	64
3.	Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens .....	65

# I. Kurzbericht

## 1. Aufgabenstellung

Die Kirschessigfliege *Drosophila suzukii* (Matsumura 1931) ist ein invasiver Schädling aus Südostasien, der sich seit 2008 rasant in ganz Europa verbreitet. 2014 verursachte die Fliege bereits erhebliche Schäden in deutschen Obst- und Rebanlagen. Je nach Anbauregion können dabei hohe Ertragsverluste bis zu 100% auftreten. Für die Eiablage werden von *D. suzukii* reife Früchte bevorzugt. Bei bis zu 8 Generationen pro Jahr kann jedes Weibchen 300 bis 600 Eier legen. Aus den Eiern schlüpfen nach 1-3 Tagen kleine Maden, die sich vom Fruchtfleisch ernähren. Durch diesen Larvenfraß wird der Hauptschaden verursacht, die Früchte fallen in der Folge zusammen und werden matschig. Da reife Früchte betroffen sind, ist eine Bekämpfung äußerst schwierig und bislang wenig wirksam. Derzeit stehen keine gut wirksamen Bekämpfungsmaßnahmen zur Verfügung.

Ziel des Projektes ist daher die Entwicklung einer alternativen, umweltschonenden Bekämpfungsmethode von *D. suzukii*, einer sogenannten Push&Pull-Strategie. Dabei soll über eine umweltverträgliche, pflanzenfreundliche, sprühfähige Matrix ein auf *D. suzukii* abstoßend wirkender Duftstoff aus Koniferen auf die Wirtspflanzen aufgebracht werden (Push-Komponente). Zum anderen sollen Lockstofffallen, die einen attraktiven, fruchtspezifischen Duftstoff für die Kirschessigfliegen enthalten, die Insekten massenhaft fangen. Um die Wirkung dieser Pull-Komponente zu erhöhen, sollen attraktive Duftstoffe ebenfalls in der Matrix eingebettet werden und, wo möglich, in der Umgebung der zu schützenden Anlagen ausgebracht werden.

## 2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Verbundvorhaben untergliederte sich in drei Teilprojekte und sechs Arbeitspakete. Teilprojekt 1 (Federführung: RLP AgroScience GmbH) befasste sich mit der Entwicklung einer Push-Methode zur Abschreckung von *Drosophila suzukii*. Schwerpunkt war dabei die Identifizierung repellenter Duftstoffe und deren Wirkung auf das Fraß- und Eiablageverhalten der Fliegen (Arbeitspaket 1). Die Entwicklung der Pull-Methode (Teilprojekt 2) stand unter der Federführung der Insect Services GmbH. Die Hauptaufgaben lagen hier in der Identifizierung attraktiver synthetischer Duftstoffe (Arbeitspaket 2) und in der Optimierung der von Insect Services entwickelten Massenfangfalle (Arbeitspaket 3). In Teilprojekt 3 (Federführung: Nanopool GmbH) ging es um die Entwicklung einer umweltverträglichen SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix zur Einbindung repellenter und attraktiver Duftstoffe (Arbeitspaket 4) sowie die Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der entwickelten push- und pull-Matrizen (Arbeitspakete 5 und 6). Die Arbeiten zwischen den Teilprojekten und Projektpartnern erfolgten interaktiv. Zur Koordinierung der Zusammenarbeit fand einmal im Monat ein Online-Meeting mit allen Projektpartnern zur Besprechung der aktuellen Ergebnisse und weiterer Vorgehensweisen statt.

## 3. Resümee der wesentlichen Ergebnisse

### a) Arbeitspakete und Meilensteine

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungszeitraum (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
AP 1.1 Identifizierung repellenter Duftstoffe in Bioversuchen im Labor und Gewächshaus	09/2022 bis 12/2024	Erreicht. Ein Screening mit 32 Koniferenduftstoffen/-ölen wurde durchgeführt und acht Substanzen ermittelt, welche eine signifikant repellente Wirkung gegenüber adulten <i>D. suzukii</i> aufwiesen.
AP 1.2 Herstellung von Koniferenextrakten	04/2023 bis 06/2025	Erreicht. Zwei Methoden zur Herstellung wurden getestet.

<b>Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)</b>	<b>Bearbeitungszeitraum (lt. Balkenplan im Antrag)</b>	<b>Zielerreichung</b>
AP 1.3 Untersuchungen zur Verhinderung der Nahrungsaufnahme (CAFE)	09/2022 bis 12/2024	Erreicht mit veränderter Methode. Vier der in AP 1.1 identifizierten Substanzen führten zu einer Verminderung der Nahrungsaufnahme.
AP 1.4 Untersuchungen zur Verhinderung der Eiablage (Medium, Früchte)	01/2023 bis 12/2024	Erreicht. Sieben der in AP 1.1 identifizierten Substanzen führten zu einer signifikanten Reduktion der Eiablage in den Testfrüchten.
AP 1.5 Bestimmung der Duftstoff-Wirkungsbeziehungen selektierter Repellentstoffe im Olfaktometerversuch	07/2023 bis 12/2024	Erreicht mit veränderter Methode. In Cage-Assays wurde die Wirkung der in AP 1.1 ermittelten Substanzen verifiziert.
AP 2.1 Untersuchung frucht-spezifischer synthetischer Duftstoff-Gemische im Bioversuch und in Olfaktometer-Versuchen	09/2022 bis 09/2024	Erreicht mit veränderter Methode. Ein Screening mit 17 potenziell attraktiven fruchtspezifischen Duftstoffen wurde durchgeführt und 6 Substanzen ermittelt, welche eine signifikant attraktive Wirkung auf adulte <i>D. sukuzii</i> aufwiesen.
AP 2.2 Test der synthetischen Duftstoffe in IS-Falle im Gewächshaus und Halfreiland	04/2023 bis 12/2024	Erreicht. Ein im Labor ermitteltes hochattraktives Duftstoffgemisch wurde in Semifreilandversuchen getestet.
AP 2.3 Test der synthetischen Duftstoffe in IS-Falle im Freiland	01/2024 bis 12/2024	Erreicht. Ergebnisse sind in AP 3.3 dargestellt.
AP 3.1 Optimierung des Fallendesigns (Lochgröße etc.)	09/2022 bis 12/2023	Erreicht. Durch die Anpassung des Lochdurchmessers konnte der Beifang von Nicht-Zielorganismen erfolgreich reduziert werden.
AP 3.2 Optimierung der Spezifität des Lockstoffs	07/2023 bis 12/2024	Nicht erreicht. Die Spezifität des Lockstoffes im Hinblick auf die Fängigkeit von <i>D. sukuzii</i> konnte nicht maßgeblich verbessert werden.
AP 3.3 Validierung der Falle im Freiland	09/2022 bis 08/2025	Erreicht. Die modifizierten Fallen wurden in Kombination mit den im Labor ermittelten attraktiven Duftstoffkombinationen an mehreren Standorten im Freiland validiert.
AP 4.1 Entwicklung einer nicht phytotoxischen SiO <sub>2</sub> -Cyclodextrin-Matrix	09/2022 bis 12/2023	Teils erreicht. Im Projektverlauf wurden die Cyclodextrine auf Grund unzureichender Wirkung der Formulierungen aus der Matrix herausgenommen.
AP 4.2 Einbindung verschiedener Repellentstoffe in die Matrix	04/2023 bis 06/2025	Teils erreicht ohne Cyclodextrine. Höhere Konzentrationen an Repellentstoffen in der Matrix führten jedoch zu phytotoxischen Reaktionen an den Testpflanzen. Eine Direktapplikation ist daher nicht möglich.
AP 4.3 Einbindung attraktiver Duftstoffe in die Matrix	04/2023 bis 06/2025	Teils erreicht. Die Einbindung attraktiver Duftstoffe war in vielen Fällen aus technischen Gründen nicht erfolgreich.
AP 4.4 Bestimmung der Abgaberate der Duftstoffe in GC/MS Untersuchungen	01/2024 bis 06/2025	Arbeitspaket ist entfallen. Alternativ wurden GC/MS Untersuchungen zur eingebundenen Duftstoffmenge in den Cyclodextrinen durchgeführt.
AP 5.1 Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der Push-Matrix in Bioversuchen und Olfaktometerversuchen	07/2023 bis 03/2025	Teils erreicht. Da die Direktapplikation der Push-Matrix auf die Pflanzen zu Phytotoxizität führte, wurden alternativ verschiedene Trägermaterialien zur Ausbringung getestet.
AP 5.2 Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der Pull-Matrix in Bioversuchen und Olfaktometerversuchen	07/2023 bis 03/2025	Nicht erreicht. Nach Einbindung der Attraktantien in die Pull-Matrizen kam es in fast allen Fällen zu einem weitgehenden Wirksamkeitsverlust. Dieser Ansatz wurde nicht weiterverfolgt.
AP 6.1 Saranhausversuche und/oder Großkäfigversuche mit Beerenobst	04/2024 bis 08/2025	Push&Pull-Versuche im Labormaßstab und Semifreiland wurden durchgeführt.

Arbeitspakete (AP) (lt. Planung im Antrag)	Bearbeitungszeitraum (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
AP 6.2 Versuche in Kirschanlagen	04/2024 bis 08/2025	Auf Grund der unzureichenden Wirkung der getesteten Formulierungen sind die Freilandversuche in den Kirschanlagen entfallen.
AP 6.3 Versuche in isolierten Weinbergen	07/2024 bis 08/2025	Auf Grund der unzureichenden Wirkung der getesteten Formulierungen sind die Freilandversuche in den isolierten Weinbergen entfallen.

Meilensteine (M) (lt. Planung im Antrag)	Fälligkeit (lt. Balkenplan im Antrag)	Zielerreichung
M 1 Effiziente Repellentstoffe sind identifiziert	12/2024	Erreicht.
M 2 Attraktive Duftstoff-Gemische sind identifiziert	12/2024	Erreicht.
M 3 Die Massenfangfalle ist ausreichend selektiv für <i>D. suzukii</i>	12/2024	Teils erreicht. Nicht-Zielorganismen konnten ausreichend reduziert werden, die Spezifität für <i>D. suzukii</i> konnte gegenüber anderen Drosophiliden nicht ausreichend erhöht werden.
M 4 Eine nicht phytotoxische SiO <sub>2</sub> -Cyclodextrin-Matrix ist entwickelt	12/2023	Erreicht.
M 5 Eine Push-Matrix ist entwickelt	12/2024	Teils erreicht. Die Einbindung der Repellentien in die Cyclodextrine konnte nicht in ausreichender Konzentration erreicht werden. Ohne die Verwendung von Cyclodextrinen in der Matrix ist die Einbindung höherer Konzentrationen zwar gelungen, führte jedoch zu phytotoxischen Reaktionen.
M 6 Eine Pull-Matrix ist entwickelt	12/2024	Teils erreicht. Die Einbindung der Attraktantien in die Matrix führte größtenteils zum Wirksamkeitsverlust.
M 7 Die Push-Matrix ist biologisch wirksam	03/2025	Teils erreicht. Ein alternatives Trägermaterial zur Ausbringung der Repellentstoffe wurde identifiziert.
M 8 Die Pull-Matrix ist biologisch wirksam	03/2025	Nicht erreicht. Die Pull-Matrix war biologisch nicht wirksam, die Pull-Komponente wurde durch die Lockstofffalle ersetzt.
M 9 Die Push & Pull-Strategie funktioniert	08/2025	Teils erreicht. In simulated-use und Semifreilandversuchen konnte eine gewisse Wirksamkeit der Push&Pull-Strategie erreicht werden.

## b) Zusammenfassung

In Bioassays im Labor mit adulten *Drosophila suzukii* konnten in einem Screening mit 32 Konifereninhaltsstoffen insgesamt acht Substanzen identifiziert werden, welche eine sehr starke repellente Wirkung auf die Fliegen ausübten. Bei Zugabe dieser Substanzen in eine Fraßlösung kam es bei vier zu einer Verminderung der Nahrungsaufnahme bei den Adulti. In weiteren Untersuchungen wurde der Einfluss auf die Eiablage getestet. Bei sieben der zu Beginn ermittelten Substanzen führte die Anwesenheit zu einer signifikanten Reduktion der Eiablageraten in den Testfrüchten. Die Wirkung der olfaktorisch wirksamen Substanzen ist dabei stark abhängig von der eingesetzten Konzentration und Menge. Die besten Ergebnisse

ließen sich mit höheren Konzentrationen bzw. Mengen erzielen, eine zu niedrige Dosierung führte in einigen Fällen zum Verlust der Wirkung bzw. zu einem Umschlag in Attraktivität.

Durch ein umfassendes Screening potenziell attraktiver, fruchtspezifischer Duftstoffe konnten in weiteren Laborassays sechs Substanzen, sowie mehrere Kombinationen aus diesen, identifiziert werden, welche hochattraktiv auf die Kirschessigfliegen wirkten. Eine dieser attraktiven Substanzkombinationen zeigte einen leichten synergistischen Effekt im Hinblick auf die anlockende Wirkung und wurde in weiteren Semifreiland- und Freilanduntersuchungen eingesetzt.

Die bereits in einem Vorgängerprojekt entwickelte Massenfangfalle wurde durch verschiedene bauliche Veränderungen angepasst. Die Validierung der modifizierten IS-Fallen erfolgte zusammen mit den im Labor ermittelten, attraktiven Duftstoffkombinationen in verschiedenen Obstkulturen und Wildhabitaten im Raum Neustadt an der Weinstraße. Durch die Anpassung des Lochdurchmessers konnte eine Reduktion der gefangenen Nicht-Zielorganismen erreicht werden. Eine verbesserte Spezifität für *D. suzukii* gegenüber anderen Drosophiliden, besonders der häufig vorkommende Art *D. subsobscura*, konnte jedoch nicht erreicht werden.

Es konnte eine nicht phytotoxische SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix entwickelt werden, welche als Trägersystem für Duftstoffe dient. Die Herstellung der Duftstoff-Einschlusskomplexe mit den Beta-Cyclodextrinen zeigte allerdings einige technische Schwierigkeiten auf. Die ursprünglich im Arbeitspaket 4 geplante GC/MS-Analyse zur Abgaberate der gebundenen Duftstoffe wurde durch eine Alternativuntersuchung ersetzt. Dabei wurde gezeigt, dass nach der Komplexierung lediglich ein Bruchteil des eingesetzten Wirkstoffs tatsächlich im Cyclodextrin gebunden vorlag. Dieser wird bei Kontakt der Cyclodextrine mit Wasser zwar über einen längeren Zeitraum freigesetzt, die Wirkung der freigesetzten Menge ist allerdings zu schwach, um für einen längeren Zeitraum olfaktorisch wirksam gegenüber *D. suzukii* zu sein. Daher musste diese Strategie verworfen werden. Um ausreichend hohe Konzentrationen der Repellentstoffe einbinden zu können und die damit gewünschte langanhaltende repellente Wirkung zu erzielen, wurden diese unter Verwendung eines Emulgators direkt in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebracht. Bei Applikation dieser Formulierungen auf die Testpflanzen kam es innerhalb kurzer Zeit zu phytotoxischen Reaktionen. Da eine direkte Applikation auf die Pflanzen also nicht in Frage kam, wurde im Anschluss nach alternativen Trägermaterialien/Dispensern zur Ausbringung der aktiven Substanzen gesucht. Da der Wirkradius dieser Materialien im Vergleich zu der großflächigen Besprühung der Pflanzen räumlich begrenzt ist, blieb der gewünschte Effekt in den anschließenden Gewächshausversuchen zur biologischen Wirksamkeit der Push-Matrizen aus.

Die Einbindung attraktiver Duftstoffe in die Matrizen – mit und ohne Cyclodextrine – führte weitgehend zum Verlust der Anlockwirkung gegenüber *D. suzukii* und wurde nicht weiterverfolgt. Die Pull-Komponente wurde in den anschließenden Labor- und Semifreilandversuchen durch die Lockstofffalle ersetzt.

Im Fokus vieler Versuche stand die Substanz BA, da diese in den ätherischen Ölen vieler Nadelbäume wie Tannen, Lärchen, Douglasien, Fichten und Kiefern enthalten ist und bereits eine Zulassung in der Lebensmittelindustrie als Aromastoff besitzt. Unter Laborbedingungen wirkte die Substanz signifikant repellent gegenüber adulten *D. suzukii*. In Gewächshaus und Semifreilandversuchen hat sich gezeigt, dass die Wirkung stark konzentrationsabhängig ist und bei zu starker Verdünnung in Attraktivität gegenüber der Adulti sowie zu einer Steigerung der Eiablagen führen kann.

In den anwendungsorientierten simulated-use Versuchen zur Überprüfung der Wirkung der push- und der pull-Komponente zeigte sich ebenso, dass der abschreckend wirkende Duftstoff in der SiO<sub>2</sub>-Matrix bei zu geringer Konzentration eine anlockende Wirkung auf die Kirschessigfliegen entfaltete. Bei höherer Konzentration war kein verhaltensmodifizierender Effekt erkennbar, bei den eingesprühten Pflanzen traten aber phytotoxische Langzeitschäden auf. Mit dem verwendeten Maiskolbengranulat als Trägermaterial zur Ausbringung des

Repellentstoffen konnten hingegen erste positive Ergebnisse produziert werden. Generell ist der erfolgreiche Einsatz von Repellents in der Schädlingsbekämpfung eng an die verwendeten Dispenser gekoppelt. Diese müssen unter Freilandbedingungen die Abgabe des Repellents über einen längeren Zeitraum bei gleichzeitig konstant hohen Abgaberraten gewährleisten. Eine möglichst großflächige Ausbringung im direkten Umfeld der zu schützenden Kulturpflanzen ist dabei optimal. Herkömmliche Dispenser wirken nur punktuell und können größere Flächen nicht ausreichend abdecken. Das nachhaltige, biologisch abbaubare Granulat stellt als Trägermaterial für Duftstoffe ein Novum dar und könnte im Rahmen von alternativen, umweltschonenden Bekämpfungsmaßnahmen als innovative Dispensertechnik eine große Verbreitung finden. In den anwendungsorientierten Push&Pull-Szenarien im Semifreiland ließ sich nur bei gleichzeitiger Anwesenheit der push-Komponente und der pull-Komponente eine signifikante Reduktion der Eiablage erkennen. Allerdings machen die generell niedrigen Eiablagerraten in diesen Versuchsreihen eine gesicherte Aussage schwierig. Aufgrund fehlender Formulierungen mit ausreichender Wirksamkeit wurde auf die ursprünglich im Arbeitspaket 6 geplanten Freilandversuche in Kirschanlagen und Weinbergen verzichtet.

## II. Ausführliche Darstellung der Ergebnisse

### 1. Erzielte Ergebnisse

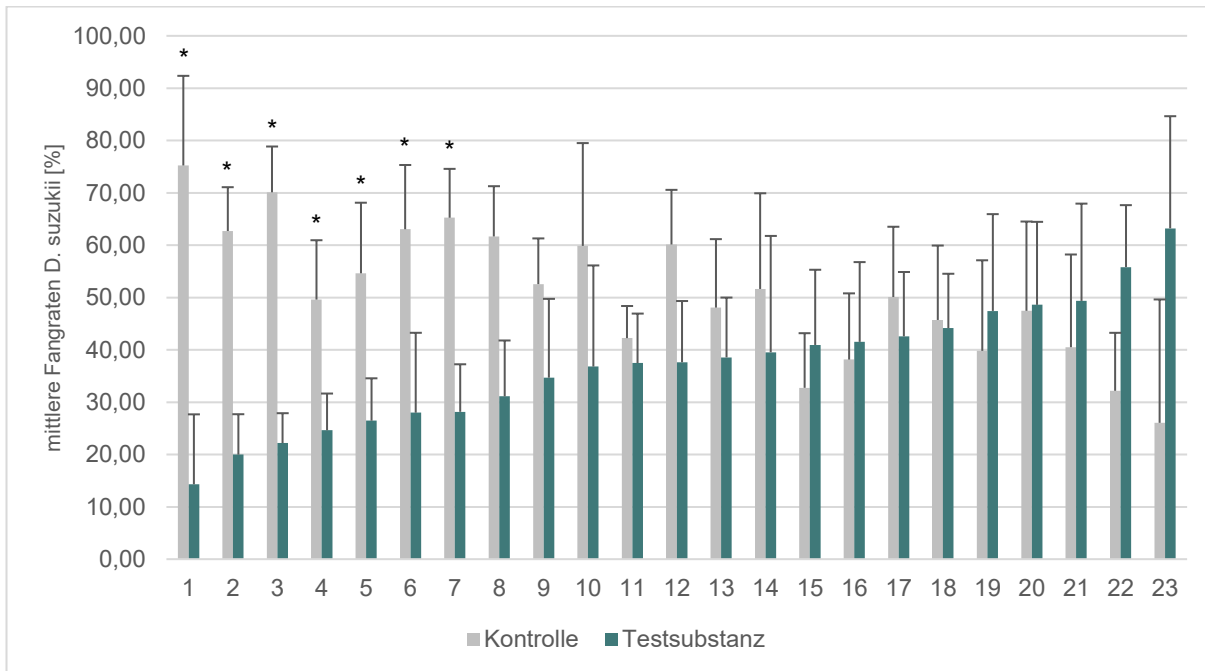
#### Arbeitspaket 1: Identifizierung repellenter synthetischer Duftstoffe im Labor und Gewächshaus

Zu Projektbeginn wurde bei der RLP AgroScience ein Screening von potentiell repellenten Konifereninhaltsstoffen gegen *Drosophila suzukii* gestartet. Die Versuche beruhten auf einem double choice Assay. Für eine Versuchsdauer von 24 Stunden wurden je 30 Kirschessigfliegen (gemischtes Geschlechterverhältnis, 1-2 Wochen alt) in kleine Gaze Käfige (30 x 30 x 30cm) gesetzt, welche zwei Flüssigfallen enthielten. Die Fangflüssigkeit bestand jeweils aus 50ml Wasser mit einem Tropfen Spüli zur Reduktion der Oberflächenspannung. Unter dem Fallendeckel wurde ein Filterpapier angebracht, welches entweder mit 50µl der jeweiligen Testsubstanz in einer 1:10 Verdünnung oder mit 50µl dünnflüssigem Paraffinöl (Mineralöl) als Kontrolle beträufelt wurde (Abb. 1). Für die Verdünnungen der hydrophoben Testsubstanzen wurde ebenfalls Mineralöl verwendet. Die Versuche fanden in 6-facher Wiederholung im Klimaschrank unter geregelten Temperatur- und Luftfeuchtebedingungen statt (22°C, 70% rF). Nach 24 Stunden wurde der Fangerfolg der Test- und Kontrollfallen bonitiert. Das Screening umfasste 23 Einzelsubstanzen (Abb. 2) und 9 Koniferenöle (Abb. 3). Aus Gründen der Geheimhaltung wurden die Klarnamen der Substanzen codiert. Dies gilt auch für die in AP 2 identifizierten Attraktantien.

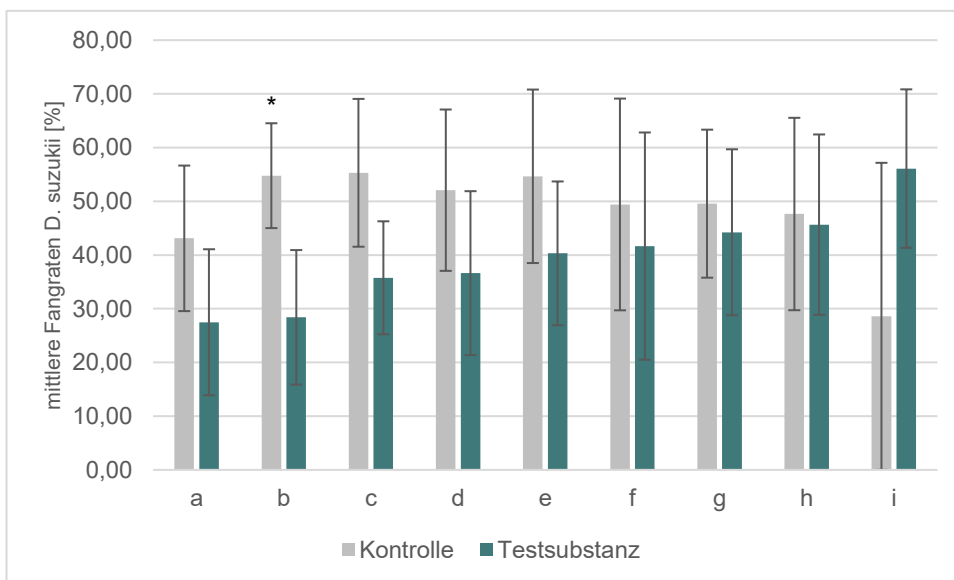
Hochsignifikante repellente Effekte auf adulte *D. suzukii* konnten bei folgenden Einzelsubstanzen beobachtet werden: LI, TP, MY, CA, LM, BA und HU. Ein etwas schwächerer, aber ebenfalls signifikant repellenter Effekt trat zudem bei dem Koniferenöl ZK auf.



**Abbildung 1:** Links: Versuchsaufbau double choice Versuche; rechts: Filterpapier unter dem Fallendeckel zur Applikation der Duftstoffe.

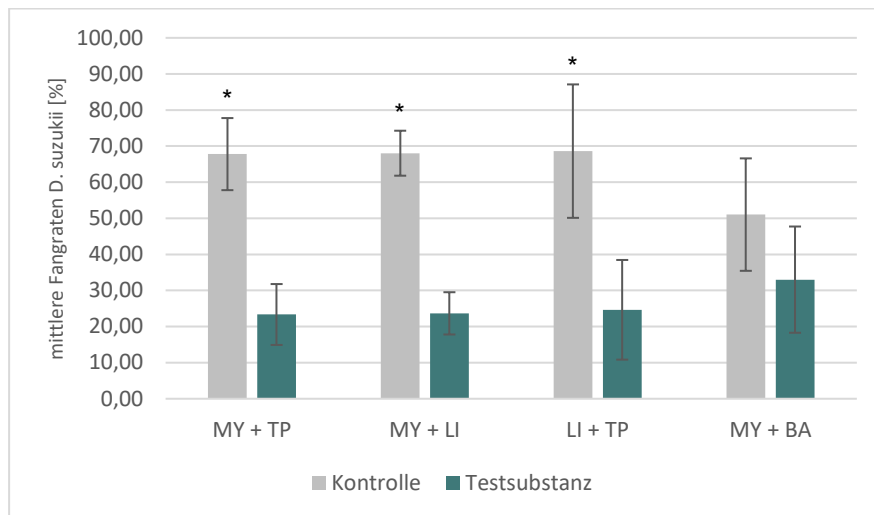


**Abbildung 2:** Mittlere prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit Koniferenduftstoffen (Einzelsubstanzen, n=6; Verdünnung 1:10 in Mineralöl). Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Testsubstanz (t-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,05$ ) zeigten sich bei folgenden Stoffen: 1=LI, 2=TP, 3=MY, 4=CA, 5=LM, 6=BA, 7=HU (Sterne über den Balken).



**Abbildung 3:** Mittlere prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit Koniferenölen (n=6; Verdünnung 1:10 in Mineralöl). Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Testsubstanz (t-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,05$ ) zeigten sich bei b=ZK (Stern über den Balken).

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich die repellente Effekte auf *D. suzukii* durch die Kombination zweier Substanzen verstärken lassen. Dazu wurden Kandidaten ausgewählt, die bereits als Einzelsubstanzen signifikant repellente Eigenschaften aufwiesen. Der Versuchsaufbau entsprach den oben beschriebenen Experimenten; allerdings wurden hier jeweils 5µl der beiden Duftstoffe in einer 1:10 Verdünnung mit etwas Abstand nebeneinander auf das Filterpapier appliziert.



**Abbildung 4:** Mittlere prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit Zweier-Kombinationen aus repellenten Substanzen (n=6; Verdünnung 1:10 in Mineralöl). Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Testsubstanz (t-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,05$ ).

Die Zweier-Kombinationen aus MY und TP, MY und LI, sowie LI und TP zeigten bei der statistischen Auswertung mittels t-Test für verbundene Stichproben signifikante Unterschiede zur Kontrolle. Eine deutliche Verstärkung des repellenten Effektes im Vergleich zu den Einzelsubstanzen konnte jedoch nicht beobachtet werden. Die Kombination aus MY und BA zeigte dagegen eine schlechtere Wirkung als die Einzelsubstanzen. Da durch die Kombinationen keine weiteren synergetischen Effekte zu beobachten waren, wurde beschlossen für die Folgeuntersuchungen mit den Einzelsubstanzen weiterzuarbeiten.

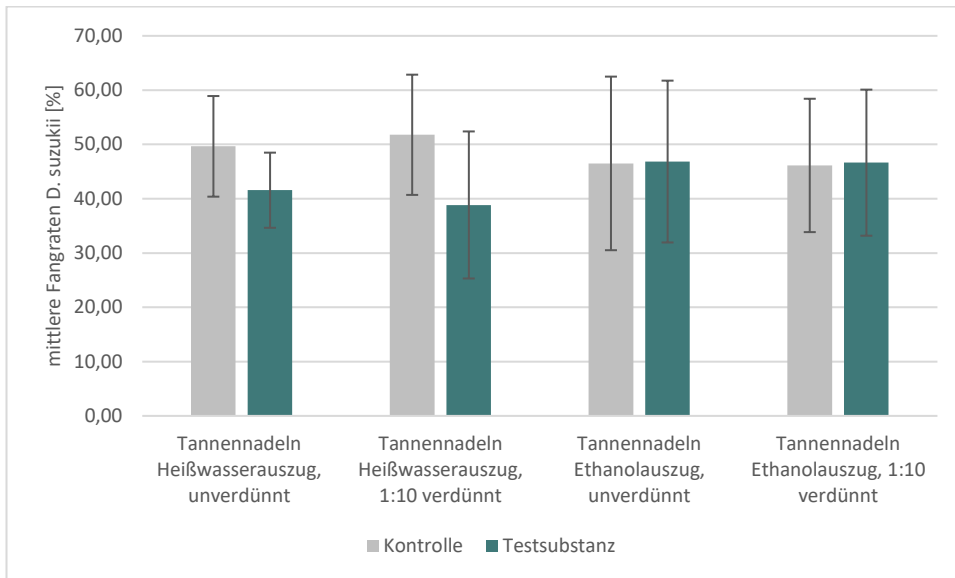
#### AP 1.2 Herstellung von Koniferenextrakten

Neben den im Handel erworbenen Terpenen und Koniferenölen, welche in der Regel durch Dampfdestillation aus Pflanzengewebe extrahiert werden, wurden eigene Koniferenextrakte aus Tannennadeln hergestellt. Dazu wurden zwei Methoden zur Gewinnung getestet: der Heißwasserauszug und der Ethanolauszug.

Für den **Heißwasserauszug** wurden 50g Tannennadeln mit einer Gewürzmühle in 30 x 1-sekündigen Etappen gehäckselt, in ein hohes Weckglas überführt und mit 150ml 65°C warmen Leitungswasser übergossen. Verschlossen wurde der Nadelsud für weitere 20 Minuten im 65°C warmen Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde der Nadelsud über einen Nylonstrumpf gefiltert und das Filtrat bei 11.500rpm für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und erneut bei 11.500rpm für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Zur Herstellung des **Ethanolauszugs** wurden 20g Tannennadeln in ein hohes Becherglas mit 100ml 70%igem Ethanol gegeben und mit einem Stabmixer für 3 Minuten ohne Unterbrechung zerkleinert. Der Extrakt wurde für 30 Minuten im Labor bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde der Überstand 2x durch einen Papierfilter filtriert.

Beide Extrakte wurden in double choice Assays entsprechend AP 1.1 auf ihre repellenten Eigenschaften gegenüber *D. suzukii* getestet, sowohl unverdünnt, als auch in einer 1:10 Verdünnung mit Wasser. Die Heißwasserauszüge lieferten einen schwach repellenten, aber nicht signifikanten Effekt, während die Ethanolauszüge überhaupt keinen Einfluss auf das Verhalten der Fliegen hatten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen vieler der getesteten Koniferenöle (AP 1.1; Abb. 3), welche im Screening meist schlechtere repellente Eigenschaften als die Reinsubstanzen aufwiesen oder gar attraktiv wirkten.



**Abbildung 5:** Mittlere prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit verschiedenen Tannennadelextrakten (n=6).

Koniferen besitzen ein breites Spektrum an Inhaltsstoffen (z.B. Khan & Pentegova 1988<sup>1</sup>, Bufler et al. 1990<sup>2</sup>). In den Nadeln stellen die Monoterpene den größten Anteil der olfaktorisch relevanten Substanzen, einen kleineren Teil die Sesquiterpene. Die Zusammensetzung sowie der Gehalt dieser Inhaltsstoffe kann stark variieren und ist abhängig von der Koniferenspezies, dem Standort der Bäume, der Jahreszeit (Schönwitz et al. 1990<sup>3</sup>) sowie extremen klimatischen Bedingungen (Kainulainen et al. 1992<sup>4</sup>). Bereits beim Screening auf potentielle Repellentien (siehe AP 1.1) ist aufgefallen, dass einige Substanzen eine gewisse Attraktivität auf die Kirschessigfliegen ausüben, wie zum Beispiel Camphen und Beta-Pinen, beides häufig vorkommende Monoterpene in zahlreichen Koniferenspezies. Das Gesamtduftbouquet der Koniferenextrakte kann also je nach Gehalt bestimmter Inhaltsstoffe mal repellent, mal attraktiv wirken. Auch die Extraktionsmethode hat Einfluss auf den Gehalt und die Zusammensetzung der herausgelösten Substanzen.

### AP 1.3 Untersuchungen zur Verhinderung der Nahrungsaufnahme

Die in AP 1.1 identifizierten, olfaktorisch repellenten Substanzen LI, TP, MY, CA, LM, HU, BA und ZK wurden auf mögliche fraßhemmende Eigenschaften hin untersucht. Der dafür angestrebte CAFE Assay (Capillar Feeding) musste auf Grund technischer Schwierigkeiten durch einen anderen Versuchsaufbau ersetzt werden. Statt der normalerweise verwendeten Mikrokapillaren, wurde die Fraßlösung auf ein Stück Watte appliziert und so den Fliegen angeboten. Die Lösung bestand aus 5%igem Zuckerwasser mit 1,5% Brillantblau, 0,5% Trockenhefe sowie 0,5% Emulgator. Diesem Gemisch wurden die Repellentien in den Konzentrationen 0,1%, 1% oder 3% hinzugefügt. Der Farbstoff Brillantblau sorgt bei der oralen Aufnahme durch die Fliegen für ein deutlich gefärbtes Abdomen und diente dem Nachweis der Fraßaktivität. Als Versuchsfäße dienten Drosophilaröhrchen aus Polypropylen (Höhe 100mm, Ø 48mm). In diese wurden je 5 Männchen und 5 Weibchen eingesetzt. Die single choice Versuche liefen für 4 Stunden im Klimaschrank bei 22°C und 70% rF, in 8-facher Wiederholung. Im Anschluss wurden die Fliegen mit blau gefärbtem Abdomen ausgezählt sowie die Mortalität erfasst.

<sup>1</sup>Khan, V. A., & Pentegova, V. A. (1988). Volatile components of the oleoresin of *Abies alba*. *Chemistry of Natural Compounds*, 24(2), 162-166.

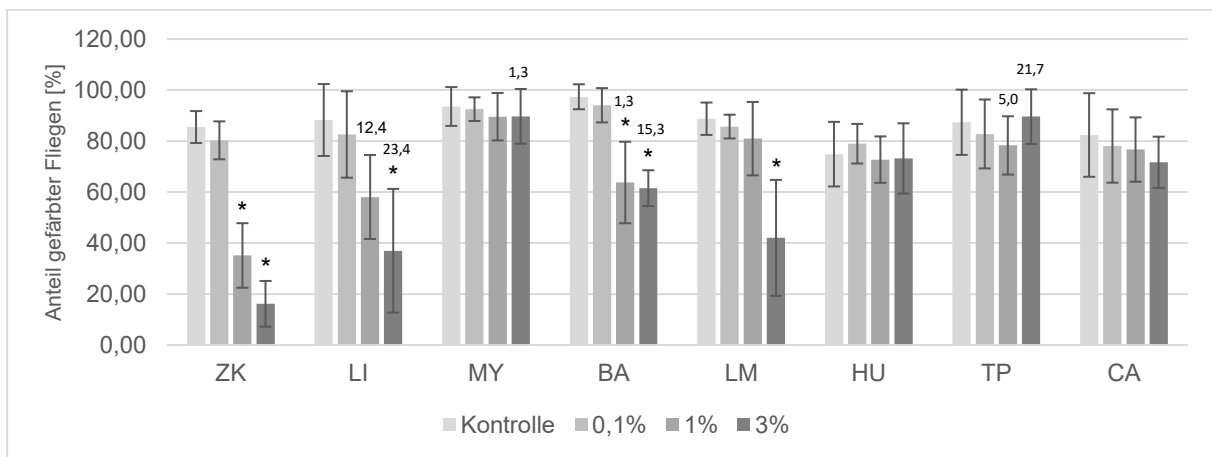
<sup>2</sup>Bufler, U., Seufert, G., & Jüttner, F. (1990). Monoterpene patterns of different tissues and plant parts of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.). *Environmental Pollution*, 68(3-4), 367-375.

<sup>3</sup>Schönwitz, R., Lohwasser, K., Kloos, M., & Ziegler, H. (1990). Seasonal variation in the monoterpenes in needles of *Picea abies* (L.) Karst. *Trees*, 4(1), 34-40.

<sup>4</sup>Kainulainen, P., Oksanen, J., Palomäki, V., Holopainen, J. K., & Holopainen, T. (1992). Effect of drought and waterlogging stress on needle monoterpenes of *Picea abies*. *Canadian Journal of Botany*, 70(8), 1613-1616.



**Abbildung 6:** Versuchsaufbau Fraßversuch.



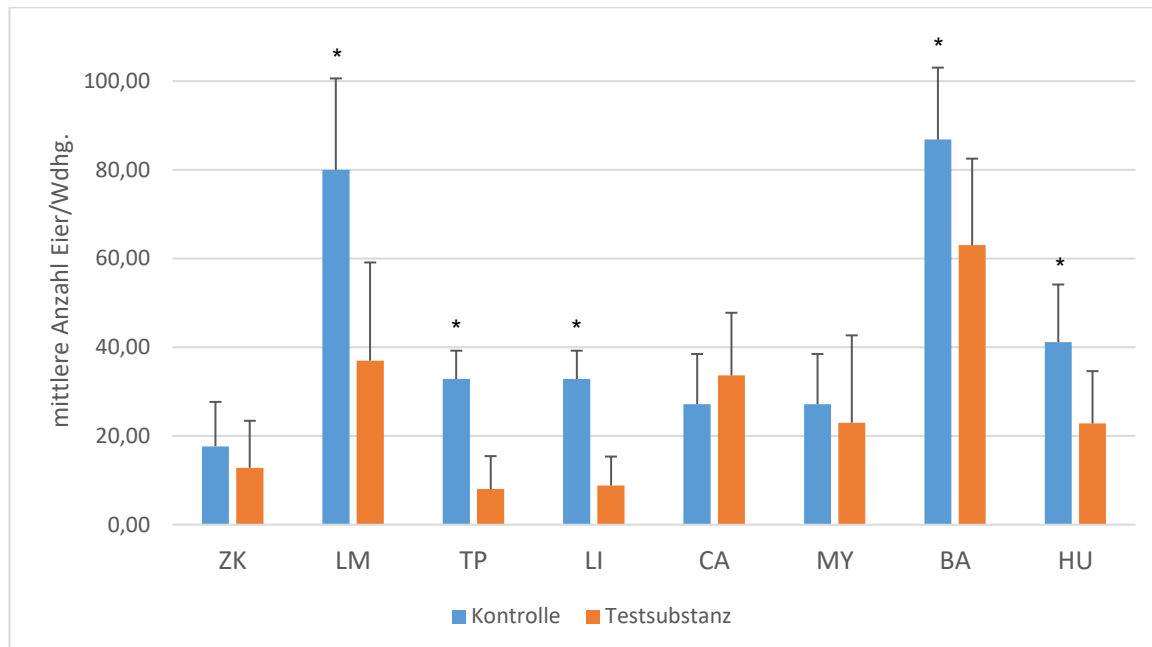
**Abbildung 7:** Anteil gefärbter *D. suzukii* im Fraßversuch mit verschiedenen Repellentien, angeboten in drei Konzentrationen (0,1%, 1%, 3%). Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle (einseitige ANOVA, Bonferroni post-hoc Test,  $p < 0,05$ ). Werte über den Balken=durchschnittliche Mortalitätsraten.

Die Anwesenheit von 3% Testsubstanz in der Fraßlösung führte bei den Substanzen ZK, LI, BA und LM zu einer signifikanten Reduktion der Fraßaktivität der Fliegen im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Substanzen ZK und BA war dies bereits bei einer Konzentration von 1% Testsubstanz zu beobachten. Mortalitäten wurden bei den Substanzen LI, MY, BA und TP bei Konzentrationen von 1 bzw. 3% Testsubstanz bonitiert (Abb. 7, Werte über den Balken). Es kam zu einer Zunahme der Mortalitätsrate bei aufsteigender Substanzkonzentration. Die höchste Mortalitätsrate war mit 23,4% beim Zusatz von 3% LI zu beobachten. Nicht alle toten oder moribunden Fliegen wiesen jedoch ein gefärbtes Abdomen auf, sodass nicht immer ein direkter Zusammenhang zwischen Mortalität und oraler Aufnahme der Testsubstanzen hergestellt werden konnte. Denkbar wäre, dass die Fliegen durch die entstandenen Dämpfe in den kleinen Testgefäßen oder durch Verweigerung der Nahrungsaufnahme geschwächt wurden.

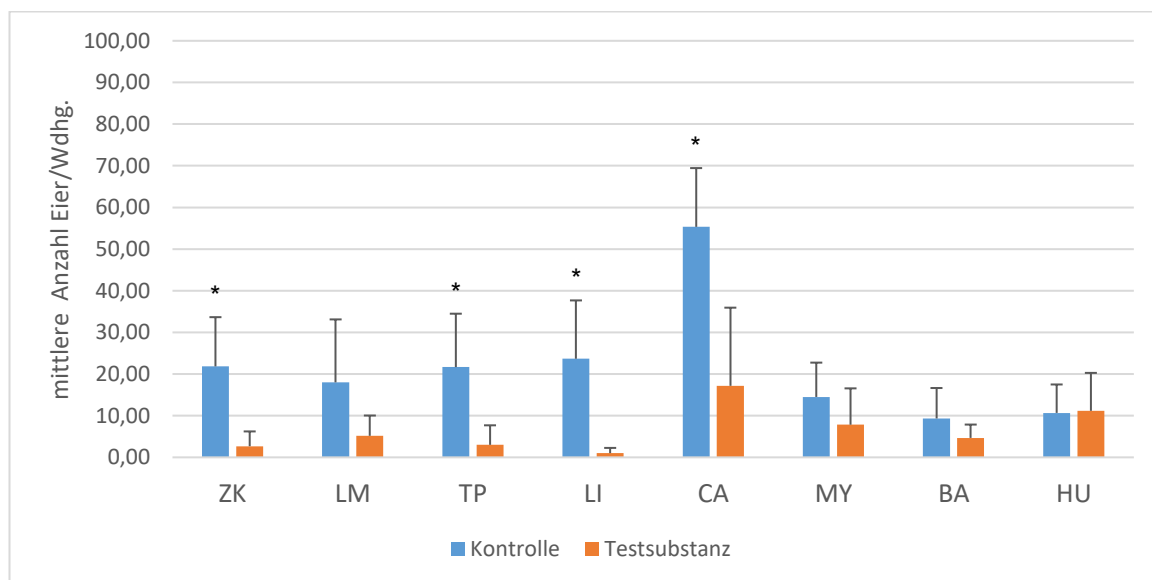
#### AP 1.4 Untersuchungen zur Verhinderung der Eiablage

In AP 1.4 standen Untersuchungen im Fokus, inwieweit sich die in AP 1.1 ermittelten, olfaktorisch wirksamen Duftstoffe, auf das Eiablageverhalten von *D. suzukii* auswirken. Ziel ist eine Verminderung der Eiablage in den zu schützenden Kulturfrüchten. Die Versuche wurden sowohl als single choice wie auch als double choice Assay durchgeführt. In den single choice Versuchen wurden den Fliegen in kleinen Gazekäfigen (30 x 30 x

30cm) je drei Heidelbeeren auf einer Petrischale angeboten. Dazwischen lag ein kleines Wattepad, entweder getränkt mit 10µl des unverdünnten Teststoffes oder mit 10µl Wasser (Kontrolle). Zehn befruchtete *D. suzukii*-Weibchen hatten 24 Stunden Zeit für die Eiablage. Im double choice Ansatz standen den Fliegen beide Varianten (Kontrolle und Duftstoff) in gegenüberliegenden Ecken des Käfigs zur Wahl. Alle Versuche wurden im Klimaschrank bei 22°C und 70% rF durchgeführt. Bonitiert wurde im Anschluss auf Eiablage und Mortalität der Adulti.



**Abbildung 8:** Ergebnisse der single choice Versuche. Durchschnittliche Anzahl Eiablagen bei Anwesenheit verschiedener Repellentien (n=6; je 3 Heidelbeeren pro Käfig). Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede (t-Test für unabhängige Stichproben, p<0,05).

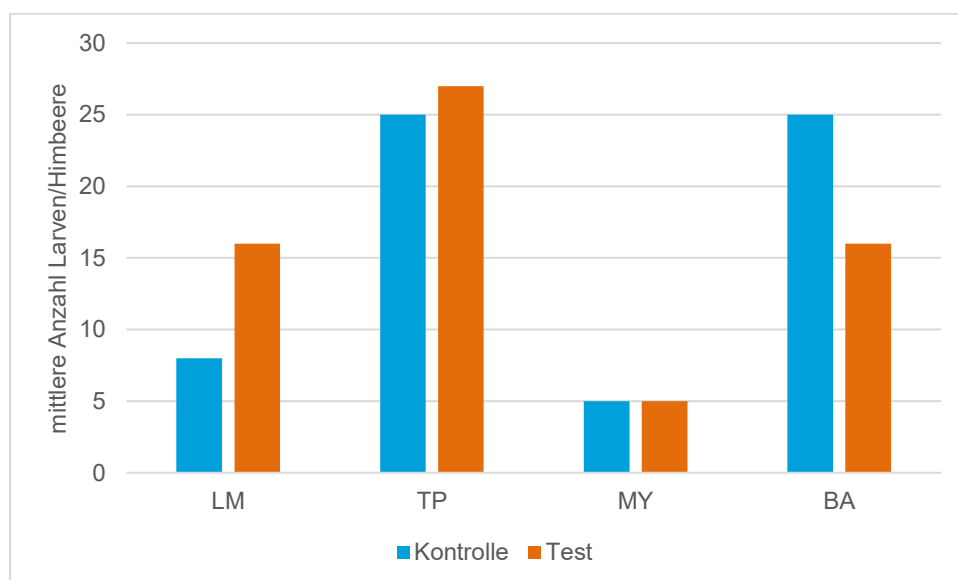


**Abbildung 9:** Ergebnisse der double choice Versuche. Durchschnittliche Anzahl Eiablagen bei Anwesenheit verschiedener Repellentien (n=6; je 3 Heidelbeeren pro Käfig). Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede (t-Test für verbundene Stichproben, p<0,05).

In den single choice Ansätzen wurde eine signifikante Reduktion der Eiablage bei den Terpenen LM, TP, LI und HU, sowie bei BA beobachtet. Bei gleichzeitiger Anwesenheit der Kontrollfrüchte im Käfig (double choice Assay) kam es zu einer signifikanten Eiablagereduktion im Vergleich zu den Kontrollfrüchten bei den Substanzen ZK, TP, LI und CA. In den double choice Versuchen wurde oft eine generell geringere Eiablage

erfasst (in Kontroll- und Testfrüchten), was auf die Ausbreitung der Duftstoffe im gesamten Versuchskäfig zurückzuführen sein könnte.

Zur Unterstützung der Arbeiten beim Kooperationspartner RLP AgroScience wurden auch bei Insect Services mit vier ausgewählten Substanzen Versuche zur ovideterrenten Wirkung durchgeführt. Dazu wurden in kleine Gazezelte (40 x 40 x 40cm) an den gegenüber liegenden Ecken zwei kleine Petrischalen platziert (Durchmesser: 5cm), in denen sich je 3 Himbeeren befanden. Mittig zwischen den Himbeeren wurde ein kleines Filterpapier ausgelegt das entweder unbehandelt blieb (Kontrolle) oder auf dem die zu testende Substanz (5µl) appliziert wurde (Test). Zur Wasserversorgung der Kirschessigfliegen während der 24-stündigen Versuchsdauer wurde eine Petrischale mit einem wassergetränktem Papiertuch zentral im Zelt platziert. Pro Zelt wurden 15 Weibchen und 8 Männchen eingesetzt, die Ermittlung der ovideterrenten Wirkung erfolgte 2-3 Tage nach Versuchsende durch Auszählung der Larven in den Früchten. In der folgenden Abbildung ist die durchschnittliche Anzahl der KEF-Larven pro Himbeere für die unterschiedlichen Behandlungen dargestellt.

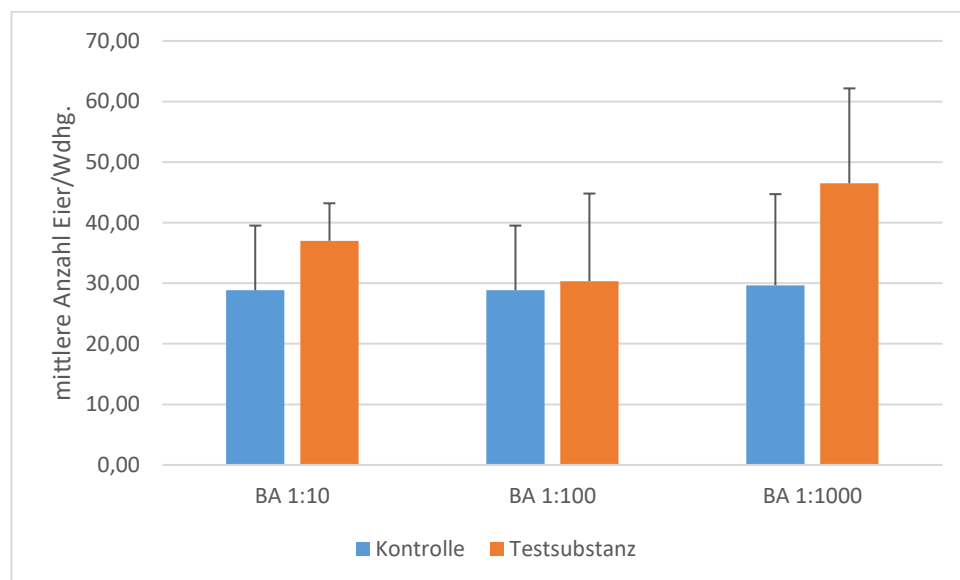


**Abbildung 10:** Mittlere Anzahl *D. suzukii* Larven pro Himbeere im double choice Versuch bei Anwesenheit von 5µl der Testsubstanzen (Versuchsdauer: 24 Stunden). 4-fache Versuchswiederholung.

Aus der Abbildung geht hervor, dass nur BA im Vergleich zur Kontrolle zu einer stärkeren Reduktion der Eiablage führte. In den Kontrollfrüchten wurden im Mittel 25 Larven der Kirschessigfliege gefunden, in den Testhimbeeren 16 Larven. Auffällig ist, dass in den Versuchen mit MY in allen Früchten durchschnittlich nur sehr wenige Eier abgelegt wurden. In den Versuchen mit LM wurden die Testhimbeeren für die Eiablage sogar bevorzugt, beim Angebot von TP gab es keinen deutlichen Unterschied bezüglich der mittleren Anzahl der Larven zwischen den Kontroll- und Testfrüchten. Die statistische Auswertung der Daten mittels t-Test ergab allerdings, dass keiner der Unterschiede signifikant ist.

Die Ergebnisse unterscheiden sich stark von den Versuchen bei RLP AgroScience. Die ovideterrente Wirkung der untersuchten Substanzen konnte mit dem veränderten Versuchsaufbau bei Insect Services nicht reproduziert werden. Gründe hierfür könnten der Einsatz unterschiedlicher Testfrüchte (Himbeeren statt Heidelbeeren) und Substanzmengen (5µl statt 10µl) sein.

Für die Substanz BA wurde zusätzlich die Auswirkung verschiedener Konzentrationen auf das Eiablageverhalten untersucht. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse dieser single choice Versuche mit den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000. Wie sich zeigte, hatte die Anwesenheit der verdünnten Substanz entweder keinen Effekt auf die Eiablage oder führte zu einer Steigerung derselben, insbesondere bei der Verdünnung 1:1000. Die repellente Wirkung von BA als Reinsubstanz (vergleiche Abbildung 8) geht bei starker Verdünnung verloren bzw. schlägt in Attraktivität um.

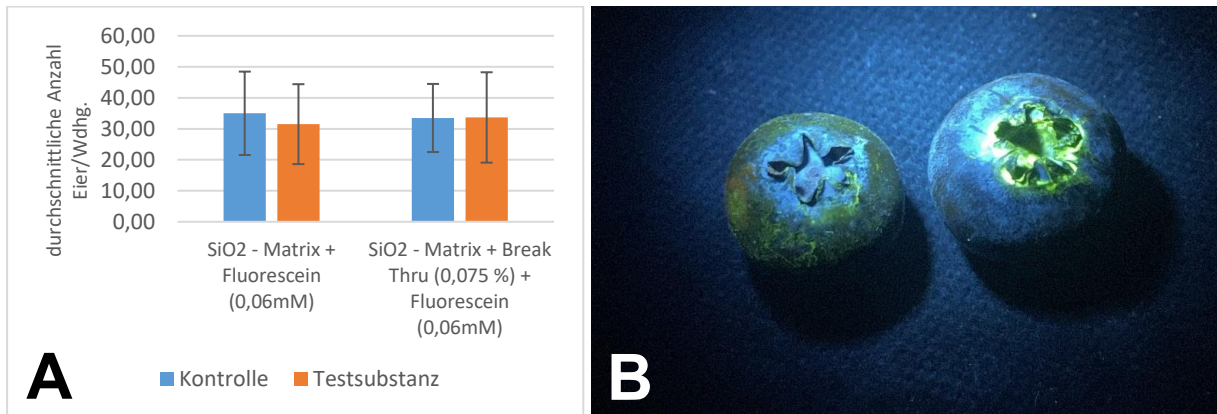


**Abbildung 11:** Durchschnittliche Anzahl Eiablagen bei Anwesenheit verschiedener Konzentrationen BA im single choice Versuch (n=6; je 3 Heidelbeeren pro Käfig).

### SiO<sub>2</sub>-Matrix als physikalische Barriere

Geprüft wurde zudem, ob der alleinige Einsatz der SiO<sub>2</sub>-Matrix als physikalische Barriere ausreicht, um die Fliegen daran zu hindern, die Früchte anzustechen und ihre Eier darin abzulegen. Dazu wurden Heidelbeeren mit der flüssigen SiO<sub>2</sub>-Matrix besprüht, welche beim Trocknen zu einer ultradünnen Schicht aushärtet. Zur Applikation wurde eine Airbrush-Pistole verwendet, um eine gleichmäßige Beschichtung der Früchte zu gewährleisten. In einem zweiten Ansatz wurden der Matrix 0,075% des Netzmittels BREAK-THRU® S 301 beigesetzt, welches als Zusatzstoff in Pflanzenschutzmitteln für eine gleichmäßige Verteilung des Spritzbelags sorgt. Um die Beschichtung auf ihre Homogenität hin zu testen, wurde in beide Ansätze zusätzlich Fluorescein zugegeben (0,06mM). Fluorescein ist ein Farbstoff, welcher unter Bestrahlung mit UV-Licht aufleuchtet. Nach dem Trocknen des Spritzbelages wurden beide Varianten in single choice Versuchen mit je 10 befruchteten *D. suzukii* - Weibchen getestet. Die Kontrollfrüchte blieben unbehandelt.

Durch die Zugabe des Fluoresceins konnte der Nachweis einer homogenen Benetzung der Beeren durch den Sprühvorgang erbracht werden (Abb. 12B). Im Gegensatz dazu lagerte sich der Spritzbelag beim Eintauchen der Früchte in die Matrix hauptsächlich in den Kelchresten der Heidelbeeren ab. Die Homogenität des Belags wurde sowohl mit als auch ohne die Zugabe von BREAK-THRU® S 301 erreicht, da die Flüssigkeit durch die Airbrush-Pistole sehr fein vernebelt wird. Trotz der homogenen Beschichtung hat die entstandene SiO<sub>2</sub>-Schicht nicht ausgereicht, um die Eiablage wirksam zu reduzieren. Auch die Zugabe des Netzmittels BREAK-THRU® S 301 hatte keinen Einfluss auf die Eiablage (Abb. 12A).

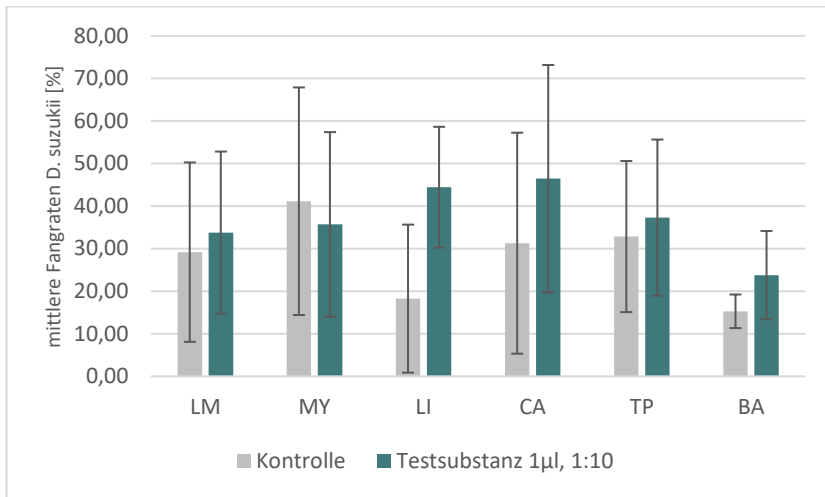


**Abbildung 12: A)** Ergebnisse des Eiablage-Assays zur Reduktion der Eiablage mittels SiO<sub>2</sub>-Beschichtung (n=6); **B)** behandelte Heidelbeeren unter UV-Licht; linke Beere Sprühapplikation, rechte Beere Tauchapplikation.

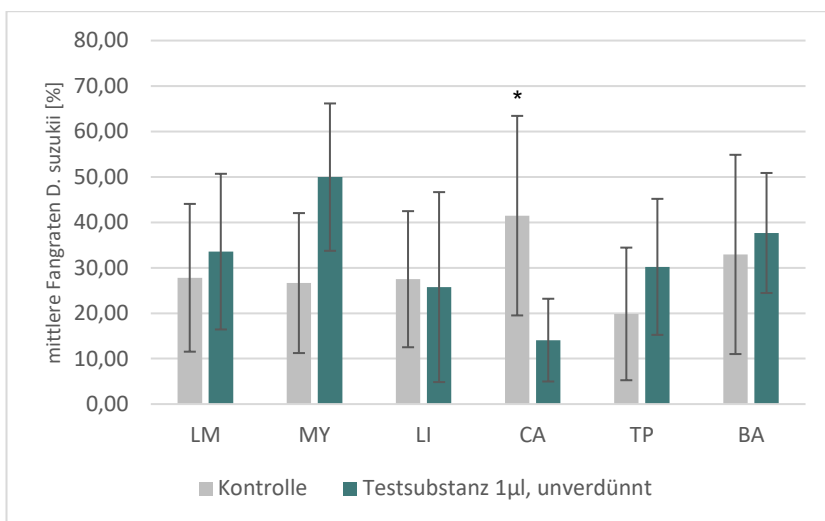
### AP 1.5 Bestimmung der Duftstoff-Wirkungsbeziehungen selektierter Repellentstoffe im Olfaktometerversuch

Die von RLP AgroScience in AP 1.1 identifizierten Repellentstoffe sollten bei Insect Services in Y-Olfaktometerversuchen überprüft werden. Da die Versuche im Olfaktometer jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferten, wurde in Anlehnung an die Experimente von Galland et al. (2020)<sup>1</sup> ein abgewandelter Käfigtest entwickelt. Dabei wurde in einen aus Gaze bestehenden Käfig (40 x 40 x 40cm) an den gegenüberliegenden Seiten je eine Glaspetrischale aufgestellt, der diagonale Abstand der Schalen betrug ca. 35cm. Die Schalen wurden mit je 20ml Wasser (und einem Spritzer Spüli zur Absenkung der Oberflächenspannung) befüllt und wurden mit Aluminiumfolie abgedeckt, in die 5 Löcher (Durchmesser von 2-3mm) gestochen wurden. An der Innenseite der Folie wurde ein Stück Filterpapier angebracht (1 x 1cm), auf welches die zu testenden Substanzen appliziert wurden. Mit diesem Bioassay können unterschiedliche Substanzvolumina getestet und auch Dosis-Wirkungsbeziehungen unter Berücksichtigung des olfaktorischen Orientierungsverhaltens von *D. suzukii* während des Fluges untersucht werden. In das Zelt wurden ca. 30 Individuen (gemischtes Geschlechtsverhältnis) eingesetzt (Versuchsbedingungen: Langtagbedingungen, Raumtemperatur ca. 22-23°C), die direkt aus den Zuchttröhrchen entnommen wurden (Alter: 1 - 14 Tage). Zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit wurde ein befeuchtetes Geschirrhandtuch über das Zelt gehangen. Nach 24 Stunden Versuchsdauer wurde die Anzahl der in den Schalen befindlichen Tiere gezählt. Mit dieser Methode wurden sechs ausgewählte Terpene aus dem Screening in verschiedenen Mengen und Konzentrationen überprüft (Abb. 13-15).

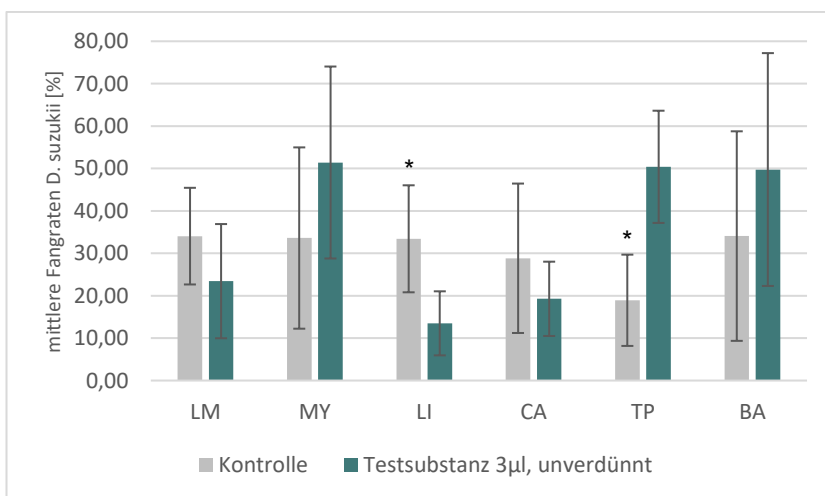
<sup>1</sup>Galland, C. D., Glesner, V., & Verheggen, F. (2020). Laboratory and field evaluation of a combination of attractants and repellents to control *Drosophila suzukii*. *Entomologia Generalis*, 40(3).



**Abbildung 13:** Mittlere prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit Repellentstoffen (1µl Testsubstanz, Verdünnung 1:10 mit Mineralöl; n=6). Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Testsubstanz (t-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 14:** Mittlere prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit Repellentstoffen (1µl Reinsubstanz; n=6). Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Testsubstanz (t-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,05$ ).

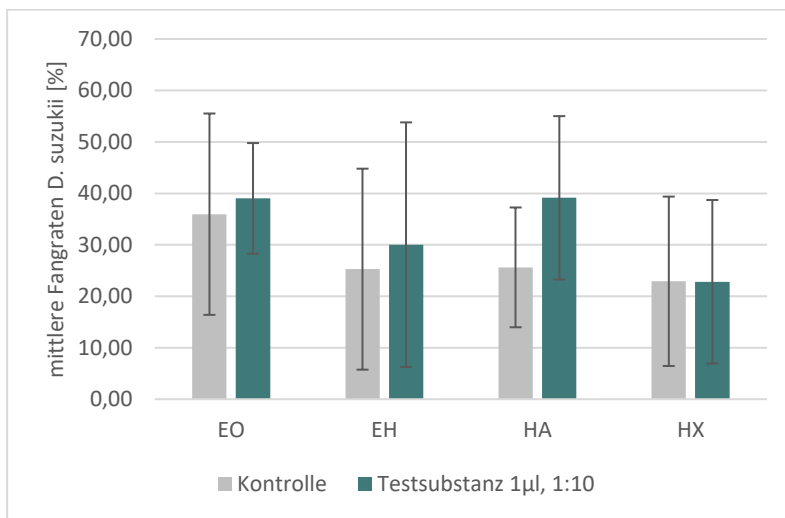


**Abbildung 15:** Mittlere prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit Repellentstoffen (3µl Reinsubstanz; n=6). Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Testsubstanz (t-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,05$ ).

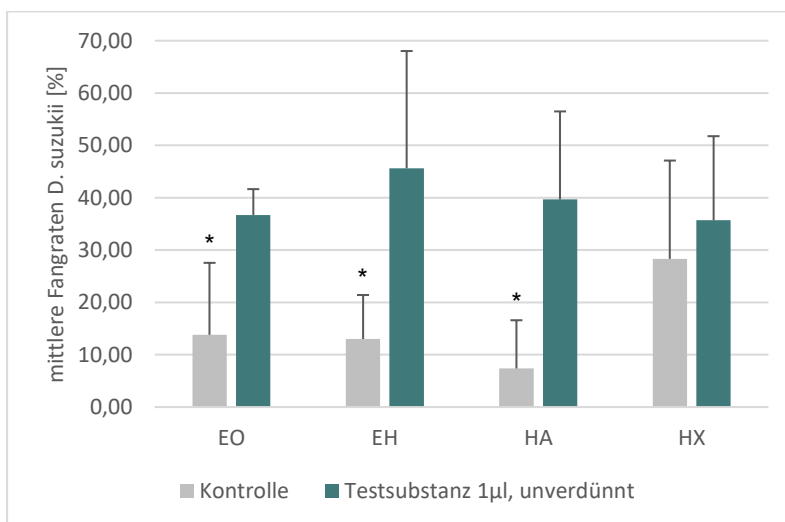
Anhand der getesteten Konzentrationen und Mengen (1µl 1:10 verdünnt; 1µl Reinsubstanz und 3µl Reinsubstanz) lassen sich verschiedene Dosis-Wirkungsbeziehungen erkennen. Während die Anwesenheit

von 1µl Testsubstanz in einer 1:10 Verdünnung entweder kaum Auswirkungen auf das Verhalten von *D. suzukii* hatte (bei LM, MY, TP) oder sogar attraktiv wirkte (LI, CA), zeigte sich bei der Verwendung von höheren Konzentrationen bzw. Mengen bei einigen Substanzen ein Umschlag in starke Repellenz (CA, LI). Unter Verwendung von 50µl einer 1:10 Verdünnung (siehe AP 1.1, Screening) wurden noch stärkere repellente Effekte aufgezeichnet. Warum TP bei der Verwendung von 3µl Reinsubstanz eine so starke Attraktivität auf die Fliegen ausübte ist unklar; beim Screening zeigte es sich als hochsignifikant repellent.

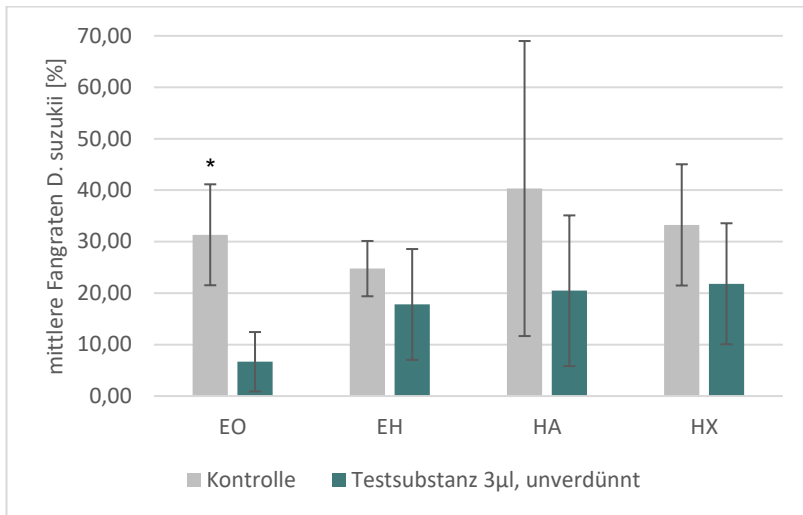
Bei der Suche nach attraktiven fruchtspezifischen Substanzen (siehe AP 2) sind zudem vier Stoffe ins Auge gefallen, welche in bestimmten Konzentrationen/Mengen ebenfalls repellente Eigenschaften besitzen (Abb. 16-18). Auch diese wurden mit der oben beschriebenen Methode überprüft.



**Abbildung 16:** Mittlere prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit Repellentstoffen (1µl Testsubstanz, Verdünnung 1:10 mit Mineralöl; n=6). Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Testsubstanz (t-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 17:** Mittlere prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit Repellentstoffen (1µl Reinsubstanz; n=6). Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Testsubstanz (t-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 18:** Mittlere prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit Repellentstoffen (3µl Reinsubstanz; n=6). Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Testsubstanz (t-Test für verbundene Stichproben,  $p < 0,05$ ).

Auch bei diesen Versuchen zeigte sich ein Umschlag von einer (signifikant) attraktiven Wirkung bei Verwendung von 1µl Reinsubstanz (EO, EH und HA) zu einer eindeutigen Repellenz bei Erhöhung der Substanzmenge auf 3µl, welche im Falle von EO sogar signifikant zur Kontrolle war.

## Zusammenfassung AP 1

Über ein Screening von 32 Konifereninhaltsstoffen konnten acht Kandidaten identifiziert werden, welche eine stark repellente Wirkung auf das Verhalten der Kirschessigfliegen hatten. Einzelsubstanzen zeigten meist eine bessere Wirkung als Koniferenöle oder -extrakte, deren Duftbouquet aus einer Mischung vieler Einzelkomponenten besteht. In weiteren Versuchen wurden die Auswirkungen auf das Fraß- und Eiablageverhalten von *D. suzukii* bei Anwesenheit dieser Substanzen überprüft. Die Ergebnisse sind stark abhängig von der eingesetzten Menge und Konzentration der Duftstoffe. Generell ließ sich feststellen, dass die besten Ergebnisse mit höheren Konzentrationen und Mengen erzielt wurden; eine zu niedrige Dosierung führte in einigen Fällen zum Verlust der Wirkung bzw. zu einem Umschlag in Attraktivität.

Die alleinige Beschichtung der Früchte mit der SiO<sub>2</sub>-Matrix reichte als physikalische Barriere gegen die Einstiche der *D. suzukii* - Weibchen nicht aus.

## Arbeitspaket 2: Identifizierung attraktiver synthetischer Duftstoffe

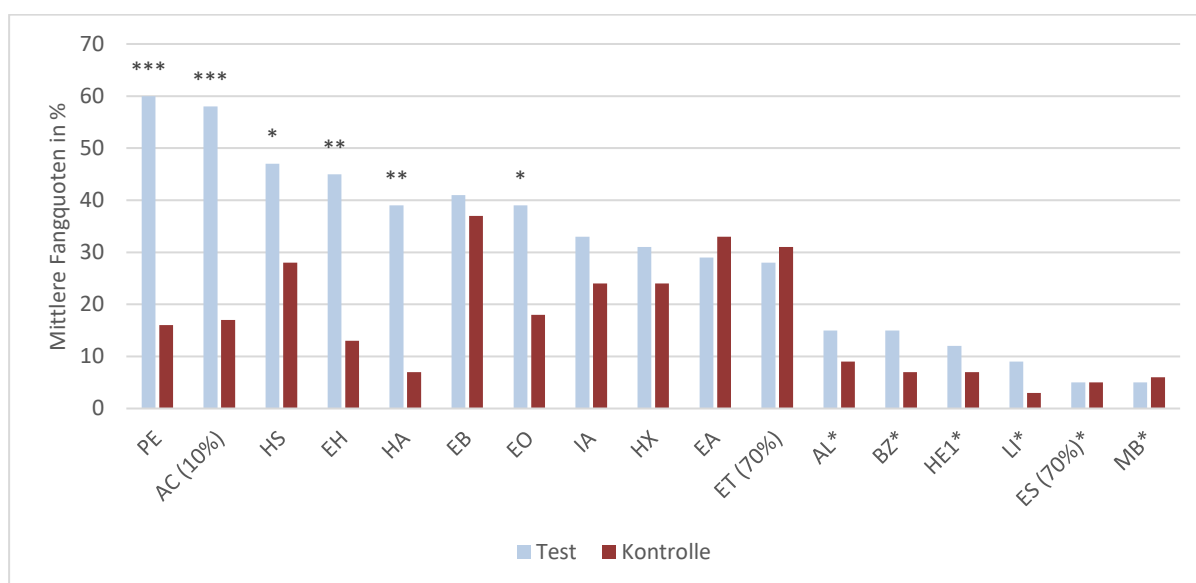
### AP 2.1 Untersuchung fruchtspezifischer synthetischer Duftstoff-Gemische im Bioversuch

Zu Beginn des Projektes wurde eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt. Die in den Veröffentlichungen enthaltenen Angaben zu potentiellen Duftstoffen wurden, auch unter der Berücksichtigung von Mengen- und Konzentrationsangaben, ausgewertet. Basierend auf dieser Recherche wurden insgesamt 17 Substanzen ausgewählt und als potentielle Lockstoffe eingestuft, die bei der olfaktorischen Orientierung von *D. suzukii* eine Schlüsselrolle spielen könnten:

- LI, HE1, EA, PE, MB, AL, IA, AC, BZ, EO, EH, EB, ET, ES, HA, HS und HX

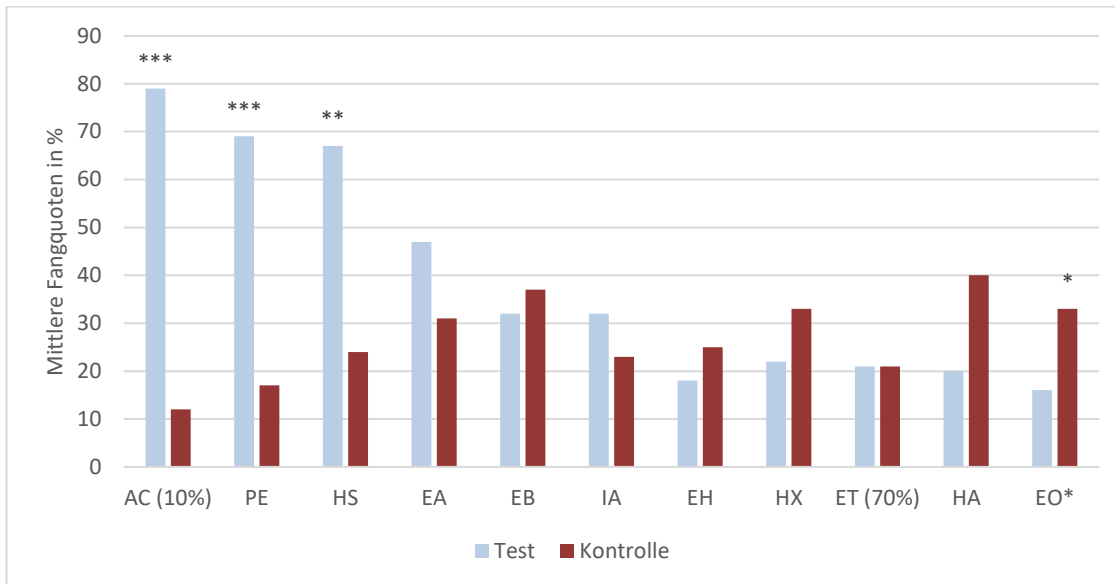
Bei PE, EA, EH und IA handelt es sich beispielsweise um Substanzen, die bei vielen verschiedenen Früchten und im Duftstoffbouquet von Rotwein und Essig nachgewiesen werden, sie entstehen aber auch bei der durch Hefepilze hervorgerufenen Gärung. Die Wirkung dieser Duftstoffe auf *D. suzukii* wurde in double choice

Versuchen überprüft. Die Methode hierzu ist in AP 1.5 beschrieben. Der Großteil der Duftstoffe wurde als Reinsubstanz getestet, von AC wurde eine 10%ige wässrige Lösung, von ET und ES wurden 70%ige wässrige Lösungen getestet. In einer ersten Versuchsreihe wurde die Wirkung von je 1µl Duftstoff untersucht, als Kontrolle diente entweder ein leeres Stück Filterpapier (Versuche mit Reinsubstanzen) oder 1µl Wasser (Versuche mit Verdünnungen). Die Versuche in den Gazezelten fanden in 6-facher Versuchswiederholung mit denjenigen Substanzen statt, bei denen die durchschnittlichen Fangraten nach den ersten beiden Versuchsdurchgängen über 20% lagen. Die statistische Auswertung dieser und der folgenden Versuche erfolgte mit dem t-Test für verbundene Stichproben.



**Abbildung 19:** Durchschnittliche prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in den Petrischalen mit den Testsubstanzen (1µl) und in den Kontrollschalen. Signifikanzlevel: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; t-Test für verbundene Stichproben; Substanzname mit\*: 2-fache Versuchswiederholung.

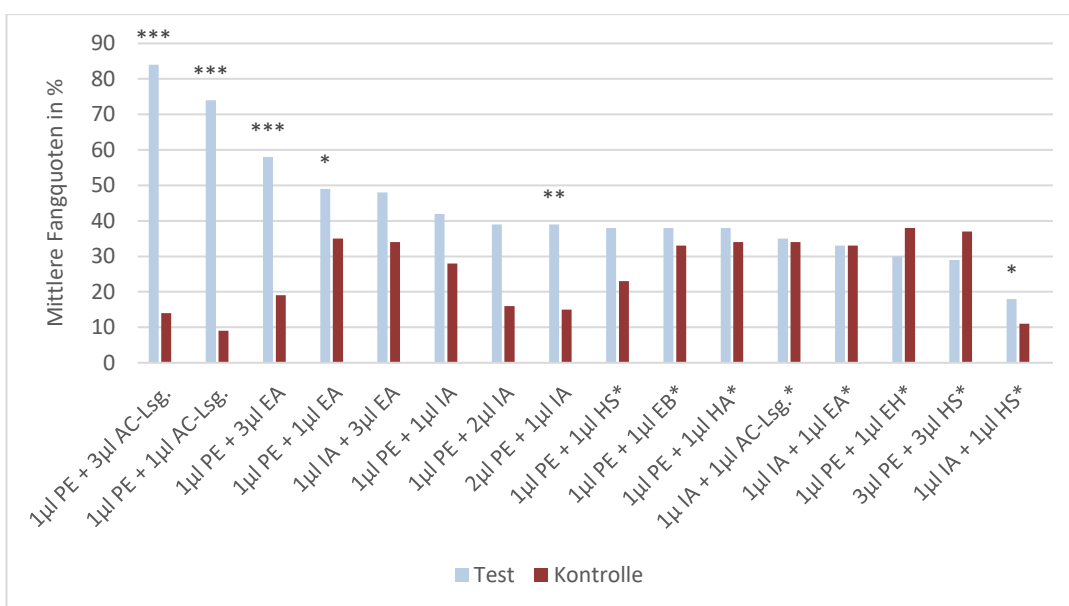
Nur mit PE und einer wässrigen AC-Lösung (10%) wurden Fangquoten der Kirschessigfliege von über 50% erzielt, bei diesen beiden Substanzen ist der statistische Vergleich zwischen Test und Kontrolle hochsignifikant ( $p < 0,001$ ). Bei vier weiteren Substanzen (HS, EH, HA und EO) ergab die statistische Auswertung ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Fangquoten von Test- und Kontrollschalen, mit 39% bis 47% lagen die mittleren Fangraten aber deutlich unter denjenigen von PE und der AC-Lösung. Bei allen anderen Substanzen waren die Unterschiede zwischen Test- und Kontrollschale nicht signifikant, in einigen Fällen lag die Fangquote in der Kontrolle sogar über derjenigen der Testschale. Geringe Fangraten zeigen die abschreckende Wirkung dieser Duftstoffe an. Anschließend wurden mit denjenigen Substanzen, deren durchschnittliche Fangquote über 25% lag weitere Tests mit einer höheren Menge (3µl) durchgeführt (6-fache Versuchswiederholung, Ausnahme EO mit 3-facher Versuchswiederholung), die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.



**Abbildung 20:** Durchschnittliche prozentuale Fangraten von *D. sukii* in den Petrischalen mit den Testsubstanzen (3µl) und in den Kontrollschalen. Signifikanzlevel: \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05; t-Test für verbundene Stichproben; Substanzname mit \*: 3-fache Versuchswiederholung.

Das Angebot der dreifach erhöhten Substanzmenge führte bei der wässrigen AC-Lösung, PE und bei HS zu einer im Vergleich zur Kontrolle signifikanten Steigerung der Fangquoten. Aber nur im Falle der wässrigen AC-Lösung ergab sich auch ein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Fangquoten von 1µl mit 3µl Substanzmenge (p<0,05). Bei allen anderen getesteten Substanzen zeigte sich zwischen den Fangraten der Test- und Kontrollschalen kein Effekt bzw. geht die vorhandene Anlockung bei Verwendung einer erhöhten Substanzmenge in einen repellenten Effekt über, der für EO auch statistisch signifikant ist (p<0,05).

Im nächsten Schritt wurden ausgewählte Einzelsubstanzen in verschiedenen Kombinationen getestet, um herauszufinden, ob dadurch ein synergistischer Effekt der attraktiven Wirkung auftritt. In den Versuchen wurde jede Substanz auf ein separates Stück Filterpapier pipettiert. In diesen Kombinationsversuchen (3-fache bzw. 6-fache Versuchswiederholung) wurden die meisten Substanzen auch in unterschiedlicher Menge getestet.



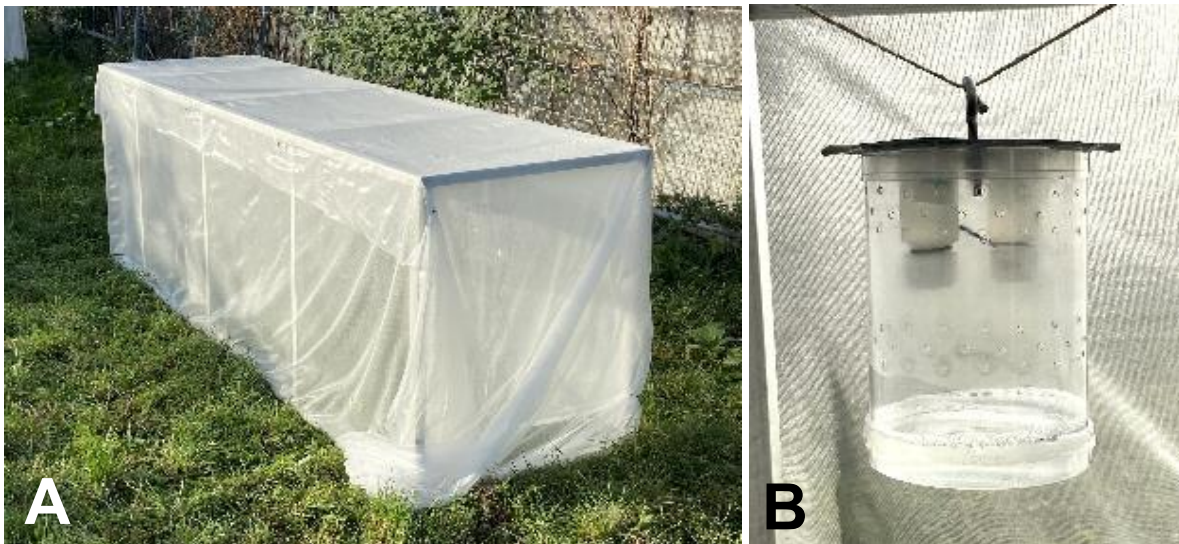
**Abbildung 21:** Durchschnittliche prozentuale Fangraten von *D. sukii* in den Petrischalen mit den Testsubstanzen und in den Kontrollschalen. Signifikanzlevel: \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01; \*p<0,05; t-Test für verbundene Stichproben; Substanznamen mit \*: 3-fache Versuchswiederholung.

Nur beim Test von PE zusammen mit der wässrigen AC-Lösung konnte eine Steigerung der durchschnittlichen Fangquote erzielt werden. Die Kombination von 1µl PE und 3µl der AC-Lösung bzw. von je 1 µl dieser beiden Substanzen wirkte stark anlockend (Fangquote: 84% bzw. 74%), im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich ein hochgradig signifikanter Unterschied. Fangquoten zwischen 49% und 58% wurden bei Einsatz der beiden Duftstoffe PE und EA beobachtet, auch hier war der Unterschied zur Kontrolle statistisch signifikant. Mit Ausnahme von zwei weiteren Substanzkombinationen (mit geringen Fangquoten von 39% bzw. nur 18%) konnte kein weiteres Ergebnis statistisch abgesichert werden.

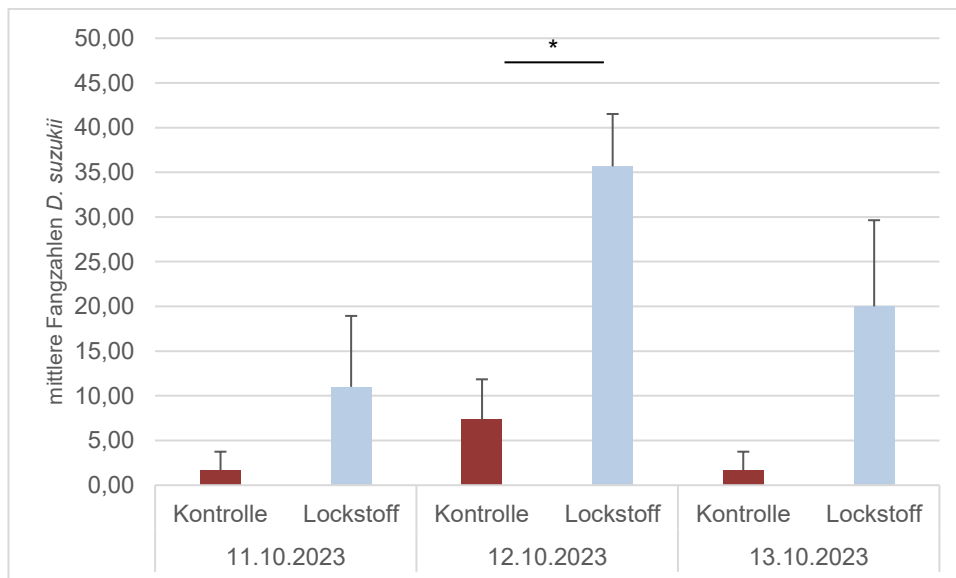
Für die beiden hochgradig fruchtspezifischen Substanzen IA und EH wurden zusätzlich Verdünnungen (1:100, 1:1000 und 1:10000) mit Mineralöl in 6-facher Versuchswiederholung getestet (Ergebnisse nicht graphisch dargestellt). Im Vergleich zu den Ergebnissen der Versuche mit 1µl der jeweiligen Reinsubstanzen (Fangquoten EH: 45%, IA: 33%) induzierten die Verdünnungen von EH entgegen der Erwartung niedrigere Fangquoten (18% bis 40%). Diejenigen von IA erhöhten sich leicht bei Verwendung der Verdünnungen 1:1000 und 1:10.000 (44% bzw. 41%). Generell lagen die durchschnittlichen Fangraten aber auf einem sehr niedrigen Niveau, im Vergleich zur Kontrolle konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

### **AP 2.2 Test der synthetischen Duftstoffe in IS-Falle im Halbfreiland**

Um die in AP 2.1 ermittelten, attraktiv wirkenden synthetischen Lockstoffe im Semifreiland testen zu können, wurden drei große Versuchskäfige mit den Abmessungen 223 x 64 x 77cm gebaut und auf dem Außengelände des DLR Rheinpfalz auf einer Wiese an einem windgeschützten Ort installiert. Die Böden der Versuchskäfige waren offen, sodass die natürliche Vegetation den Fliegen zusätzlichen Schutz vor der Witterung bot. Getestet wurden in double choice Versuchen Kombinationen der attraktiven Substanzen AC und PE, die in den Laborversuchen des Kooperationspartners Insect Services synergistische Effekte im Hinblick auf die Attraktivität gegenüber *D. suzukii* bewirkten. Da eine Vermischung dieser Stoffe nicht möglich ist, wurden jeweils zwei Fläschchen-Dispenser unter den Deckeln der IS-Fallen befestigt (Abb. 22B). Dispenser 1 wurde mit einer AC-Lösung (3mg/ml H<sub>2</sub>O) und Dispenser 2 mit PE (1:500 in Mineralöl verdünnt) befüllt. Die Abgabe der Duftstoffe erfolgt über eine permeable Membran im Dispenserdeckel. PE wurde hier nicht als Reinsubstanz verwendet, da es in größeren Mengen olfaktorisch sehr dominant ist und den Geruch der AC-Lösung überlagert hätte. Es wurden modifizierte IS-Fallen mit 82 Einfluglöchern mit einem Durchmesser von 2,6mm verwendet (siehe AP 3). Als Fangflüssigkeit im Fallenkörper diente Wasser, mit etwas Spülmittel zur Reduktion der Oberflächenspannung. Nach dem ersten Versuchstag wurde die AC-Konzentration auf 33mg/ml H<sub>2</sub>O erhöht. An jedem Versuchstag wurden 100 Fliegen pro Käfig eingesetzt und nach einer Versuchslaufzeit von 24 Stunden die Fangzahlen der Testfallen (mit Duftstoffdispensern) und der Kontrollfallen (ohne Dispenser) ausgewertet.



**Abbildung 22:** Semifreilandversuch mit ausgewählten Lockstoffen in IS-Fallen: A) Großkäfig, Maße: 223 x 64 x 77cm; B) IS-Falle mit Fläschchen-Dispensern mit den Duftstoffen AC und PE.



**Abbildung 23:** Mittlere Fangzahlen von *D. suzukii* im Semifreilandversuch in IS-Fallen mit ausgewählten attraktiven Lockstoffen. Eingesetzte Konzentrationen in den Dispensern: 11.10.23: AC-Lösung (3mg/ml H<sub>2</sub>O) und PE (1:500 in Mineralöl), 12.+13.10.23: AC-Lösung (33mg/ml H<sub>2</sub>O) und PE (1:500 in Mineralöl); n=3; Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede (t-Test für verbundene Stichproben p<0,05).

Die attraktive Wirkung der Duftstoffkombination AC und PE gegenüber *D. suzukii* konnte in Semifreilandversuchen bestätigt werden. Nach der Erhöhung der AC-Konzentration von 3mg/ml H<sub>2</sub>O auf 33mg/ml H<sub>2</sub>O verstärkte sich der attraktive Effekt und konnte im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant abgesichert werden. Witterungsbedingt mussten die Versuche nach drei Tagen eingestellt werden. Die Ergebnisse bildeten die Grundlage für die Langzeitversuche im Freiland (AP 3.3). Hierbei wurde überprüft, ob durch eine Kombination der im Projekt optimierten IS-Falle und zusätzlich eingesetzten Duftstoffen die Attraktivität gegenüber *D. suzukii* verbessert werden kann, bei gleichzeitiger Reduktion unerwünschter Beifänge (andere Drosophiliden und weitere Insektentaxa).

### AP 2.3 Test der synthetischen Duftstoffe in IS-Falle im Freiland

Die im Labor von Insect Services ermittelten, attraktiven Duftstoff-Kombinationen wurden in Kombination mit den durchgeführten Fallenkörpermodifikationen der IS-Falle im Raum Neustadt an der Weinstraße in einem

Wildhabitat und in einem Obstbaugrundstück mit verschiedenen Wirtskulturen von *D. sukuzii* auf ihre Fängigkeit hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in AP 3.3 dargestellt.

## Zusammenfassung AP 2

Es wurden verschiedene, auf *D. sukuzii* attraktiv wirkende Duftstoffe identifiziert, die Wirkung ist abhängig von der eingesetzten Menge und Konzentration der Substanzen. Durch die Kombination der beiden Substanzen PE und der wässrigen AC-Lösung konnte ein leichter synergistischer Effekt für die anlockende Wirkung nachgewiesen werden. Diese Duftstoffkombination wurde für weiterführende Fallen-Versuche im Halbfreiland und Freiland verwendet.

## Arbeitspaket 3: Optimierung der IS-Falle

### AP 3.1 Optimierung des Fallendesigns

Ziel des Projekts war die Entwicklung einer hochspezifischen Falle, mit der vor allem der Beifang der im Freiland häufig auftretenden Essigfliegen-Art *D. subobscura*, sowie weiterer Nichtzielorganismen deutlich reduziert werden kann. An dem von Insect Services entwickelten Prototyp der IS-Falle wurden im Laufe des Projektes verschiedene bauliche Veränderungen vorgenommen. Zum einen wurde die Anzahl der Einfluglöcher zunächst von 30 auf 60, später dann auf 82 erhöht, zum anderen wurde der Durchmesser der Einfluglöcher von 3mm auf 2,2mm verringert. Zusätzlich wurden zur besseren Entleerung der Fangflüssigkeit die Einfluglöcher im unteren Bereich der Falle anders angeordnet.

Der Prototyp sowie die modifizierte Falle mit 82 Einfluglöchern (Durchmesser 2,2mm) wurden bei Insect Services auf ihre Fängigkeit hin untersucht. Die single choice Versuche wurden im Labor in einem größeren Gaze-Kuppelzelt durchgeführt (Maße: 75 x 75 x 115cm). Dabei wurde die zu testende Falle mittig im Zelt aufgehängt, auf dem Zeltboden wurde den Tieren eine Wassertränke angeboten (wassergetränktes Zellstoffpapier in einer Schale). Als Fangflüssigkeit wurden 100ml von zwei bereits etablierten Lebensmittelmischungen verwendet, ein Gemisch aus Apfelessig und Wasser oder eine Mischung aus Merlot, Apfelessig und Wasser. Um die Oberflächenspannung der Fangflüssigkeiten herabzusetzen, wurde immer ein Tropfen Geschirrspülmittel hinzugefügt. Für eine Versuchsdauer von 24 Stunden wurden jeweils 40-60 Individuen beider Drosophila-Spezies zusammen in die Käfige gesetzt. In der folgenden Tabelle sind die mittleren Fangzahlen (aus je vier Versuchswiederholungen) der beiden Essigfliegenarten *D. sukuzii* und *D. subobscura* aufgelistet sowie die durchschnittlichen Mortalitätsraten.

**Tabelle 1:** Durchschnittliche Fang- und Mortalitätsraten (Werte in Klammern) von *D. sukuzii* und *D. subobscura* in Versuchen mit dem Prototyp und der modifizierten IS-Falle. A = Apfelessig, M = Merlot, W = Wasser.

	Prototyp		Modifizierte Falle	
	<i>D. sukuzii</i>	<i>D. subobscura</i>	<i>D. sukuzii</i>	<i>D. subobscura</i>
A : W (1:1)	86% (10%)	72% (2%)	52% (41%)	93% (3%)
M : A : W (4:3:1)	70% (19%)	92% (2%)	76% (18%)	89% (3%)

Für das Gemisch Apfelessig/Wasser belegten die Fangzahlen eine gute Fängigkeit des Prototyps für *D. sukuzii* (86%), bei einer gleichzeitig reduzierten mittleren Fangrate von *D. subobscura* (72%). Für die modifizierte Falle ergab sich ein völlig anders Bild: Die Fangquote für die Kirschessigfliege sank auf den sehr

niedrigen Wert von durchschnittlich 52% ab (bei gleichzeitig stark erhöhter Mortalitätsrate), von *D. subobscura* wurden dagegen mit der modifizierten Falle im Mittel 93% der Individuen gefangen.

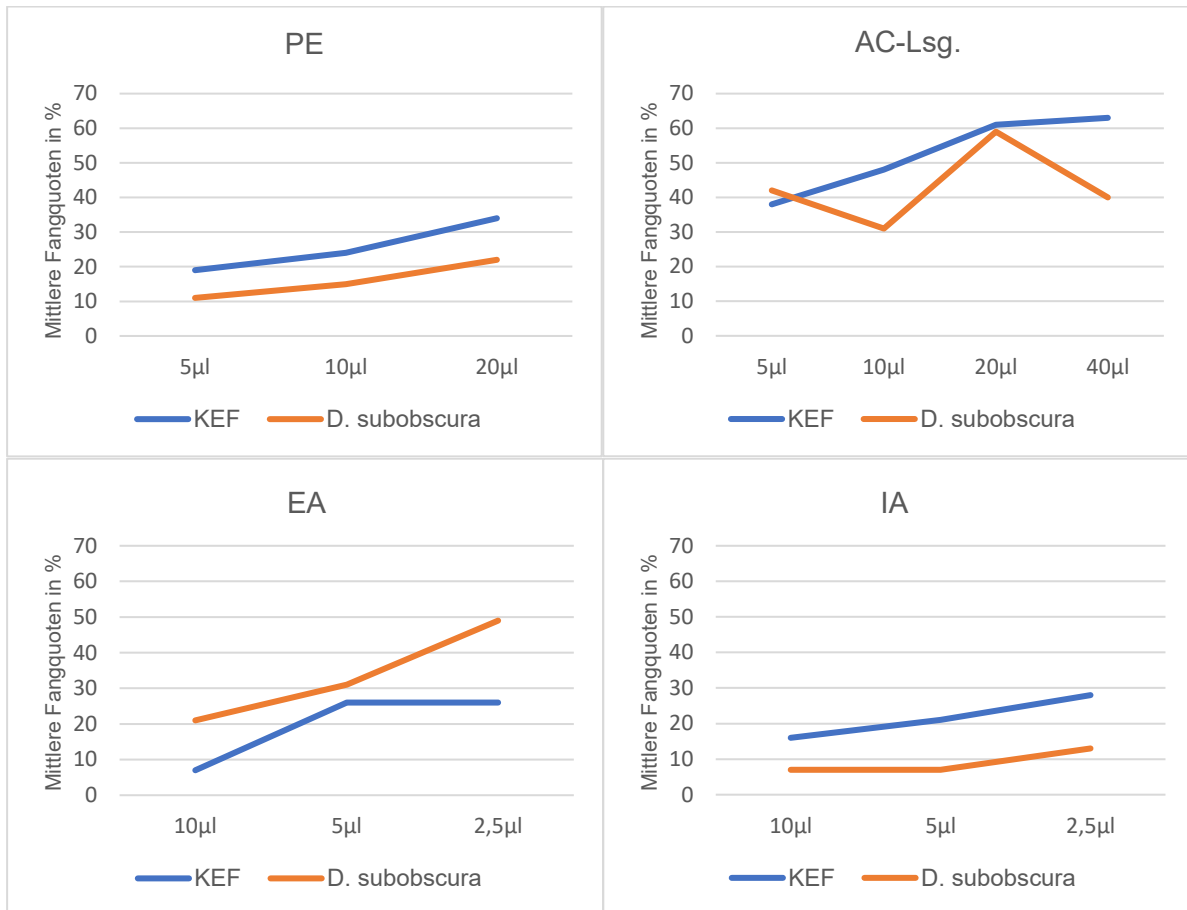
Bei Verwendung des Lebensmittelgemisches bestehend aus Merlotwein, Apfelessig und Wasser im Prototyp wurden im Mittel deutlich mehr Individuen von *D. subobscura* gefangen (92%), die durchschnittliche Fangrate der Kirschessigfliege lag dagegen bei nur 70%. Bot man die Lebensmittelmischung in der modifizierten Falle an, stieg die Fangquote von *D. suzukii* leicht auf 76% an, die von *D. subobscura* blieb mit 89% auf einem vergleichbaren Niveau. Die Beobachtungen während der Versuche zeigten, dass die größeren Weibchen der Kirschessigfliege nicht immer durch die 2,2mm kleinen Einfluglöcher hindurchpassten, worauf wahrscheinlich die hohen Mortalitätsraten dieser Spezies während der Versuche zurückzuführen sind. Der Durchmesser der Einfluglöcher wurde daraufhin für die weiteren Freilandversuche von 2,2mm auf 2,6mm vergrößert. Die baulichen Veränderungen des Fallen-Prototyps führten nicht zu einer Erhöhung der Spezifität, die durchschnittlichen Fangquoten von *D. subobscura* lagen mit Werten von 89% bis 93% auf einem sehr hohen Niveau bei gleichzeitig sehr niedriger Mortalitätsrate.

Für die Validierung der IS-Falle im Freiland (siehe AP 3.3) wurde diese weiteren Modifikationen unterzogen: einer partiellen roten Einfärbung des Fallenkörpers sowie der Anbringung von Dispenserfläschchen unter dem Fallendeckel zum Einsatz von synthetischen Lockstoffen.

### **AP 3.2 Optimierung der Spezifität des Lockstoffs**

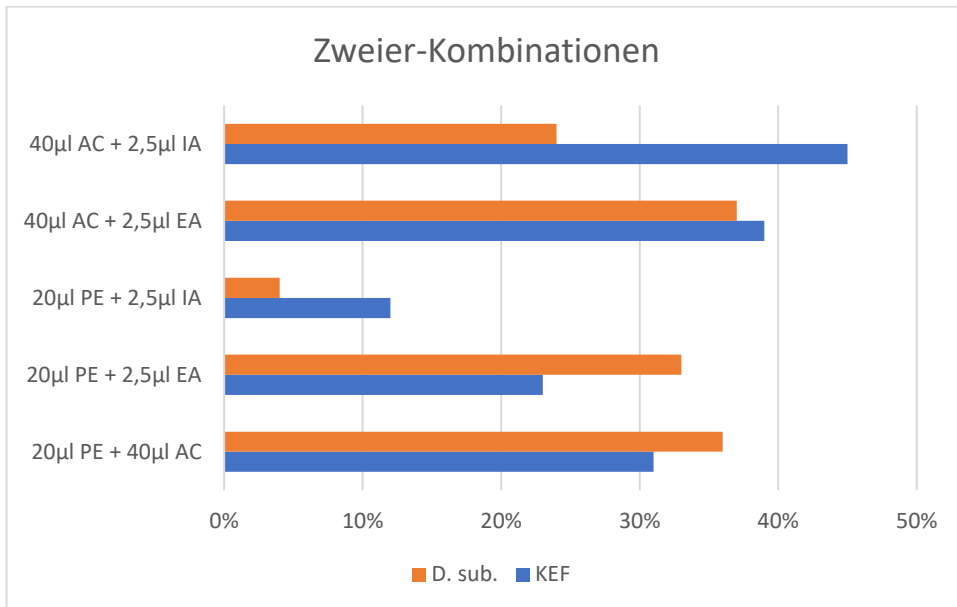
Um die Selektivität der IS-Falle gegenüber *D. suzukii* zu erhöhen, sollte neben den baulichen Anpassungen auch die Spezifität des Lockstoffes optimiert werden. Getestet wurde die Zugabe von vier ausgewählten fruchtspezifischen Duftstoffen (PE, eine unverdünnte wässrige AC-Lösung, IA und EA), deren Attraktivität auf *D. suzukii* bereits in double choice Versuchen nachgewiesen wurde (siehe AP 2). Die Substanz EA wird, wie auch IA und EH, von einer Vielzahl an Wirtsfrüchten abgegeben und findet sich auch im Duftstoffbouquet von Rotwein und Essig. Die Versuche mit diesen Duftstoffen wurden in zweifacher Wiederholung mit dem Prototyp der IS-Falle in großen Gazezelten durchgeführt (Maße: 75cm x 75cm x 115cm), als Fangflüssigkeit wurden 100ml Wasser (plus einem Spritzer Spüli) verwendet. Die Substanzen wurden auf Filterpapier aufgebracht, welches innen am Deckel der Falle befestigt wurde.

In Abbildung 24 sind die durchschnittlichen Fangraten für die beiden Essigfliegenarten bei Angebot unterschiedlicher Mengen der Testsubstanzen dargestellt. Zu beachten ist, dass die Fangquoten für EA und IA von links nach rechts für abnehmende Substanzmengen dargestellt sind. Auffällig ist, dass von EA bei allen getesteten Mengen deutlich mehr Individuen von *D. subobscura* angelockt werden, bei gleichzeitig niedrigen mittleren Fangquoten der Kirschessigfliege. Die Fangquoten von *D. suzukii* liegen für IA auf einem vergleichbar niedrigen Niveau (knapp unter 30%), aber immer deutlich über denjenigen von *D. subobscura*. Dies trifft auch für PE zu, beim Test von 20µl liegt die KEF-Fangquote etwas über 30%, die Fangquoten für *D. subobscura* liegen (bei allen getesteten Mengen) immer ca. 10% darunter. Die stärkste attraktive Wirkung auf *D. suzukii* konnte in diesen Versuchen bei Verwendung der unverdünnten AC-Lösung nachgewiesen werden. Bei 20µl und 40µl liegen die mittleren Fangquoten bei 61% bzw. 63%. Im Vergleich dazu zeigt die Fangquote von *D. subobscura* starke Schwankungen, bei 20µl werden vergleichbar viele Individuen gefangen, bei 40µl sinkt die Fangquote im Vergleich zu derjenigen der Kirschessigfliege wieder deutlich ab.



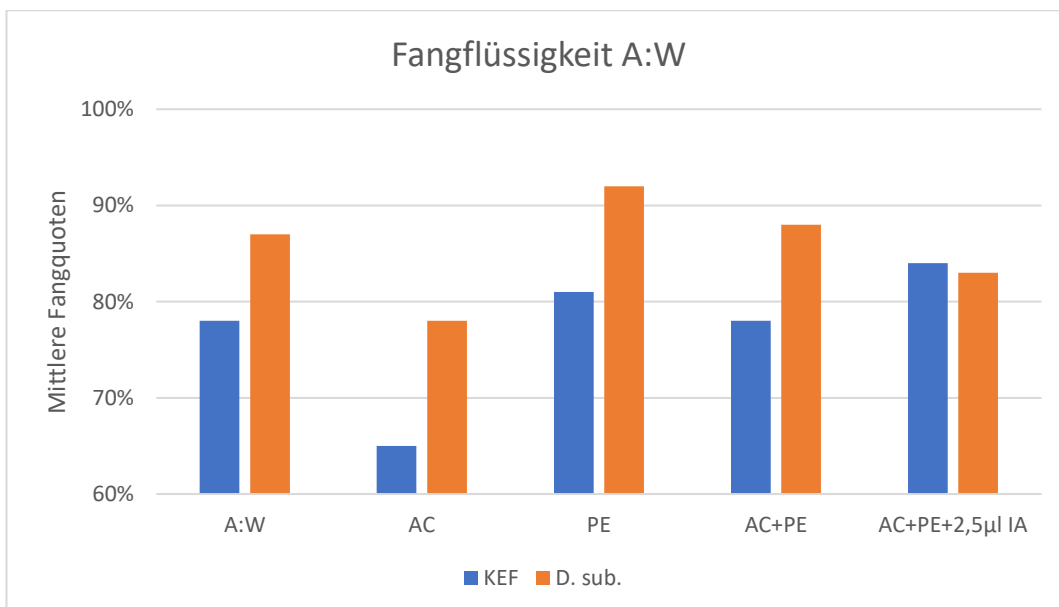
**Abbildung 24:** Mittlere Fangquoten von *D. sukii* und *D. subobscura* im Test mit verschiedenen Substanzen, die in unterschiedlicher Menge getestet wurden (n=2), Fangflüssigkeit: Wasser.

Im Anschluss an diese Versuche wurden Zweier-Kombinationen der vier Substanzen getestet, verwendet wurde dabei diejenige Menge, die in den vorangegangenen Versuchen am attraktivsten auf die Kirschessigfliege wirkte. Keine Berücksichtigung fand die Kombination von EA und IA, da mit ersterer Substanz zu viele Individuen von *D. subobscura* angelockt wurden und die KEF-Fangraten von letzterer zu gering waren. Die Ergebnisse dieser nach der gleichen Methode durchgeführten Versuche sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Fangquoten belegen, dass durch die Kombination von jeweils zwei Substanzen kein synergistischer Effekt nachweisbar ist, die Fangzahlen von *D. sukii* liegen immer unter 50%. Die höchste Fangrate der Kirschessigfliege in Kombination mit einer niedrigen Fangquote von *D. subobscura* wurde bei der Kombination von 40µl der wässrigen AC-Lösung und 2,5µl IA erreicht. Die Ergebnisse deuten an, dass die Verwendung von IA zu einer reduzierten Fangquote von *D. subobscura* beitragen könnte.



**Abbildung 25:** Mittlere Fangquoten von *D. sukuzii* und *D. subobscura* im Test mit verschiedenen Substanzen, die in Zweierkombinationen getestet wurden (n=2); Fangflüssigkeit: Wasser.

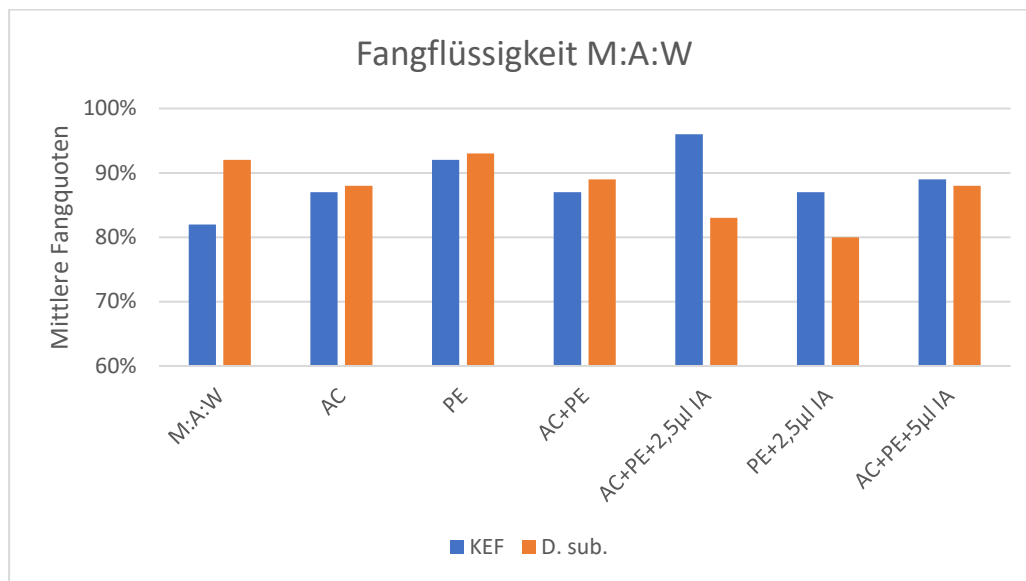
Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass das Angebot der ausgewählten Substanzen in Kombination mit Wasser als Fangflüssigkeit nur eine geringe Anlockung von *D. sukuzii* induziert. Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen als Fangflüssigkeit entweder ein Gemisch aus Apfelessig und Wasser (1:1) oder ein Gemisch aus Merlot, Apfelessig und Wasser (4:3:1) verwendet. Auch diese Versuche wurden in den größeren Gazezelten durchgeführt, die unverdünnte, gesättigte AC-Wasserlösung wie auch das PE (1:500 in Mineralöl verdünnt) wurden dabei aber nicht auf Filterpapier appliziert, sondern über Dispenserfläschchen mit durchlässigen Membranscheiben in den Fallenkorpus abgegeben. Der Duftstoff IA wurde dagegen direkt in die Fangflüssigkeit pipettiert.



**Abbildung 26:** Mittlere Fangquoten von *D. sukuzii* und *D. subobscura* ohne und mit Zusatz von 3 ausgewählten Substanzen im Vergleich zur reinen Fangflüssigkeit (n=2); Fangflüssigkeit: Apfelessig und Wasser 1:1.

Die mittleren Fangzahlen für die beiden Essigfliegenarten zeigen, dass bei alleiniger Verwendung der aus Apfelessig und Wasser bestehenden Fangflüssigkeit ca. 10% mehr Individuen von *D. subobscura* gefangen werden. Nach Zugabe von AC, PE oder beiden Substanzen bleibt dieses Verhältnis bestehen, die alleinige

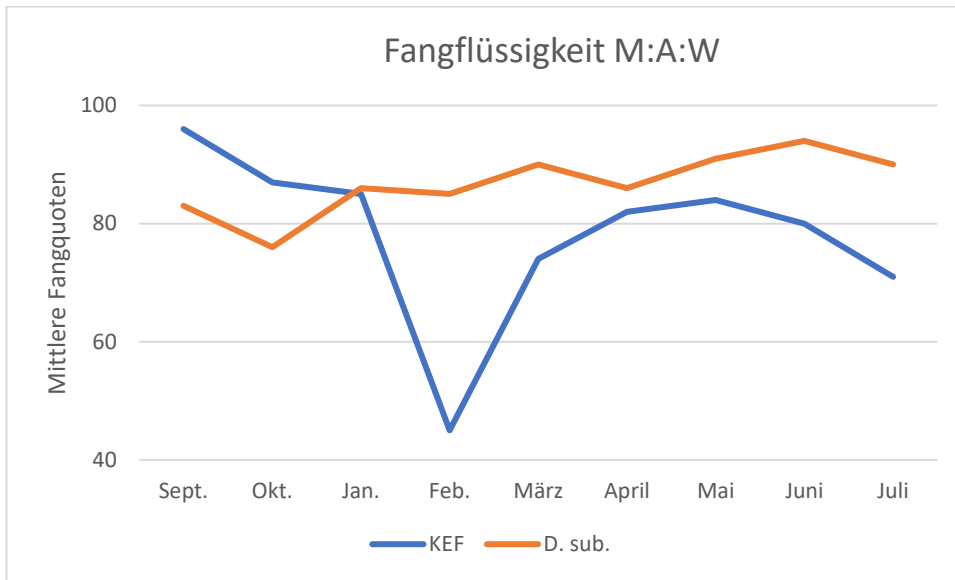
Zugabe von AC bewirkt aber einen deutlichen Rückgang der Fangquote der Kirschessigfliege. Werden alle drei Duftstoffe zusätzlich zur Fangflüssigkeit in der Falle angeboten, liegen die Fangquoten für beide Arten über 80%.



**Abbildung 27:** Mittlere Fangquoten von *D. suzukii* und *D. subobscura* ohne und mit Zusatz von 3 ausgewählten Substanzen im Vergleich zur reinen Fangflüssigkeit bestehend aus Merlot, Apfelessig und Wasser (4:3:1); n=2.

Die in Abbildung 27 dargestellten Fangquoten belegen, dass mit dem Lebensmittelgemisch bestehend aus Merlot, Apfelessig und Wasser ähnliche viele Individuen der Kirschessigfliege angelockt werden wie mit dem Apfelessig-Wasser-Gemisch, die Fangquote von *D. subobscura* liegt im Vergleich dazu aber deutlich höher. Nach Zugabe von AC, PE oder beiden Substanzen erhöhen sich die Fangquoten der KEF leicht, diejenigen von *D. subobscura* liegen dabei auf einem ähnlichen Niveau (88%-93%). Werden alle drei Substanzen in der Falle angeboten, zeigt sich eine leichte Verschiebung der mittleren Fangzahlen, es werden 96% der im Gazezelt befindlichen KEF-Individuen gefangen und nur 83% der *D. subobscura* Individuen. Damit bestätigt sich, dass durch das zusätzliche Angebot von AC und PE die Fangquote der Kirschessigfliege gesteigert werden kann, während IA eine, wenn auch geringe, Reduktion der Fangzahlen von *D. subobscura* bewirkt. Nimmt man AC aus dieser Dreierkombination heraus, verringert sich die hohe Fangquote der KEF wiederum. Auch die Veränderung der angebotenen IA-Menge führt zu einer Verringerung der KEF-Fangquote bei gleichzeitigem Anstieg der Fangzahlen von *D. subobscura*.

Zur Validierung der mit den Substanzen PE, AC und IA (2,5µl) im Herbst erzielten Laborergebnisse wurden im weiteren Jahresverlauf monatlich zwei Versuchswiederholungen durchgeführt. Die in Abbildung 28 dargestellten Ergebnisse zeigen eine durchgehend hohe Fängigkeit von *D. subobscura*, die Werte schwanken zwischen Februar und Juli zwischen 85% und 94% und liegen in diesem Zeitraum immer über denjenigen der Kirschessigfliege. Dabei sind die Fangquoten von *D. suzukii* großen Schwankungen unterworfen: Nach einem starken Einbruch der Fängigkeit im Februar auf nur 45% steigen die Zahlen im Frühjahr auf 84% an und sinken danach wieder auf 71% ab. Die im Herbst in den Laborversuchen beobachtete erhöhte Selektivität der Lockstoffe konnte somit in weiteren saisonalen Versuchen nicht bestätigt werden. Obwohl die Fliegen ganzjährig unter gleichbleibenden Laborbedingungen gehalten werden, können die vorherrschenden jahreszeitlichen Bedingungen im Freiland Auswirkungen auf ihr Verhalten haben.



**Abbildung 28:** Mittlere Fangquoten von *D. suzukii* und *D. subobscura* bei Verwendung der Fangflüssigkeit bestehend aus Merlot, Apfelessig und Wasser (4:3:1) unter Zusatz von den drei Duftstoffen PE, AC (Abgabe aus Fläschchendispensern) und IA (Applikation in die Fangflüssigkeit); n=2.

### AP 3.3 Validierung der Falle im Freiland

Zur Validierung der modifizierten IS-Fallen im Freiland dienten ein Wildhabitat im Raum Neustadt an der Weinstraße mit potentiellen Überwinterungsverstecken und wilden Wirtspflanzen von *D. suzukii* (Brombeeren und Holunder) sowie ein Obstbaugrundstück mit Mischkultur, auf dem ebenfalls zahlreiche beliebte Kulturwirte der Kirschessigfliegen stehen (unter anderem Himbeeren, Brombeeren, Holunder und Kirschen). Folgende Modifikationen der IS-Falle wurden im Laufe des Projektes getestet:

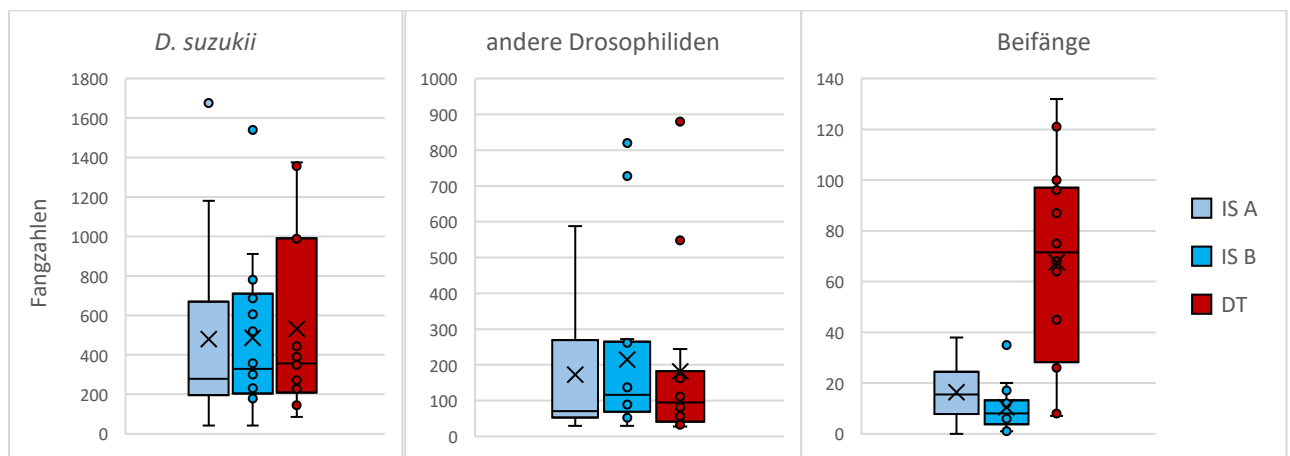
- IS A: 60 Einfluglöcher,  $\varnothing$  2,2mm
- IS B: 82 Einfluglöcher,  $\varnothing$  2,2mm
- IS C: 82 Einfluglöcher,  $\varnothing$  2,6mm

Als Lockstoff wurden je 100ml der fängigen Mischung aus Merlot, Apfelessig und Wasser im Verhältnis 4:3:1 verwendet. Die Fallen wurden i.d.R. wöchentlich geleert und die darin enthaltenen Insekten ausgezählt. Erfasst wurden neben den Fangzahlen der männlichen und weiblichen *D. suzukii* auch die Fangzahlen weiterer Drosophilidenspezies sowie der Nichtzielorganismen. Im ersten Versuchsjahr diente zudem eine im Handel erhältliche Massenfalle als Vergleich.

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Anzahl der Einfluglöcher auf die Fangzahlen der Insekten hat, wurden im ersten Versuchsjahr die Fallen-Modifikationen IS A und IS B während der Fruchtreife der Brombeeren in einem Wildhabitat ausgehängt (Versuchszeitraum 06.07.23 bis 26.10.23). Eine im Handel erhältliche Massenfalle diente ebenfalls als Vergleich. Diese hat neben einem leuchtend roten Fallenkörper 21 Einfluglöcher mit einem Durchmesser von 8mm, welche durch einen Querbalken geteilt sind. Die großen Einfluglöcher haben zur Folge, dass sie zwar verhältnismäßig mehr *D. suzukii* ködert als die IS-Fallen, allerdings auch eine große Anzahl unerwünschter Insektentaxa. Um dies bei der IS-Falle zu verhindern, wurden die Einfluglöcher so klein wie möglich gehalten.



**Abbildung 29:** In einem Wildhabitat 2023 getestete Fallenvarianten; links: IS A, rechts: IS B.



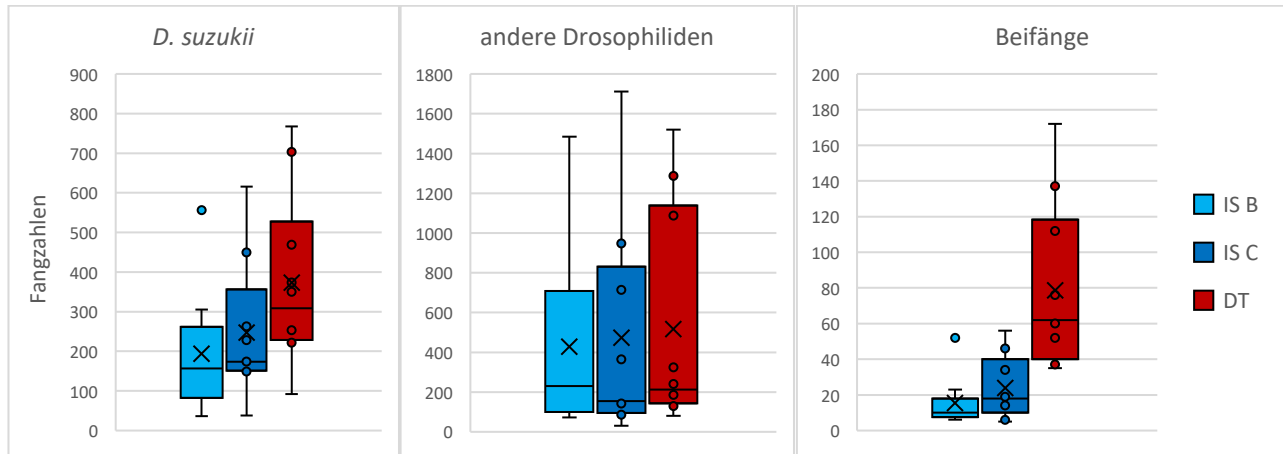
**Abbildung 30:** Fangzahlen von *D. sukukii*, anderen Drosophiliden und Beifängen weiterer Insektentaxa aus drei verschiedenen Fallentypen in einem Wildhabitat; Versuchszeitraum: 06.07.23 bis 26.10.23; DT=im Handel erhältliche Massenfänge.

Die Erhöhung der Anzahl der Einfluglöcher von 60 auf 82 bei den IS-Fallen hatte keine nennenswerte Steigerung der Kirschessigfliegenfänge zur Folge (Abb. 30). Im Vergleich zu der im Handel erhältlichen Massenfänge liegen die Fangzahlen von *D. sukukii* auf einem vergleichbaren Niveau. Dies gilt ebenso für alle weiteren geköderten Drosophilidenspezies. Die Beifänge unerwünschter Insektentaxa sind bei der im Handel erhältlichen Massenfänge dagegen signifikant höher als die der beiden IS- Fallen (Kruskal-Wallis  $p < 0,001$ ; Dunn-Bonferroni post-hoc-Test).

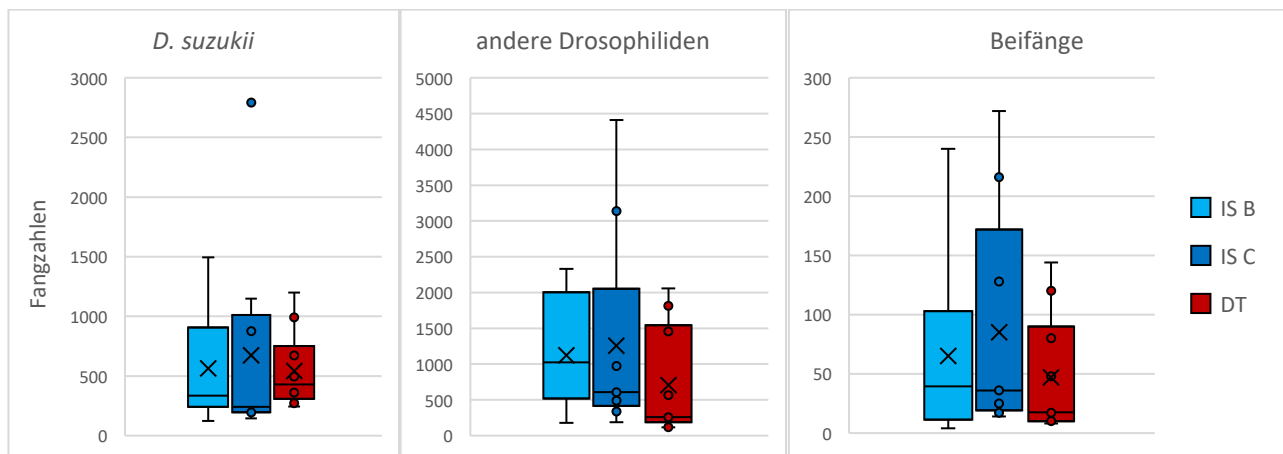
Parallel dazu wurden in Kultur-Himbeeren und Kultur-Brombeeren die Fallen-Modifikationen IS B und IS C, welche sich im Durchmesser der Einfluglöcher (2,2mm und 2,6mm) unterscheiden, gegeneinander getestet (Abb. 31 und 32). Vergleicht man die Fangzahlen von *D. sukukii* aus den verschiedenen Fallentypen in der Himbeeranlage, so schneidet die im Handel erhältliche Massenfänge im Mittel besser ab als die IS-Fallen; im Gruppenvergleich mit dem Kruskal-Wallis-Test lassen sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Fallentypen feststellen. Was die sonstigen geköderten Insektentaxa angeht, so schneidet die im Handel erhältliche Massenfänge genau wie im Wildhabitat am schlechtesten ab, die Fangzahlen sind signifikant höher als die aus den IS-Fallen.

In der Kultur-Brombeeranlage lagen die Fangzahlen für *D. suzukii* bei allen getesteten Fallentypen auf einem vergleichbaren Niveau, die Anzahl der geköderten Individuen anderer Drosophiliden und Beifänge ist hier im Mittel bei der kommerziellen Falle etwas niedriger, signifikante Unterschiede liegen aber keine vor.

Die Vergrößerung der Einfluglöcher von 2,2 auf 2,6mm bei den IS-Fallen führte in keiner der beiden Kulturen zu einer nachweisbaren Zunahme der Kirschessigfliegenfänge.



**Abbildung 31:** Fangzahlen von *D. suzukii*, anderen Drosophiliden und Beifängen weiterer Insektentaxa aus drei verschiedenen Fallentypen in Kultur-Himbeeren; Versuchszeitraum: 17.08.23 bis 26.10.23; DT=im Handel erhältliche Massenfangfalle.



**Abbildung 32:** Fangzahlen von *D. suzukii*, anderen Drosophiliden und Beifängen weiterer Insektentaxa aus drei verschiedenen Fallentypen in Kultur-Brombeeren; Versuchszeitraum: 17.08.23 bis 26.10.23; DT=im Handel erhältliche Massenfangfalle.

Im Versuchsjahr 2024 wurden zwei weitere Anpassungen der IS-Falle getestet: zum einen die partielle rote Einfärbung des Fallenkorpus (Abb. 33, rechts), zum anderen der Einsatz von Duftstoffdispensern. Letztere wurden im Inneren der Falle unter dem Deckel angebracht (Abb. 33, Mitte) und enthielten die in Laborversuchen ermittelten, auf *D. suzukii* attraktiv wirkenden Duftstoffe AC (33mg/ml H<sub>2</sub>O) und PE (1:500 in Mineralöl).

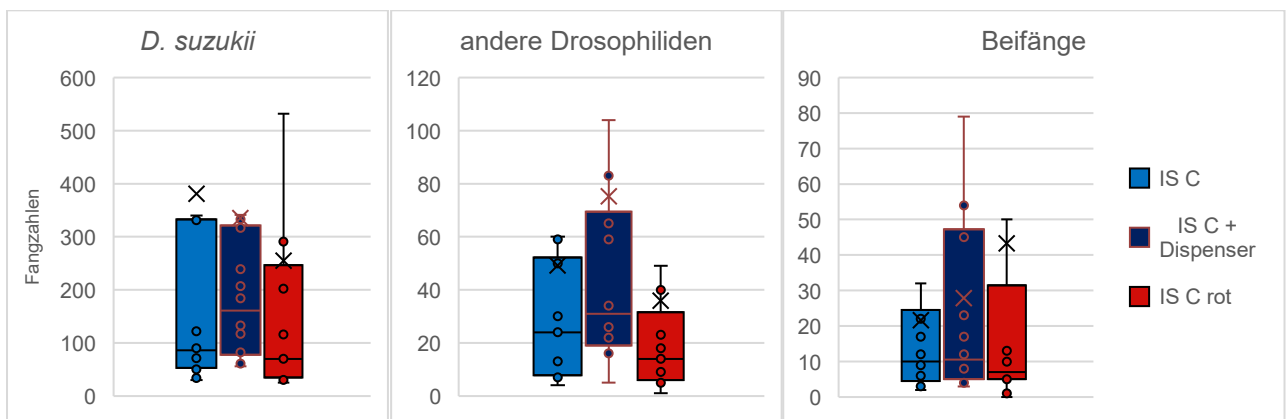
In einem Wildhabitat wurden folgende Fallentypen zum Vergleich ausgehängt:

- IS C
- IS C mit zwei zusätzlichen Dispenserfläschchen
- IS C mit rot eingefärbtem Fallenkorpus

Der Versuchszeitraum lag zwischen dem 27.06.24 und 24.10.24, was den Reifezeitraum der Brombeeren abdeckte.



**Abbildung 33:** In einem Wildhabitat 2024 getestete Fallenvarianten; links: IS C; Mitte: IS C mit Dispensern; rechts: IS C rot.



**Abbildung 34:** Fangzahlen von *D. suzukii*, anderen Drosophiliden und Beifängen weiterer Insektentaxa aus drei verschiedenen Fallentypen in einem Wildhabitat; Versuchszeitraum: 27.06.24 bis 24.10.24.

Der zusätzliche Einsatz der beiden Duftstoffdispenser im Inneren der Lockstofffallen führte im Mittel zu keiner Erhöhung der *D. suzukii*-Fänge, allerdings kam es zu einem leichten Anstieg der Fangzahlen anderer Drosophiliden und Nichtzielinsekten. Der rote Fallenkörper hatte im Schnitt die wenigsten Kirschessigfliegenfänge zu verzeichnen, dagegen wurden mit dieser Falle weniger andere Drosophilidenspezies geködert. Keine der Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen waren im Kruskal-Wallis-Test signifikant.

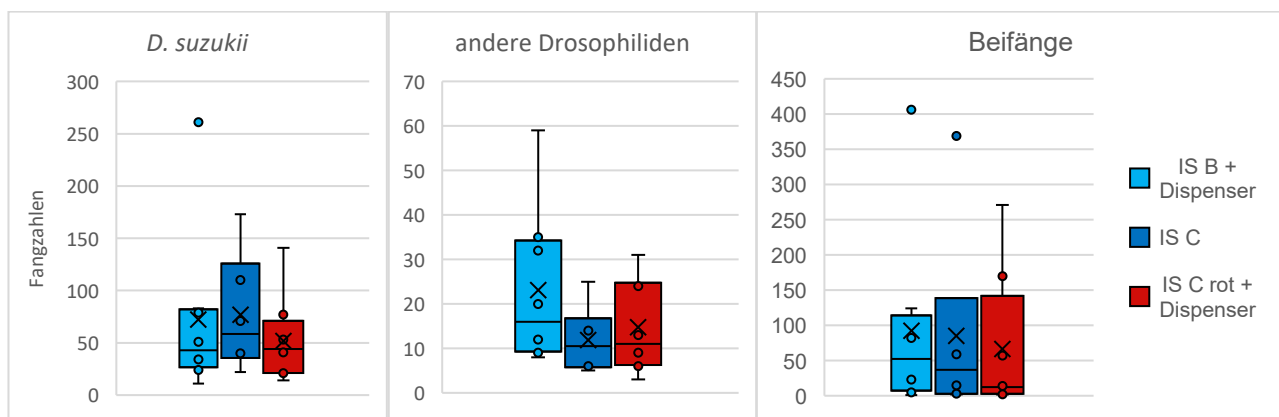
Im selben Versuchsjahr wurden in zwei Obstkulturen (Himbeeren und Holunder) folgende Fallenvariationen zum Vergleich ausgehängt:

- IS B mit zwei zusätzlichen Dispenserfläschchen
- IS C
- IS C rot, mit zwei zusätzlichen Dispenserfläschchen

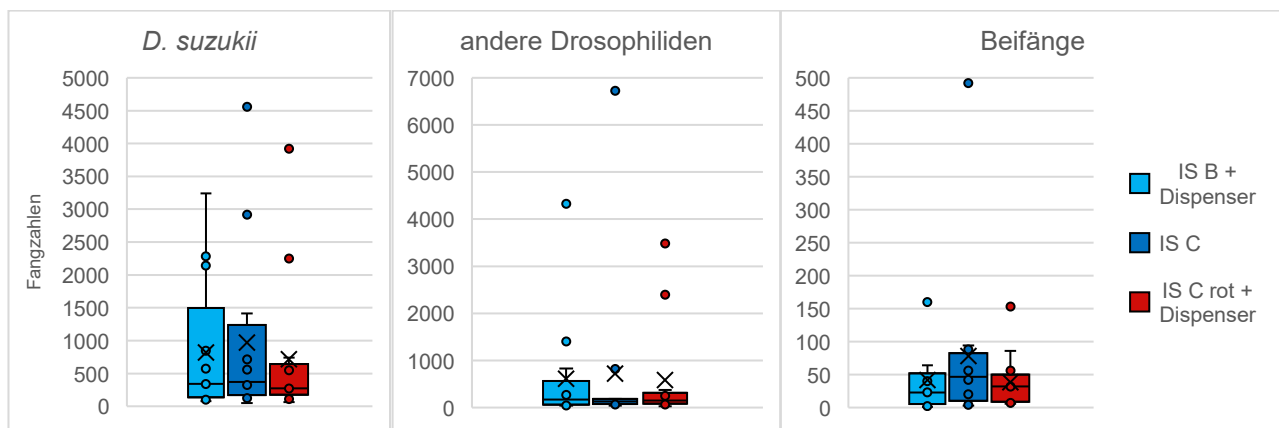
Der Versuchszeitraum für die Kultur-Himbeeren war vom 11.07. bis 26.09.24, die Fallen im Holunder hingen vom 25.07. bis 21.11.24.



**Abbildung 35:** In einem Obstbaugrundstück 2024 getestete Fallenvarianten; links: IS B mit Dispensern; Mitte: IS C; rechts: IS C rot mit Dispensern.



**Abbildung 36:** Fangzahlen von *D. suzukii*, anderen Drosophiliden und Beifängen weiterer Insektentaxa aus drei verschiedenen Fallentypen in Kultur-Himbeeren; Versuchszeitraum: 11.07.24 bis 26.09.24.



**Abbildung 37:** Fangzahlen von *D. suzukii*, anderen Drosophiliden und Beifängen weiterer Insektentaxa aus drei verschiedenen Fallentypen in Holunder; Versuchszeitraum: 25.07.24 bis 21.11.24.

In den Obstkulturen Himbeere und Holunder wurde 2024 untersucht, ob durch eine Kombination aus rotem Fallenkörper und Duftstoffdispensern eine Steigerung der *D. suzukii*-Fänge erreicht werden kann. Auch die Kombination IS B (Einfluglöcher mit  $\varnothing$  2,2mm) und Duftstoffdispenser wurde getestet, um den durch die Duftstoffe beobachteten Anstieg an unerwünschten Beifängen zu dezimieren.

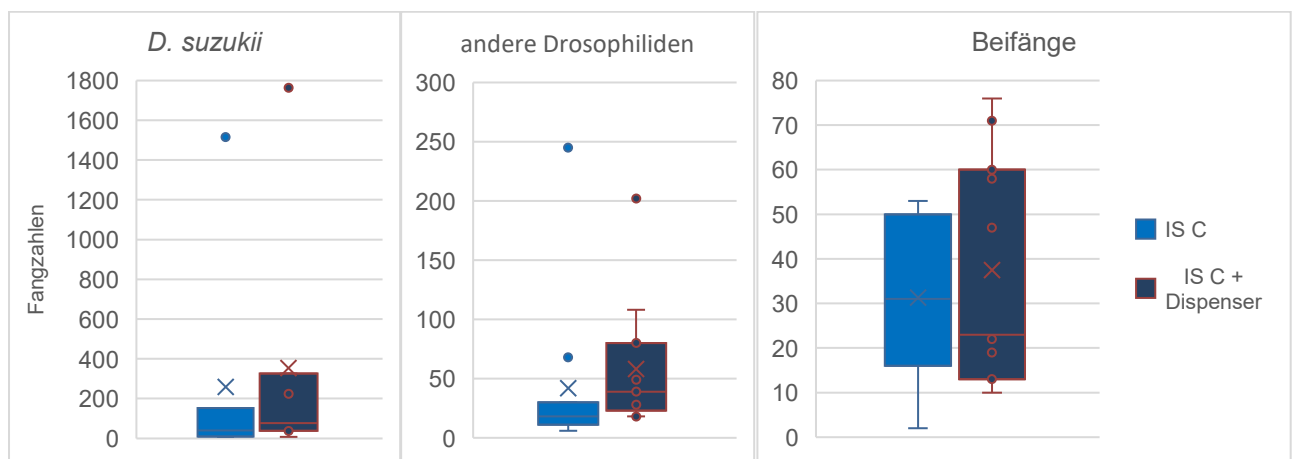
Wie sich zeigte, konnte eine maßgebliche Erhöhung der Kirschessigfliegenfänge durch den Einsatz zusätzlicher Duftstoffdispenser mit den darin enthaltenen Substanzen AC und PE nicht erzielt werden. In Kombination mit dem roten Fallenkörper lagen die Fangzahlen im Mittel sogar noch etwas niedriger als bei dem reinen Lebensmittelgemisch, angeboten in der transparenten IS-Falle, welches solo bereits sehr gute

Fangerfolge erzielte. In der Himbeeranlage führte die Kombination IS B mit Dispensern zu einer leichten Erhöhung der Fangzahlen weiterer Essigfliegenarten. Keine der Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen waren im Kruskal-Wallis-Test signifikant.

Im letzten Versuchsjahr wurde die Duftstoffkombination in den IS-Fallen um ein weiteres Attraktant ergänzt. Wie sich in Laboruntersuchungen des Projektpartners Insect Services zeigte, erzielte die Dreierkombination aus wässriger AC-Lsg., PE und IA im Vergleich zu anderen Kombinationen die höchsten Fangraten für *D. suzukii*, bei gleichzeitig leichter Reduktion der *D. subobscura*-Fänge (AP 3.2).

In einem Wildhabitat mit Brombeeren wurden zwischen dem 15.05. und 17.07.25 folgende Fallentypen gegeneinander getestet: IS C und IS C mit der Duftstoff-Dreierkombination, bestehend aus AC (33mg/ml H<sub>2</sub>O) und PE (1:500 in Mineralöl), beide wie zuvor in Fläschchendispensern eingebracht, sowie 2,5µl IA, welches direkt in die Lockflüssigkeit pipettiert wurde.

Obwohl die Anzahl der geköderten Kirschessigfliegen in der Falle mit den Duftstoffzusätzen im zeitlichen Verlauf immer etwas höher lag als bei der Falle ohne Zusätze, waren die Unterschiede nicht signifikant (t-Test für unabhängige Stichproben). Trotz dem Zusatz von IA, welches im Labor zu einer leichten Reduktion der *D. subobscura*-Fänge führte, wurde auch hier ein leichter Anstieg der Fangzahlen anderer Drosophilidenspezies beobachtet. Die Spezifität der Falle konnte durch die beigefügte Duftstoffkombination somit nicht verbessert werden.



**Abbildung 38:** Fangzahlen von *D. suzukii*, anderen Drosophiliden und Beifängen weiterer Insektentaxa aus zwei verschiedenen Fallentypen in einem Wildhabitat; Versuchszeitraum: 15.05.25 bis 17.07.25.

### Zusammenfassung AP 3

Durch die baulichen Veränderungen des Prototyps der IS-Falle konnten verschiedene Komponenten optimiert werden. Zum einen wurde durch die Anpassung des Lochdurchmessers auf 2,6mm der Zuflug von unerwünschten Beifängen auf einem niedrigen Niveau gehalten. Im Vergleich zu einer im Handel erhältlichen Massenfangfalle waren die Fangzahlen der Nichtzielorganismen in den IS-Fallen signifikant niedriger. Gleichzeitig wurde mit diesem Durchmesser sichergestellt, dass auch größere Exemplare der Kirschessigfliegen hindurchpassen. Zum anderen konnte durch die Neuordnung der Einfluglöcher die Handhabung der Falle in Bezug auf den Wechsel der Lockflüssigkeit verbessert werden. Interessanterweise führte eine rote Einfärbung des Fallenkorpus nicht zu erhöhten Fangzahlen. Offensichtlich wurde diese Rotfärbung von den Fliegen nicht als attraktive Fruchtfarbe wahrgenommen. Dies erklärt u.a., warum die transparente IS-Falle vergleichbare Fangzahlen von *D. suzukii* wie die rote kommerzielle Massenfangfalle aufwies.

Um eine Erhöhung der Spezifität der Falle zu erreichen, wurde der Zusatz von ausgewählten, fruchtspezifischen Duftstoffen getestet. Dies führte unter Laborbedingungen bei kurzer Versuchsdauer zu erhöhten mittleren KEF-Fangquoten von 80% bis über 90%. Die Fangquoten vor allem der Kirschessigfliege unterlagen dabei aber großen, jahreszeitlich bedingten Schwankungen, während die Fangzahlen von *D. subobscura* immer auf einem vergleichbar hohen Niveau verblieben.

Bei der Freilandvalidierung führte keine der getesteten Duftstoff-Kombinationen zu einer maßgeblichen Steigerung der Kirschessigfliegenfänge. Die eingesetzte Lebensmittelmischung aus Merlot, Apfelessigessig und Wasser in der transparenten IS-Falle führte auch ohne den Zusatz der getesteten Duftstoff-Kombinationen zu hohen Fangerfolgen. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Fangquoten der Fallen während der Fruchtreife, wenn die Lockstoffe mit dem Duftstoffbouquet der Wirtsfrüchte konkurrieren, nicht durch den zusätzlichen Einsatz von fruchtspezifischen Duftstoffen erhöht werden konnten.

#### **Arbeitspaket 4: Entwicklung einer SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix zur Einbindung der Duftstoffe**

##### **AP 4.1 Entwicklung einer nicht phytotoxischen SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix**

Die Grundlage zur Einbindung der Duftstoffe bildete eine wasserbasierte Matrix, die auf einem Siliciumdioxid-Trägersystem (SiO<sub>2</sub>) basiert. Diese Matrix wurde in verschiedenen Varianten getestet, wobei sich die jeweiligen Formulierungen insbesondere durch die Zugabe funktioneller Zusätze unterschieden. Dabei kamen sowohl repellente als auch attraktive Duftstoffe zum Einsatz, um unterschiedliche Wirkprofile innerhalb des Anwendungsbereichs zu untersuchen.

Insgesamt wurden verschiedene Formulierungen entwickelt und eingesetzt. Diese wurden intern systematisch codiert, um eine anonymisierte, aber nachvollziehbare Auswertung und Dokumentation im Projektverlauf zu ermöglichen. Aus Gründen des Schutzes von Betriebs- und Geschäftsgeheimnissen werden weder die genauen Produktnamen noch die spezifischen Zusammensetzungen oder Konzentrationen der verwendeten Formulierungen veröffentlicht.

Für die Entwicklung der SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix wurde gezielt ein  $\beta$ -Cyclodextrin ausgewählt (Artikelnummer AB147391, CAS-Nr.: 7585-39-9). Die Lieferung dieser Substanz ermöglichte es, eine Reihe weiterführender Laborversuche durchzuführen, mit dem Ziel, die SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix herstellungstechnisch zu optimieren und zugleich die Kompatibilität der einzubindenden Duftstoffe zu untersuchen.

Die initialen Versuchsreihen konzentrierten sich auf die Herstellung und technische Entwicklung der SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix. Dabei wurden verschiedene Verfahrensansätze getestet, um eine möglichst homogene Integration des Cyclodextrins in die Siliciumdioxid-Struktur zu erreichen. Durch gezielte Variation und Optimierung zentraler Prozessparameter wie Temperatur, Druck und Mischungsverhältnis konnte eine Herstellmethode etabliert werden, die eine gleichmäßige Verteilung der Cyclodextrin-Moleküle innerhalb der Matrix sicherstellt.

Parallel dazu wurden unterschiedliche Verfahren zur Herstellung der Cyclodextrin-Duftstoff-Komplexe miteinander verglichen, um deren physikochemische Eigenschaften zu evaluieren und die Eignung für die weitere Anwendung in der Matrix zu bewerten. Zum Einsatz kamen dabei unter anderem:

- die Co-Präzipitations-Methode zur Bildung homogener Einschlusskomplexe,
- die Knetmethode mit Fokus auf mechanische Stabilität und verbesserte Löslichkeit,
- sowie lösungsbasierte Verfahren unter Verwendung organischer und wässriger Lösungsmittel zur Maximierung der Einlagerungseffizienz.

Ein zentrales Kriterium für die Weiterentwicklung und spätere Anwendung der SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix war deren Phytotoxizitätsprofil. Um sicherzustellen, dass diese Matrix für die Anwendung auf lebendem

Pflanzenmaterial geeignet ist, wurden zunächst die Basisformulierungen, d. h. die SiO<sub>2</sub>-Matrix mit und ohne Cyclodextrin hinsichtlich ihrer phytotoxischen Eigenschaften geprüft. Diese Untersuchungen erfolgten in enger Kooperation mit unserem Projektpartner RLP AgroScience, der eigens entwickelte und validierte Testmethoden einsetzte, um mögliche Effekte der Matrix auf Pflanzengewebe fundiert zu bewerten.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass keine der getesteten Grundkomponenten eine Phytotoxizität an den Pflanzen auslöste. Im weiteren Projektverlauf wurden alle verwendeten Formulierungen auf ihre Pflanzenverträglichkeit überprüft. Die Applikation auf die Pflanzenoberflächen erfolgte mittels Pumpsprüher. Je nach Vegetationszeitpunkt wurden verschiedene Kulturpflanzen verwendet (Gattungen Malus, Prunus, Fragaria, Vaccinium oder Vitis). Alle getesteten Cyclodextrin-Duftstoff-Komplexe hinterließen nach der Applikation einen schlecht abwaschbaren, weißen Spritzbelag auf der Pflanzenoberfläche, führten aber zu keiner Phytotoxizität. Formulierungen ohne Cyclodextrin, die ein Terpen in einer 1:10 Verdünnung enthielten, lösten innerhalb der ersten 24 Stunden starke phytotoxische Symptome an den Pflanzen aus. Diese äußerten sich in Blattnekrosen oder vollständig eingerollten, verwelkten Blättern. Das Vorhandensein von BA in der Formulierung führte ab einer Konzentration von 0,8% zu leichten Verbräunungen an vorgeschädigten Blättern. Ab einer Konzentration von 4,5% zeigten sich deutliche Blattschäden. Auch die Stoffe EO, EH, HA und HX zeigten bei einer Beimischung von 3% erste Nekrosen. Verwendete Zusatzstoffe (Emulgatoren, Netzmittel) wurden zudem separat in verschiedenen Konzentrationen auf ihre Pflanzenverträglichkeit überprüft. Keine dieser Substanzen hatte phytotoxische Effekte zur Folge.

#### **AP 4.2 Einbindung verschiedener Repellentstoffe in die Matrix**

Zu Beginn erfolgte die Einbindung der Repellentstoffe in die SiO<sub>2</sub>-Matrix ohne Zusatz von Cyclodextrin. Ziel dieses Schrittes war es, die grundsätzliche Kompatibilität der Substanzen mit der Matrix zu prüfen und mögliche Inkompatibilitäten frühzeitig auszuschließen. Diese Substanzen wurden in einem gemeinsam abgestimmten Verdünnungsgrad in die Matrix eingebracht und anschließend Lagerungsversuchen unterzogen, um deren Stabilität im System zu überprüfen.

Nachdem die Formulierungen mit den eingebrachten Repellentstoffen hinsichtlich ihrer Beständigkeit positive Ergebnisse zeigten, wurde im nächsten Schritt die Entwicklung von Einschlusskomplexen mit β-Cyclodextrin vorangetrieben. Die ausgewählten Duftstoffe wurden zunächst in Lösung gebracht, mit Cyclodextrin zur Komplexbildung versetzt, das Lösungsmittel entfernt und die resultierenden Komplexe getrocknet. Das so gewonnene granuliert Material wurde anschließend an die Projektpartner versendet, mit dem Ziel, die Komplexe dort in die SiO<sub>2</sub>-Matrix einzuarbeiten und die so entstandene SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix in anschließenden Bioversuchen mit *D. suzukii* auf ihre Wirksamkeit zu überprüfen. Folgende Matrizen mit Cyclodextrin-Einschlusskomplexen wurden hergestellt:

- SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-LI-Matrix
- SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-MY-Matrix
- SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-TP-Matrix
- SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-BA-Matrix

Im Rahmen der anschließenden analytischen und biologischen Untersuchungen zeigte sich, dass die Cyclodextrin-Komplexe keine kontrollierte und reproduzierbare Freisetzung der Wirkstoffe gewährleisteten. Die geringe Menge des in die Cyclodextrin-Moleküle eingebundenen Materials führte nicht zu der gewünschten langanhaltend repellenten Wirkung gegenüber *D. suzukii*.

Aufgrund dieser unerwarteten Befunde wurde gemeinsam entschieden, auf die Verwendung von Cyclodextrin zu verzichten. Stattdessen wurde die direkte Einbringung der Repellentstoffe LI, MY, TP und BA in die SiO<sub>2</sub>-

Matrix als bevorzugter Weg weiterverfolgt. Dieser Ansatz wurde durch systematische Variation von Emulgatorkonzentrationen, Mischungsverhältnissen sowie Rührparametern weiter optimiert, um eine homogene Verteilung und stabile Einbindung der Wirkstoffe sicherzustellen. Die repellente Wirksamkeit der Formulierungen wurde im Anschluss in sogenannten double choice Versuchen gegenüber *D. suzukii* getestet. Detaillierte Versuchsergebnisse und Auswertungen sind im Arbeitspaket 5 dokumentiert.

#### **AP 4.3 Einbindung attraktiver Duftstoffe in die Cyclodextrin-Matrix**

In enger Abstimmung mit den Projektpartnern sowie auf Basis einer umfassenden Literaturrecherche wurden insgesamt 17 Substanzen ausgewählt, die in der Fachliteratur mit der olfaktorischen Orientierung der Kirschessigfliege *Drosophila suzukii* in Verbindung gebracht werden. Ziel war es, aus diesem Substanzspektrum potenziell attraktive Verbindungen zu identifizieren, die sich für den weiteren Einsatz im Rahmen des Projekts eignen könnten. Die Auswahl der Substanzen erfolgte gezielt und unter Berücksichtigung unterschiedlicher chemischer Klassen, um eine möglichst breite Wirkstoffbasis abzudecken. Anschließend wurden diese Verbindungen in Attraktivitätsversuchen bei Insect Services getestet. Auf Grundlage der Versuchsergebnisse wurden vier Substanzen für die Herstellung von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen ausgewählt und folgende Matrizen daraus hergestellt:

- SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-PE-Matrix
- SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-AC-Matrix
- SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-IA-Matrix
- SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-EH-Matrix

In anschließenden double choice Versuchen zeigte sich, dass es durch die Einbettung in die SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix zum Verlust der statistisch nachweisbaren attraktiven Wirkung der Reinsubstanzen kam. Im weiteren Schritt wurde daher auf eine Komplexierung mit Cyclodextrinen verzichtet und ausgewählte Attraktantien direkt in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebaut, entweder als Reinsubstanz in verschiedenen Mengen oder als Verdünnung. Da es sich bei AC um eine stark wasserlösliche Substanz handelt, konnte diese nicht in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebaut werden.

Es wurden folgende Matrizen hergestellt:

- SiO<sub>2</sub>-PE-Matrix
- SiO<sub>2</sub>-IA-Matrix
- SiO<sub>2</sub>-HS-Matrix
- SiO<sub>2</sub>-EH-Matrix

Um zu überprüfen, ob die zuvor identifizierten attraktiven Duftstoffe nach der Einbindung in die SiO<sub>2</sub>-Matrix auch tatsächlich wieder aus dieser freigesetzt werden – eine wesentliche Voraussetzung für die spätere Wirksamkeit in der Anwendung – wurden bei Insect Services weitere Gazezeltversuche durchgeführt. Die Auswertung der Versuche zeigte jedoch, dass die Einbindung attraktiver Duftstoffe in die SiO<sub>2</sub>-Matrix zu einem weitgehenden Verlust der anlockenden Wirkung gegenüber *D. suzukii* führte, weshalb der Ansatz der Einbettung attraktiver Substanzen in die Matrix nicht weiterverfolgt wurde. Höchstwahrscheinlich ist dieses Ergebnis darauf zurückzuführen, dass die meisten der untersuchten Attraktantien hydrophil sind und daher nicht effizient in die SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix eingebunden werden können. Detaillierte Versuchsergebnisse, inklusive statistischer Auswertung, sind in den Arbeitspaketen 2 und 5 beim Projektpartner Insect Services dokumentiert.

#### **AP 4.4 Bestimmung der Abgaberate der Duftstoffe (GC/MS)**

Für das Arbeitspaket 4.4 war die Bestimmung der Abgaberate der in Cyclodextrin eingebetteten Duftstoffe vorgesehen. Da die dafür verantwortliche Arbeitsgruppe bereits vor Projektbeginn aufgelöst wurde, sind diese Versuche weggefallen.

Alternativ wurde im Labor des DLR Rheinpfalz untersucht, welche Menge an Duftstoff nach der Komplexierung tatsächlich in den Cyclodextrinen vorlag. Für die Untersuchung wurde ein Cyclodextrin-LI-Komplex ausgewählt, welcher mittels Co-Präzipitationsmethode im eingesetzten Verhältnis 15:85 (LI:Cyclodextrin) hergestellt wurde. Im Anschluss wurde der pulverförmige Komplex einem Waschschrift mit Ethanol unterzogen, um die Anlagerungen des Duftstoffes an den Außenseiten der Cyclodextrinmoleküle zu entfernen. Somit wurde sichergestellt, dass für die Untersuchung nur der im Cyclodextrin eingebettete Anteil an LI verwendet wird. Für die Messung musste dieser zunächst wieder aus seiner Höhle herausgelöst werden. Hierfür wurden abgewogene Mengen des Pulvers versuchsweise mit Wasser oder mit 100%igem Aceton versetzt und für beide Ansätze jeweils eine Verdünnungsreihe hergestellt. Im Anschluss wurden die Proben mittels QQQ-GC/MS analysiert.

Der gemessene Anteil an LI mit Aceton als Lösungsmittel lag bei 5%, also bei einem Drittel der ursprünglich eingesetzten Menge. Bei der wässrigen Lösung lag der gemessene Anteil gerade mal zwischen 0,04% und 0,14%. Die Analyse wurde mit denselben Ansätzen drei Tage später noch einmal wiederholt. Während für den Auszug mit Aceton wieder eine Menge von 5% LI gemessen wurde, lag das Ergebnis für Wasser nun bei 0,75%. Das Aceton hat das LI scheinbar sofort in größerer Menge aus den Cyclodextrinmolekülen herausgelöst, während der Lösungsprozess im Wasser über einen längeren Zeitraum andauerte.

#### **Zusammenfassung AP 4**

Es konnte eine nicht phytotoxische SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix entwickelt werden, welche als Trägersystem für Duftstoffe dient. Die Herstellung der Duftstoff-Einschlusskomplexe mit den Beta-Cyclodextrinen zeigte allerdings einige technische Schwierigkeiten auf. Die ursprünglich im Arbeitspaket 4 geplante GC/MS-Analyse zur Abgaberate der gebundenen Duftstoffe wurde durch eine Alternativuntersuchung ersetzt. Dabei wurde gezeigt, dass nach der Komplexierung lediglich ein Bruchteil des eingesetzten Wirkstoffs tatsächlich im Cyclodextrin gebunden vorlag. Dieser wird bei Kontakt der Cyclodextrine mit Wasser zwar sukzessive freigesetzt, die Wirkung der freigesetzten Menge ist allerdings zu schwach, um für einen längeren Zeitraum olfaktorisch wirksam gegenüber *D. suzukii* zu sein. Daher musste diese Strategie verworfen werden. Um ausreichend hohe Konzentrationen der Repellentstoffe einbinden zu können und die damit gewünschte langanhaltende repellente Wirkung zu erzielen, wurden diese unter Verwendung eines Emulgators direkt in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebracht. Bei Applikation dieser Formulierungen auf die Testpflanzen kam es jedoch innerhalb kurzer Zeit zu phytotoxischen Reaktionen.

Die Einbindung attraktiver Duftstoffe in die Matrizen – mit und ohne Cyclodextrine – führte weitgehend zum Verlust der Anlockwirkung gegenüber *D. suzukii* und wurde nicht weiterverfolgt (siehe AP 5.2).

## Arbeitspaket 5: Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der „push“- und der „pull“-Matrix

### AP 5.1 Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der „push“-Matrix in Bioversuchen

Es wurden verschiedene Varianten an „push“-Komponenten auf ihre biologische Wirksamkeit geprüft:

- Repellentstoffe, eingebunden in eine SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix (s. AP 4.1)
  - Applikation auf ganzer Pflanze
- Repellentstoffe, direkt eingebunden in die SiO<sub>2</sub>-Matrix (s. AP 4.1)
  - Applikation auf ganzer Pflanze
  - Applikation auf verschiedenen Trägermaterialien
  - Einsatz in verschiedenen Varianten von Dispensern

Die vom Projektpartner Nanopool hergestellten Formulierungen wurden im Gewächshaus der RLP AgroScience in selbstgebaute Großkäfigen (223 x 64 x 77cm) in double choice Assays mit adulten *D. suzukii* getestet.



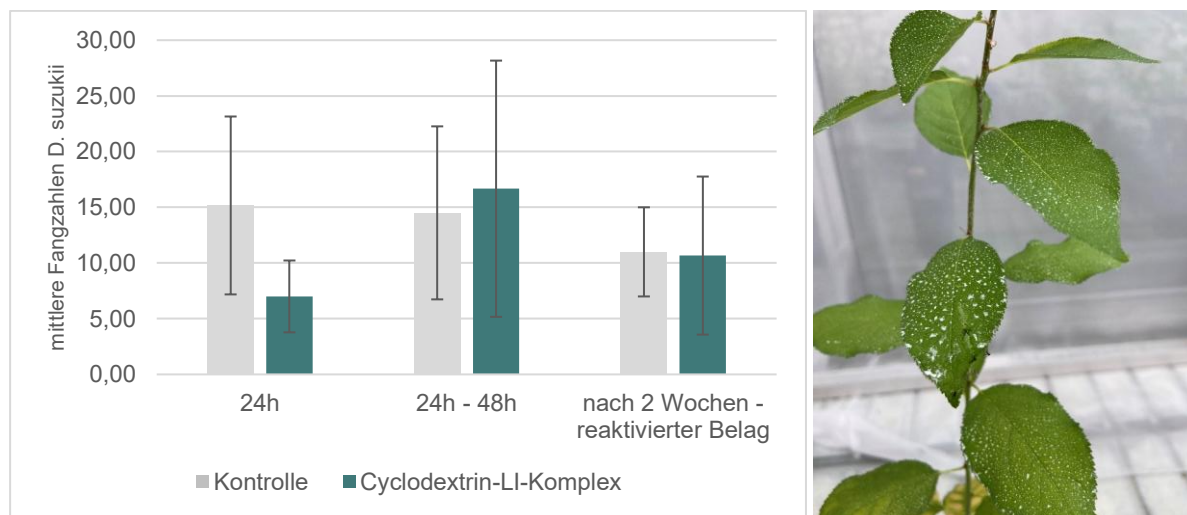
Abbildung 39: Großkäfige im Gewächshaus der RLP AgroScience.

#### Versuche mit Repellentstoffen als Cyclodextrin-Einschlusskomplexe

Mit den stark repellenten Koniferenduftstoffen LI, MY und BA wurden Cyclodextrin-Einschlusskomplexe hergestellt, um sie für den Einsatz auf Pflanzengewebe zu testen. In den Versuchskäfigen (Abb. 39) standen sich jeweils eine behandelte Pflanze und eine Kontrollpflanze gegenüber (Abstand ca. 1,80m). Als Versuchspflanzen dienten im Laufe des Projektes je nach Verfügbarkeit verschiedene Wirtspflanzen der Kirschessigfliege der Gattungen *Malus*, *Prunus*, *Fragaria*, *Vaccinium* oder *Vitis*. Zum Rückfang der Fliegen standen in den Pflanztöpfen kleine Becherfallen mit 50ml Wasser. Pro Käfig wurden 100 *D. suzukii* eingesetzt (gemischtes Geschlechterverhältnis, 1-2 Wochen alt) und nach Ende der 24stündigen Versuchslaufzeit die Fangzahlen in den Becherfallen ausgewertet.

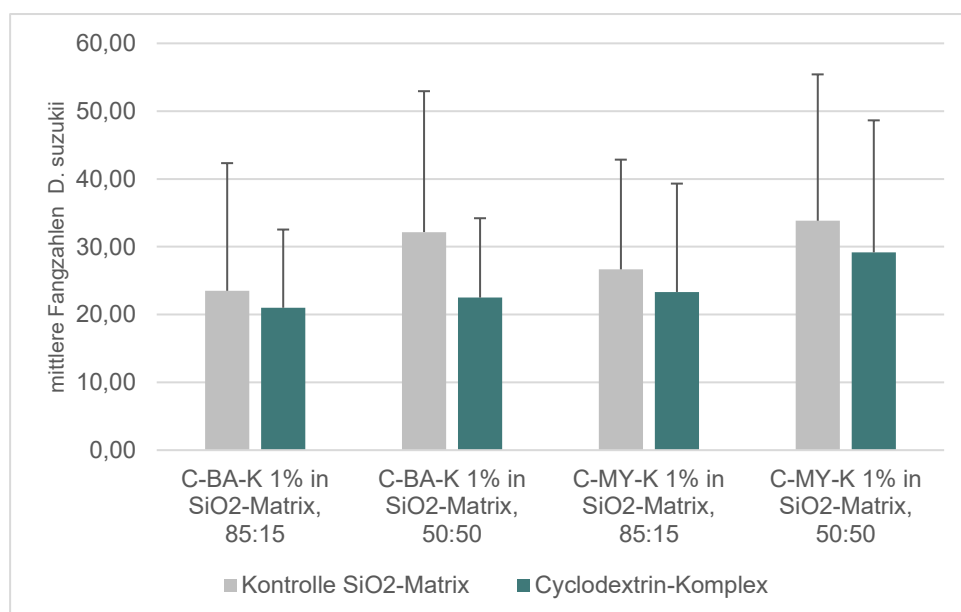
Zunächst wurde ein Cyclodextrin-LI-Komplex (hergestellt mit der Co-Präzipitationsmethode, 2% Pulver gelöst in 50%igem EtOH), mittels Pumpsprüher auf die Testpflanzen appliziert (3-4ml pro Pflanze) und nach einer kurzen Antrocknungszeit das erste Experiment gestartet. Am Folgetag wurde mit denselben behandelten Pflanzen ein sogenannter aged-residue Test (=gealterter Spritzbelag) durchgeführt, um zu überprüfen ob die Wirkung 24 bis 48 Stunden nach der Applikation noch gegeben ist. Zwei Wochen später wurde der immer noch anhaftende weiße Spritzbelag durch Besprühen der Pflanzen mit Wasser reaktiviert und erneut für 24 Stunden auf seine Repellenz getestet. Kommen die Cyclodextrin-Einschlusskomplexe mit Feuchtigkeit in Kontakt, so wird ein Teil des eingebetteten Duftstoffes durch das Wasser herausgelöst und es kommt zu einer

erneuten Geruchsentwicklung. Die Ergebnisse (Abb. 40) zeigen eine eindeutig repellente, aber nicht signifikante, Wirkung auf die Fliegen innerhalb der ersten 24 Stunden. Diese konnte im anschließenden aged-residue Versuch (24 bis 48 Stunden) allerdings nicht aufrechterhalten werden. Auch die Reaktivierung des eingebundenen Duftstoffes nach zwei Wochen war zwar für Menschen olfaktorisch gut wahrnehmbar, hatte aber auf das Verhalten von *D. suzukii* keinen Einfluss mehr.



**Abbildung 40:** Links: mittlere Fangzahlen von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit einem Cyclodextrin-LI-Einschlusskomplex zu verschiedenen Zeiten (n=6, Versuch mit reaktiviertem Belag n=3); rechts: angetrockneter Spritzbelag auf der Pflanze.

Zwei weitere Einschlusskomplexe mit den Substanzen MY und BA wurden in den Verhältnissen 50:50 und 85:15 (Cyclodextrin:Duftstoff) mit der Knetmethode hergestellt. Jeweils 1% der pulverförmigen Einschlusskomplexe wurde in der SiO<sub>2</sub>-Matrix gelöst und mit dem Pumpsprüher auf die Versuchspflanzen (3-4ml pro Pflanze) ausgebracht. Die anschließenden double choice Versuche wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Die Auswertung der Daten (Abb. 41) zeigt, dass die ursprünglich starke repellente Wirkung der Substanzen durch die Einbindung verloren geht. Ob dies von der Komplexierung mit den Cyclodextrinen herrührt, oder durch die Einbringung in die SiO<sub>2</sub>-Matrix ist unklar.

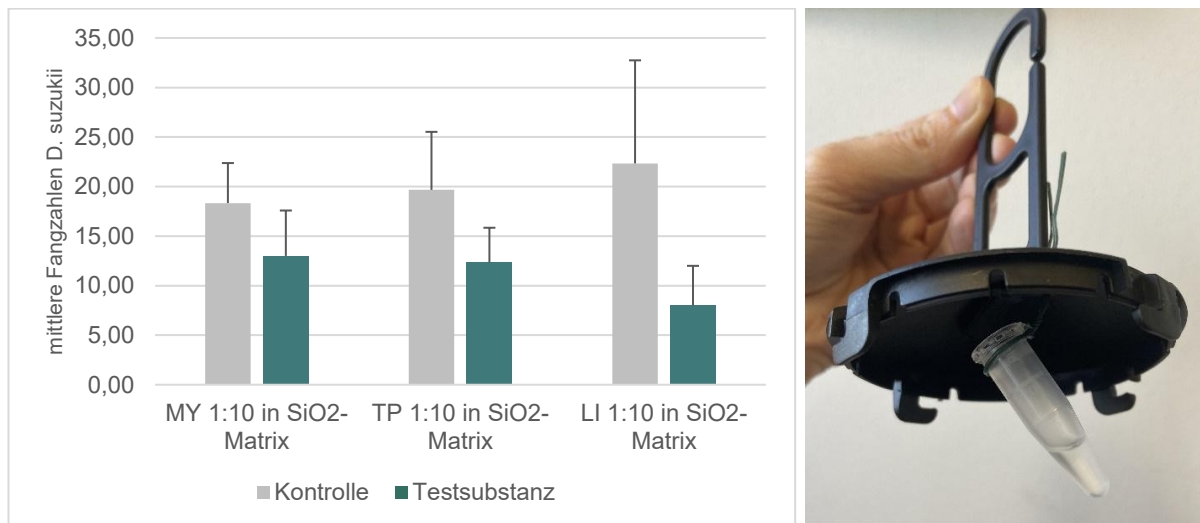


**Abbildung 41:** Mittlere Fangzahlen von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit verschiedenen Cyclodextrin-Einschlusskomplexen (n=6); C-BA-K = Cyclodextrin-BA-Komplex; C-MY-K = Cyclodextrin-MY-Komplex.

### Versuche mit direkt in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebrachten Repellentstoffen

Auf der Suche nach alternativen Formulierungen wurden Mischungen ohne Cyclodextrine getestet. Die hochrepellentesten, hydrophoben Terpene LI, MY und TP wurden durch die Zugabe eines Emulgators in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebracht (1:10 Verdünnung). Da zu diesem Zeitpunkt keine Versuchspflanzen zur Verfügung standen, wurde zunächst ein Vorversuch nur mit Becherfallen durchgeführt, welche an den gegenüberliegenden Seiten der Großkäfige aufgehängt wurden. Jeweils 100µl der Testsubstanzen wurden in einem Eppendorfgefäß unterhalb des Fallendeckels angebracht (Abb. 42 rechts). In den Kontrollfällen befanden sich im Eppendorfgefäß 100µl der SiO<sub>2</sub>-Matrix. Als Fangflüssigkeit im Fallenkörper wurden je 50ml Wasser verwendet. Pro Käfig kamen 100 Fliegen zum Einsatz, die Versuchszeit betrug 24 Stunden.

Bei allen drei Substanzen kam es nach der Einbindung in die SiO<sub>2</sub>-Matrix zu einem starken Verlust ihrer ursprünglichen hochrepellentesten Wirkung. Um zu überprüfen, ob eine großflächige Ausbringung der Formulierungen auf Pflanzen zu einer Verbesserung der Wirkung führt, wurden diese für weitere Versuche auf Pflanzen der Gattung Prunus ausgebracht. Dies erfolgte mit einem Pumpsprüher (3-4ml Testsubstanz pro Pflanze). In weniger als 24 Stunden zeigten alle Testpflanzen starke phytotoxische Symptome (eingerollte, vertrocknete Blätter), weshalb diese Versuche abgebrochen wurden.



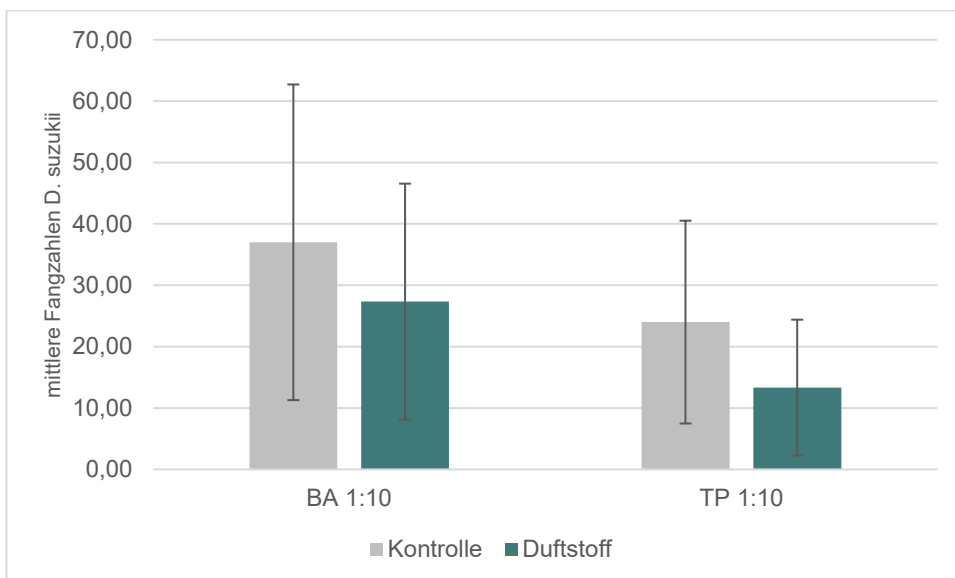
**Abbildung 42:** Links: Mittlere Fangzahlen von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit drei verschiedenen Emulsionen aus Terpenen und SiO<sub>2</sub>-Matrix (n=3); rechts: Duftstoffausbringung in einem Eppendorfgefäß im Inneren der Becherfalle.

Um das Problem der Phytotoxizität durch die Direktapplikation auf die Pflanzen zu umgehen, wurden im Anschluss verschiedene Trägermaterialien und Dispenser zum Ausbringen der Duftstoffe getestet.

Hierfür wurde zunächst Unkrautvlies ausgewählt. Die Oberseiten der Vliesstücke wurden mit verdünnten Repellentstoffen (1:10 in Mineralöl) benetzt und nach dem Antrocknen auf die Pflanzentöpfe unter die Pflanzen gelegt. Die Vliesstücke unter den Kontrollpflanzen waren nur mit Mineralöl behandelt. Die Fallen für den Rückfang der Fliegen standen auf dem Vlies. Die weiteren Versuchsbedingungen waren wie oben beschrieben. Abbildung 44 zeigt die Ergebnisse für die Stoffe BA und TP. Beide Substanzen zeigten auch in diesem Aufbau eine leichte, statistisch aber nicht nachweisbare, Repellenz gegenüber *D. suzukii*.



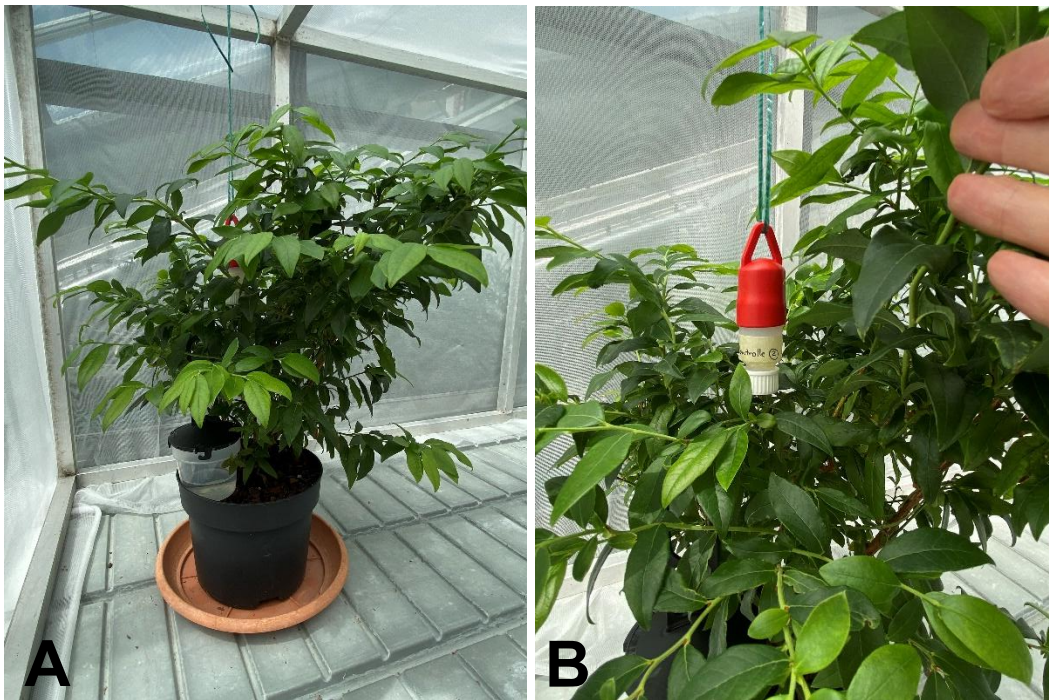
**Abbildung 43:** A) Versuchsaufbau double choice Versuche mit behandeltem Unkrautvlies. B) Nahaufnahme Unkrautvlies.



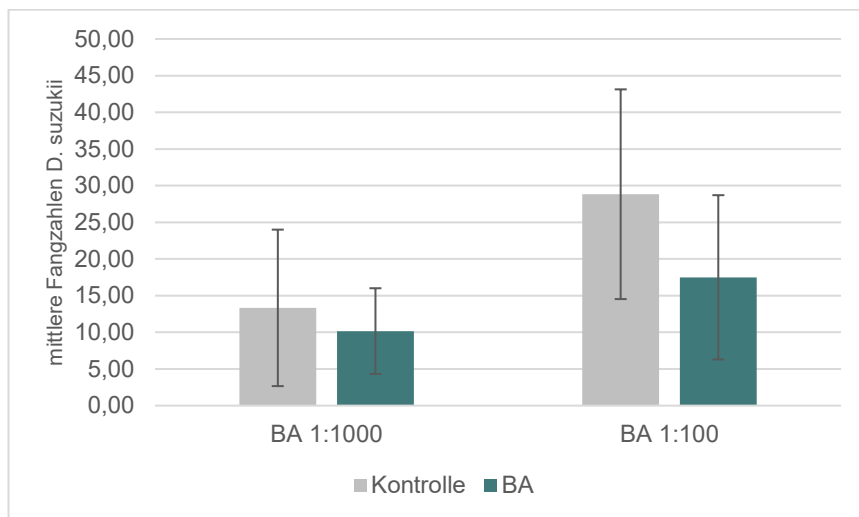
**Abbildung 44:** Mittlere Fangzahlen von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit behandeltem Unkrautvlies (n=3).

In einem anderen Ansatz wurde der Einsatz von Dispensern getestet. Auch sie bieten die Möglichkeit der Ausbringung von Duftstoffen ohne Pflanzenkontakt. Ihr Wirkradius ist allerdings beschränkt.

Für die Versuche wurden Dispenserfläschchen entweder mit Mineralöl (Kontrolle) oder mit verschiedenen Konzentrationen des Duftstoffes BA (1:100 und 1:1000 in Mineralöl) befüllt und in den Versuchskäfigen über den Pflanzen aufgehängt, sodass sie in der Pflanzenkrone hingen (Abb. 45). Die Pflanzen selbst blieben unbehandelt. Während die 1:100 Verdünnung noch einen leichten repellenten Effekt auf *D. suzukii* zeigte, war bei der 1:1000 Verdünnung kein Effekt mehr nachweisbar.



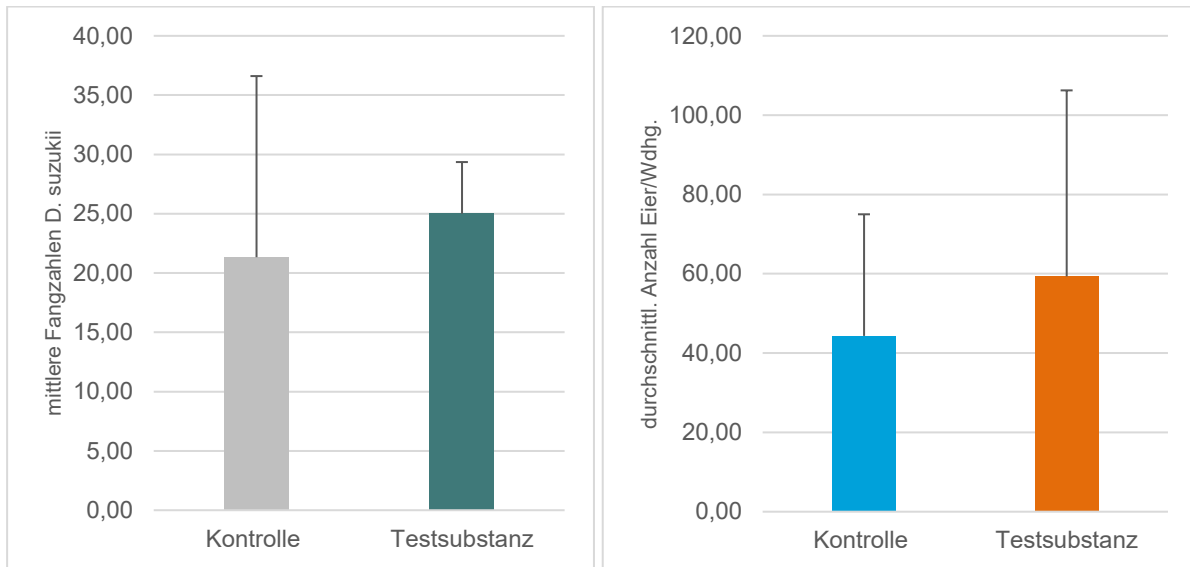
**Abbildung 45:** A) Versuchsaufbau double choice Versuche mit Dispensern. B) Dispenserfläschchen.



**Abbildung 46:** Mittlere Fangzahlen von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit BA in verschiedenen Konzentrationen, ausgebracht in Dispensern (n=6).

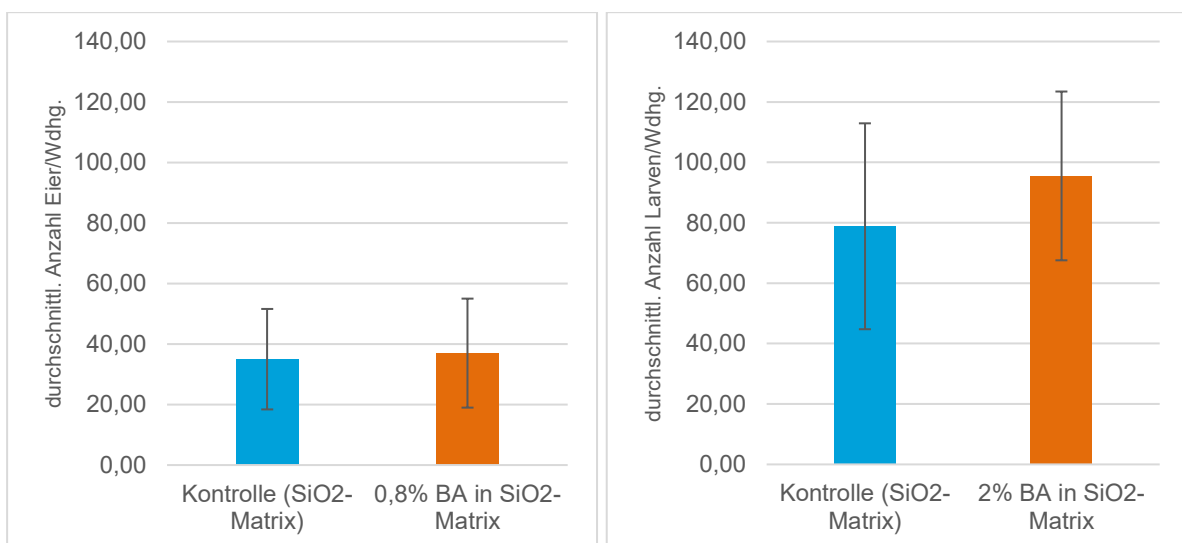
Um zu überprüfen, ob eine Kombination aus Dispensern und behandeltem Unkrautvlies den gewünschten Effekt bringt, wurden im nächsten Versuch Dispenserfläschchen mit BA in einer 1:100 Verdünnung ausgehängt und gleichzeitig Unkrautvlies, welches mit dem Cyclodextrin-BA-Komplex (50:50; 1% in SiO<sub>2</sub>-Matrix) besprüht wurde, unter den Testpflanzen ausgelegt. Neben dem Flugverhalten wurde untersucht, ob die Duftwolke Einfluss auf das Eiablageverhalten von *D. suzukii* hat. Dazu wurden den Fliegen Heidelbeeren als Wirtsfrüchte angeboten. Jeweils drei Früchte auf einer Petrischale wurden auf die Blumenerde in die Pflanztöpfe gestellt.

Abbildung 47 zeigt die Fallenfänge (links) und die Ergebnisse der Eiablagen (rechts). Wie die Auswertungen zeigten, brachte auch eine Kombination aus Dispensern und behandeltem Vlies nicht den gewünschten repellenten Effekt. Die Eiablage rate in den Testfrüchten war im Vergleich zu den Kontrollfrüchten sogar noch gesteigert.



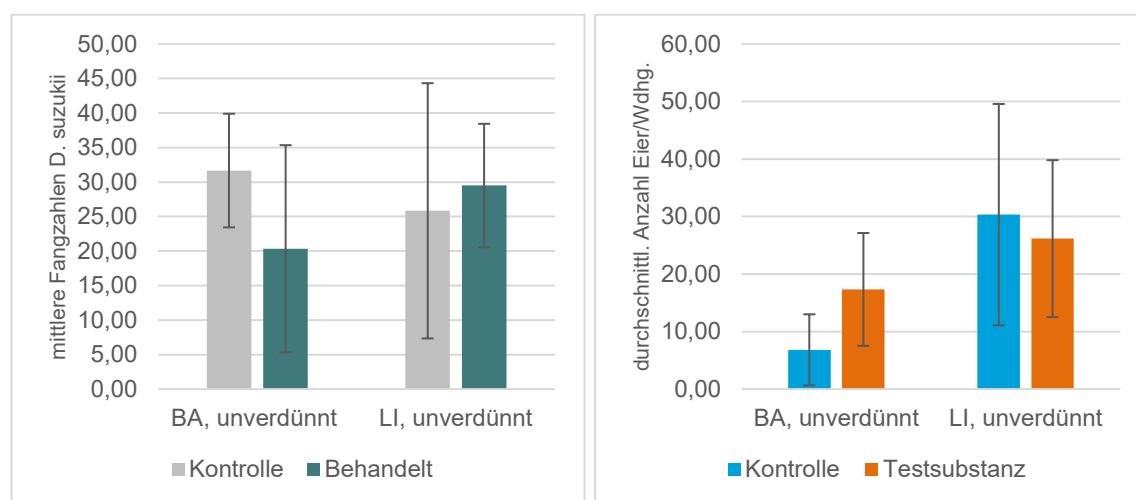
**Abbildung 47:** Ergebnisse der double choice Versuche mit Dispensern und behandeltem Vlies (n=3), eingesetzter Repellentstoff: BA; links: mittlere Fangzahlen von *D. suzukii*; rechts: durchschnittliche Eiablagen/Wdgh.

Um die Auswirkungen der Substanz BA auf das Eiablageverhalten von *D. suzukii* weiter zu untersuchen, wurden Formulierungen mit 0,8% bzw. 2% BA, eingebunden in die SiO<sub>2</sub>-Matrix, zur Applikation auf die gesamte Pflanze ausgewählt. Höhere Konzentrationen BA in der Formulierung führten bei den Pflanzen zu phytotoxischen Schäden und fanden in den Versuchen daher keine Anwendung. Zur Eiablage wurden den Tieren im ersten Versuch (0,8% BA) Heidelbeeren, im zweiten Versuch (2% BA) Himbeeren angeboten. Dies hatte mit der Verfügbarkeit der Früchte zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten zu tun. Die Auswertungen unterscheiden sich dahingehend, dass Heidelbeeren am besten auf Eiablagen untersucht werden, Himbeeren dagegen auf den Madenbefall. In diesen Versuchen wurden statt der üblichen 100 Fliegen 25 Männchen und 25 Weibchen pro Käfig eingesetzt. Auf die Becherfallen zum Rückfang der Fliegen wurde in diesem Ansatz verzichtet. Die Anwesenheit von 0,8% BA in der Formulierung hatte auf das Eiablageverhalten von *D. suzukii* keinen Einfluss, während es bei der Anwesenheit von 2% BA zu einer leichten Steigerung des Madenbefalls in den Testhimbeeren im Vergleich zu den Kontrollfrüchten kam (Abb. 48).



**Abbildung 48:** Mittlere Anzahl Eiablagen in double choice Versuchen mit behandelten Pflanzen (n=6); Repellentstoff: BA in den Konzentrationen 0,8% und 2%; links: mittlere Anzahl Eiablagen/Wdgh. in Heidelbeeren, rechts: mittlere Anzahl Maden/Wdgh. in Himbeeren.

Als letztes Trägermaterial wurde ein pflanzliches Granulat getestet, welches sehr saugfähig ist und zur großflächigen Verteilung der Duftstoffe unter den Pflanzen ausgebracht wurde. Für den Versuchsaufbau wurden auf 10g Granulat 200µl der unverdünnten Testsubstanz aufpipettiert und in einer Petrischale auf die Blumenerde unter die Testpflanzen gestellt. Unter den Kontrollpflanzen wurde kein Granulat ausgebracht. In zwei verschiedenen Experimenten wurde zum einen das Flugverhalten, zum anderen das Eiablageverhalten von *D. suzukii* bei Anwesenheit verschiedener Testsubstanzen untersucht. Für die Rückfangversuche wurden Becherfallen, welche über den Pflanzen hingen, verwendet und je 100 Fliegen pro Käfig eingesetzt, für die Eiablageversuche wurden den Tieren je drei Heidelbeeren als Wirtsfrüchte unter die Pflanzen gestellt und 25 männliche sowie 25 weibliche *D. suzukii* eingesetzt. Abb. 49 zeigt links die Fangzahlen und rechts die Eiablageraten für die Repellentien BA und LI.



**Abbildung 49:** Links: mittlere Fangzahlen von *D. suzukii* in double choice Versuchen mit behandeltem pflanzlichen Trägermaterial (200µl BA oder LI); n=6; rechts: mittlere Anzahl Eiablagen/Wdhg. in double choice Versuchen mit behandeltem pflanzlichen Trägermaterial (200µl BA oder LI); n=6.

Für die Substanz BA zeigten sich ganz unterschiedliche Ergebnisse das Flug- und Eiablageverhalten von *D. suzukii* betreffend. Während die Anwesenheit des Duftstoffes die Fangzahlen in den Testfallen im Vergleich zu den Kontrollfallen verringerte, war bei Anwesenheit von Wirtsfrüchten die Eiablagerate in den Testfrüchten im Vergleich zu den Kontrollfrüchten gesteigert. Bei der Substanz LI kam es zu keinen nennenswerten Unterschieden zwischen den Fangzahlen und Eiablageraten im Vergleich von Kontroll- und Testseite.

### Zusammenfassung AP 5.1

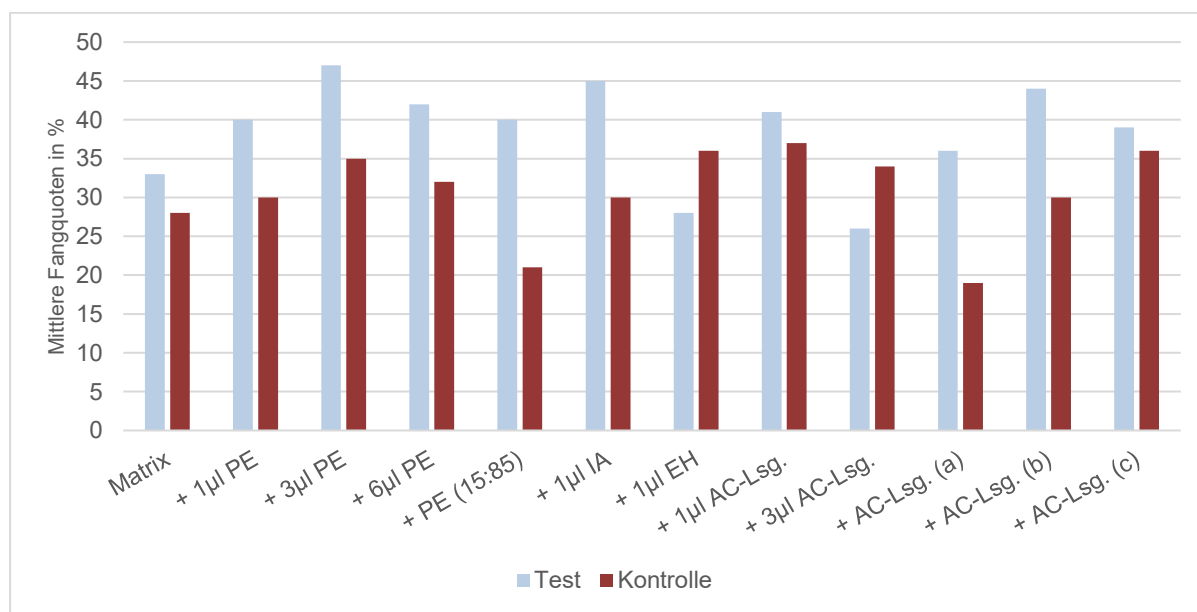
Die zu Projektbeginn angestrebte Einbindung der Duftstoffe in Beta-Cyclodextrine brachte einige Schwierigkeiten mit sich. Die tatsächliche Menge Duftstoff, welche nach der Komplexierung im Einschlusskomplex vorlag, war zu schwach, um für einen längeren Zeitraum olfaktorisch wirksam gegenüber *D. suzukii* zu sein. Zudem ließ sich nur eine kleine Menge des pulverförmigen Cyclodextrin-Duftstoff-Komplexes in Lösung bringen (max. 1-2%), wodurch die Geruchsintensität der eingebundenen Substanzen weiter abnahm. Um eine ausreichend abstoßende Wirkung auf die Fliegen zu erreichen, mussten die untersuchten Repellentien in hohen Konzentrationen eingesetzt werden. Dies löste nach der direkten Einbindung der Substanzen in die SiO<sub>2</sub>-Matrix bei den Testpflanzen starke phytotoxische Reaktionen aus. Da eine Direktapplikation auf das Pflanzengewebe somit nicht in Frage kam, wurden verschiedene Trägermaterialien und Dispenser zur Ausbringung der Substanzen getestet. Da der Wirkradius dieser

Materialien im Vergleich zu der großflächigen Besprühung der Pflanzen räumlich begrenzt ist, blieb der gewünschte Effekt auf die Fliegen aus.

Im Fokus der Versuche stand die Substanz BA, da diese in den ätherischen Ölen vieler Nadelbäumen wie Tannen, Lärchen, Douglasien, Fichten und Kiefern enthalten ist und bereits eine Zulassung in der Lebensmittelindustrie als Aromastoff besitzt. Unter Laborbedingungen wirkte die Substanz signifikant repellent gegenüber adulten *D. suzukii*. In Gewächshausversuchen konnte diese Wirkung nicht bestätigt werden. Außerdem kam es in einigen Fällen zu einer Steigerung der Eiablagen bei Anwesenheit von BA, abhängig von der eingesetzten Konzentration und Menge.

## AP 5.2 Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der „pull“-Matrix in Bioversuchen

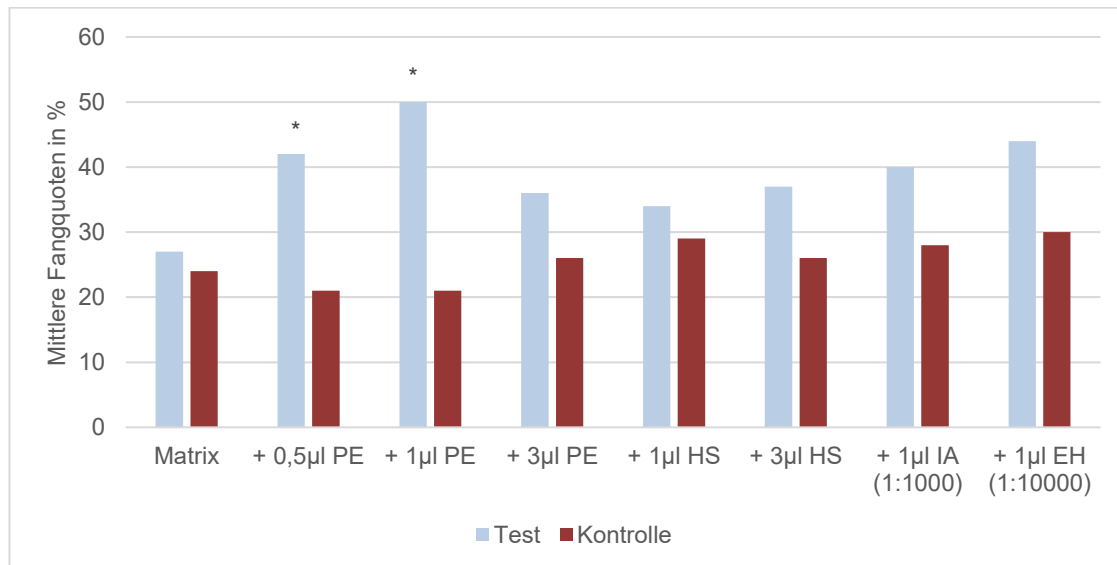
Zur Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der Pull-Matrix wurden die vom Projektpartner Nanopool hergestellten Formulierungen im Labor von Insect Services in double choice Assays mit adulten *D. suzukii* getestet (Methode siehe AP 1.5). Die beiden attraktiv wirkenden Substanzen PE und AC wie auch die von sehr vielen Wirtsfrüchten abgegebenen Duftstoffe IA und EH wurden als Cyclodextrin-Einschlusskomplexe hergestellt und vor Versuchsbeginn in der flüssigen SiO<sub>2</sub>-Matrix gelöst. Auch diese Versuche wurden in den kleinen Gazezelten in 6-facher Versuchswiederholung durchgeführt, dabei wurde immer 1µl des SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Duftstoffkomplexes auf die Filterpapiere unter der Aluminiumfolie pipettiert.



**Abbildung 51:** Durchschnittliche prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in den Testschalen (Duftstoffe in eine SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix eingebettet) und in den Kontrollschalen. Matrix=SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix. (a) = SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Duftstoffkomplex mit AC (10%) im Verhältnis 85:15 (3-fache Versuchswiederholung), (b) = 0,015g Cyclodextrin-Duftstoffkomplex im Verhältnis 50:50 (in 1,5ml SiO<sub>2</sub>-Matrix), (C) = 0,04g Cyclodextrin-Duftstoffkomplex im Verhältnis 85:15 (in 4ml SiO<sub>2</sub>-Matrix).

Bei diesen Versuchen lagen alle durchschnittlichen Fangquoten unter 50%, die höchsten Fangraten wurden mit 3µl eingebettetem PE (47%), 1µl eingebettetem IA (45%) und einer AC-Variante (44%) erzielt. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die statistisch nachweisbare attraktive Wirkung der Reinsubstanzen PE und der AC-Lösung ging somit durch die Einbettung in die SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix verloren.

Im weiteren Schritt wurde auf eine Komplexierung mit Cyclodextrinen verzichtet und ausgewählte Attraktantien direkt in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebaut, entweder als Reinsubstanz oder Verdünnung, von PE und HS wurden zusätzlich unterschiedliche Mengen eingebaut. Da es sich bei AC um eine stark wasserlösliche Substanz handelt, konnte diese nicht in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebaut werden. In den einzelnen Versuchen wurde jeweils 1µl des Matrix-Duftstoffkomplexes getestet. Auch diese Versuche wurden in 6-facher Wiederholung durchgeführt.



**Abbildung 52:** Durchschnittliche prozentuale Fangraten von *D. suzukii* in den Testschalen (Duftstoffe in eine SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebettet) und in den Kontrollschalen. Matrix=SiO<sub>2</sub>-Matrix. Signifikanzlevel: \*p<0,05.

Die in diesen Versuchen erzielten Fangquoten der Kirschessigfliegen liegen mit 34% bis maximal 50% auf einem niedrigen Niveau. Nur im Versuch mit 0,5µl bzw. 1µl PE konnte noch ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass sich die mittlere Fangquote bei 3µl eingebundenem PE (36%) im Vergleich zum Wert der Reinsubstanz ohne Matrix (69%) fast um die Hälfte verringert hat. Die Versuchsergebnisse für HS zeigen, dass diese Substanz nicht oder nur schlecht von der SiO<sub>2</sub>-Matrix abgegeben wird, beide Werte liegen unter denjenigen der Reinsubstanz. Im Vergleich dazu liegen die Fangquoten der beiden unterschiedlich stark verdünnten Substanzen IA und EH mit 40% und 44% auf einem ähnlichen Niveau wie diejenigen der Reinsubstanz.

### Zusammenfassung AP 5.2

Der Einbau der attraktiv wirkenden Duftstoffe in verschiedene vom Kooperationspartner Nanopool produzierte Matrizen führte in allen Fällen zu einer deutlichen Reduktion bzw. zum Verlust der attraktiven Wirkung. Aus diesem Grund wurde beschlossen, diesen Ansatz nicht weiter zu verfolgen. Die pull-Komponente wurde in anschließenden Versuchen durch die Massenfangfalle ersetzt.

## Arbeitspaket 6: Validierung der Push&Pull-Strategie

### AP 6.1 Saranhausversuche und/oder Großkäfigversuche mit Beerenobst

Zur Validierung der Push&Pull-Strategie wurden unter Labor- und Semifreilandbedingungen verschiedene anwendungsorientierte Push&Pull-Szenarien in Großkäfigen nachgestellt.

#### Simulated-use Versuche im Labor

Die Laborversuche wurden unter Langtagbedingungen und Raumtemperatur in großen Gazezelten durchgeführt (75 x 75 x 115cm), die Versuchsdauer lag bei 24 Stunden. In jedem Versuch wurden 20 weibliche und 20 männliche Individuen der Kirschessigfliege im Alter von 1-13 Tagen eingesetzt. Die Versuche wurden in jeweils vierfacher Wiederholung durchgeführt. Zunächst wurde nur die Lockstofffalle (pull-Komponente) auf ihre Fängigkeit getestet. In der folgenden Versuchsreihe wurden dann zwei Pflanzen mit Wirtsfrüchten im Zelt platziert und in allen folgenden Versuchen kam zusätzlich die push-Komponente (Wirkstoff BA) in verschiedenen Varianten zum Einsatz.

Als **pull-Komponente** wurde mittig im Zelt der Prototyp der IS-Falle aufgehängt, diese enthielt in allen Versuchen eine Fangflüssigkeit bestehend aus Merlot, Apfelessig und Wasser (Mischungsverhältnis: 4:3:1). Zusätzlich wurden in der Falle die in den AP 2 und 3 als attraktivste Duftstoffkombination ermittelten Lockstoffe eingebracht: 2,5µl IA in der Fangflüssigkeit, AC-Lösung (33mg/ml H<sub>2</sub>O) in Dispenser 1 und PE (1:500 verdünnt in Mineralöl) in Dispenser 2 (vgl. Abb. 22 + 23).

Als **push-Komponente** kam in den Versuchen immer die Substanz BA zum Einsatz. Die Wirkung von BA wurde in diesen Versuchen mittels verschiedener Dispenser bzw. Trägermaterialien getestet. Verwendet wurde ein Dispenserfläschchen in dessen Deckel sich eine permeable Membranscheibe befand. Das Fläschchen wurde in den Versuchen kopfüber an einer Stativstange befestigt und mittig im Blattwerk der Pflanze platziert. Über den Versuchszeitraum von 24 Stunden wurde dabei eine durchschnittliche Menge von 14,2mg abgegeben. Zur Ermittlung dieser Angaben wurde der Fläschchendispenser vor und nach den Versuchen gewogen.

Da diese Laborversuche im Winter durchgeführt wurden, standen keine belaubten Wirtspflanzen von *D. suzukii* zur Verfügung. Als Ersatz wurden immergrüne ca. 20-30cm hohe Topfpflanzen (Birkenfeigen, Kaffeepflanzen) verwendet. In jedem Versuch wurden zwei Pflanzen in die jeweils gegenüberliegenden Ecken des Zeltes auf den Zeltboden gestellt (Abstand: 80cm; Abb. 53). In den vier Wiederholungsversuchen wurden die Positionen der Pflanzen (Test- und Kontrollpflanzen) jeweils gewechselt. Zur Eiablage wurden den Kirschessigfliegen verschiedene Wirtsfrüchte (Himbeeren oder Brombeeren) angeboten. In jedem Pflanztopf wurden drei Wirtsfrüchte auf Plastikdeckeln platziert (Abb. 53): Einmal als Kontrollfrüchte der Pflanze ohne Repellent und einmal als Testfrüchte der Pflanze mit Repellent. Am Ende des Versuchs wurden die im Zelt verbliebenen (lebenden und toten) Individuen und die mit der Falle gefangenen Tiere gezählt und das Geschlecht bestimmt. Die Beeren wurden für 3 Tage bei 23-25°C inkubiert, so dass die Larven aus den Eiern schlüpfen konnten. Unter einem Binokular wurden die Früchte dann zerquetscht und die Larven der Kirschessigfliege in jeder Frucht gezählt.



**Abbildung 53:** Links: simulated-use Versuch im großem Gazezelt, Wassertränke, Lockstofffalle und zwei Pflanzen mit je drei Himbeeren; rechts: Pflanze mit den Wirtsfrüchten vergrößert dargestellt.

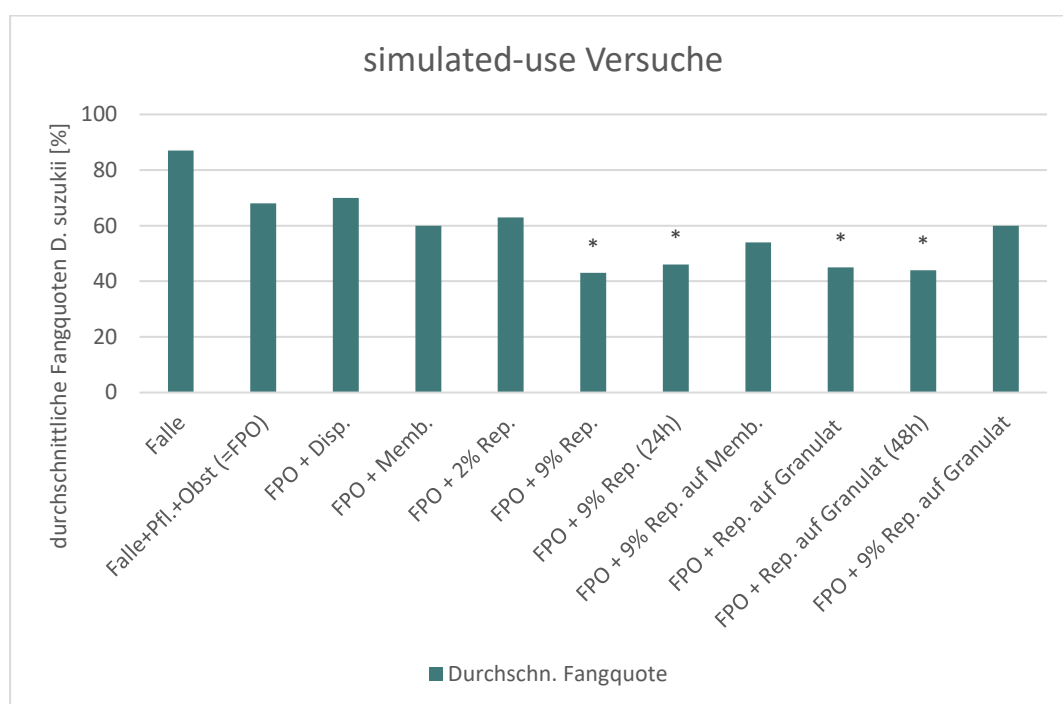
In einem zweiten Versuchsschritt wurde ein größeres Stück permeable Dispenser-Membran (Durchmesser: 9cm) mit wasserundurchlässiger Unterseite direkt unter die Pflanze auf die Blumenerde gelegt. Zum Versuchsbeginn wurden 600 $\mu$ l BA auf diese Membranscheibe appliziert (600 $\mu$ l BA wiegen 568mg, im Vergleich zur abgegebenen Repellentmenge aus dem Fläschchen wurde in diesem Versuch somit die 40-fache Menge getestet).

In einem dritten Versuchsschritt wurde eine direkt auf die Testpflanze gesprühte push-Matrix getestet. Hierzu wurde BA vom Kooperationspartner Nanopool in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (2% und 9%) mittels Emulgator in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebracht (AP 4.2). Zu Versuchsbeginn wurden von diesen Substanzgemischen durchschnittlich ca. 6g (entspricht 5,5ml) direkt auf die Pflanzen gesprüht, anschließend konnte der Matrix-Film auf den Pflanzenblättern ca. 30-60min trocknen. Die mit 9% BA eingesprühten Pflanzen wurden nach 24 Stunden nochmals getestet, um zu überprüfen, ob eine mögliche repellente Wirkung über diesen Zeitraum anhält.

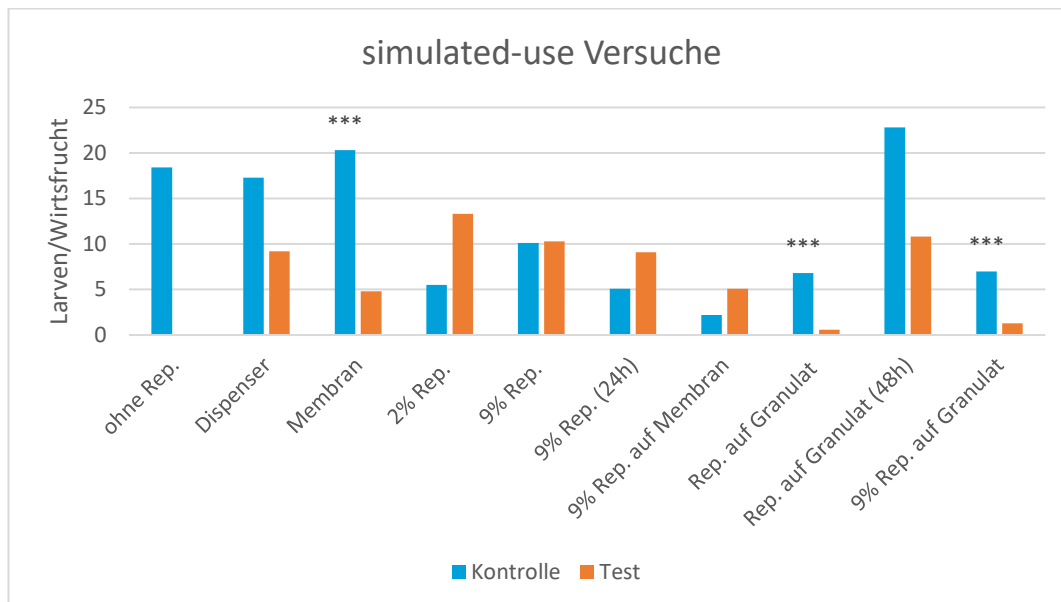
Als Viertes wurde ein neues pflanzliches Trägermaterial (Maiskolbengranulat) getestet. Dabei wurde je 1g des Materials in eine kleine Glas-Petrischale gegeben und auf das Granulat 300 $\mu$ l BA pipettiert. Zwei dieser Petrischalen wurden unter der Testpflanze platziert. Mit diesem pflanzenbasierten Material wurde zusätzlich eine aged residue Versuchsreihe durchgeführt. Dafür wurden 48 Stunden vor Versuchsbeginn insgesamt 600 $\mu$ l BA auf das Trägermaterial aufgebracht, anschließend wurden die kleinen Petrischalen mit diesem „behandelten“ Material bei Raumtemperatur aufbewahrt. Mit diesem Versuchen sollte geklärt werden, wie lange ein abschreckender Effekt nachweisbar ist.

Zu guter Letzt wurden 600 $\mu$ l von der BA-Matrix (9%) auf 2g Granulat, verteilt auf zwei Petrischalen mit je 1g, aufgebracht. Dieser Versuch sollte klären, ob es durch den Einbau der Substanz in die SiO<sub>2</sub>-Matrix und die anschließende Applikation auf das pflanzliche Trägermaterial zu einer verzögerten Abgabe und damit evt. zu einer verstärkten repellenten Wirkung kommt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abbildungen 54 + 55 zusammen dargestellt. Angegeben sind in Abb. 54 die Fangquoten der Lockstofffalle für die einzelnen Testvarianten. Wie erwartet, wurde die höchste Fangquote der Kirschessigfliegen bei alleiniger Verwendung der Falle (pull-Komponente) erzielt (87%). Sobald Pflanzen und Wirtsfrüchte im Versuch eingesetzt wurden, verringerte sich die durchschnittliche Fangrate auf 68%. Kam die push-Komponente hinzu, sanken die Fangquoten auf maximal 43%. In der Abbildung sind diejenigen Fangquoten mit einem Stern versehen, bei denen sich nach Auswertung mit dem t-Test für unabhängige Stichproben ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zur Fangquote beim Versuch mit Pflanzen und Wirtsfrüchten (ohne Repellent) zeigte. Diese statistisch nachweisbaren niedrigeren Fangraten könnten durch größere Mengen Repellent bedingt sein. Je mehr Repellent von den Trägermaterialien abgegeben wird, desto wahrscheinlicher ist eine olfaktorische „Verwirrung“ der Kirschessigfliegen, so dass die Tiere nicht mehr gezielt in die Falle gelockt werden. Auf Freilandbedingungen übertragen bedeutet dies, dass die pull- und die push-Komponenten zur vollen Entwicklung der Wirkung einen Mindestabstand zueinander aufweisen müssen. Die Mortalitätsraten lagen in diesen Versuchsreihen zwischen 6% und 21%.



**Abbildung 54:** Durchschnittliche Fangquoten von *D. suzukii* in den verschiedenen simulated-use Versuchen. FPO=Falle + Pflanzen + Obst, Rep.=Repellent (BA), Memb.=permeable Membran; \*signifikanter Unterschied zum Kontrollversuch mit Falle und Wirtsfrüchten, t-Test für unabhängige Stichproben,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 55:** Durchschnittliche Anzahl Larven pro Kontroll- und Testfrucht in den verschiedenen simulated-use Versuchen. Rep=Repellent (BA), \*\*\*hoch signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Testfrüchten, Wilcoxon Rank-Sum Test,  $p < 0,001$ .

Die Daten zur Eiablage in den Wirtsfrüchten wurden mit dem Wilcoxon Rank-Sum Test statistisch ausgewertet (Abb. 55). Es ergab sich folgendes Bild: In dem Versuch ohne Repellent lag die mittlere Zahl der Larven pro Frucht bei 18,4. Bei Abgabe des Repellents aus dem Fläschchendispenser wurden in den Testfrüchten im Vergleich zu den Kontrollfrüchten 47% weniger Larven gefunden, ein signifikanter Unterschied konnte nicht nachgewiesen werden. Bei Applikation von 600µl BA auf der größeren Membranscheibe wurde beim Vergleich von Test- und Kontrollfrüchten eine Reduktion der Eiablage um 76% erzielt, dieser Unterschied ist hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Die Ergebnisse der Versuche mit dem in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebauten BA zeigen, dass die eingebaute Menge von 2% bzw. 9%, auch bei einer großen Menge applizierter Flüssigkeit auf die Blätter, zu gering ist, um die Eiablage zu verhindern bzw. zu reduzieren. Die direkte Applikation der Matrix auf die Pflanzen führte außerdem zu phytotoxischen Langzeitschäden an den verwendeten Pflanzen. Die SiO<sub>2</sub>-Lösung mit 2% BA induzierte, ebenso wie die Matrix mit 9% BA im Folgeversuch mit gealtertem Duftstoff, sogar einen anlockenden Effekt (hier wurden in den Testfrüchten durchschnittlich doppelt so viele bzw. mehr als doppelt so viele Eier abgelegt). Auch die Ausbringung von 9% BA in der Matrix auf eine Membranscheibe führte zu einer leicht gesteigerten Eiablage in den Testfrüchten. Bei Aufbringung von 600µl Reinsubstanz BA auf das Maiskolbengranulat konnte aber eine deutliche Reduktion der Eiablage um mehr als 90% beobachtet werden, im Vergleich zu den Kontrollfrüchten ein hoch signifikanter Unterschied. Auch nach 48 Stunden zeigte das mit BA behandelte Trägermaterial noch eine Wirkung, die Eiablage in den Testfrüchten war nach diesem Zeitraum noch um 53% reduziert, die Werte zeigten in der statistischen Auswertung eine Tendenz zur Repellenz. Bei Applikation von 600µl BA-Matrix (9%) auf das Maiskolbengranulat zeigten sich ebenfalls hoch signifikante Unterschiede zwischen dem Larvenvorkommen in Kontroll- und Testfrüchten (Reduktion um 81%).

### Zusammenfassung simulated-use Versuche

Die Ergebnisse dieser im Labor durchgeführten anwendungsorientierten Verhaltensversuche zeigen zum einen, dass sich die Fangquoten der Lockstofffalle deutlich reduzieren, sobald Duftstoffe von Pflanzen und Wirtsfrüchten hinzukommen. Zum anderen belegen die Versuchsergebnisse, dass die Wirkung der repellenten Substanz von der eingesetzten Menge bzw. Konzentration und dem verwendeten Trägermaterial abhängig ist. Bei zu niedriger Konzentration kann die abschreckende Wirkung sogar in eine anlockende Wirkung

übergehen. Auf Freilandbedingungen übertragen bedeutet dies, dass ständig eine hohe Konzentration des Repellents in der Obstanlage gewährleistet sein muss, damit der repellente Effekt weiter wirksam ist. Vor allem unter sich ständig ändernden Wetterbedingungen (hohe Sonneneinstrahlung, Regen oder starker Wind) und in Anwesenheit der Wirtsfrüchte ist es momentan nicht vorstellbar, dass dies technisch erreicht werden kann. Nur beim Obstanbau in Folientunnel-Anlagen könnte mit hohen Repellent-Konzentrationen der Befallsdruck der Schädlinge minimiert und damit die Anzahl der abgelegten Eier reduziert werden.

### Semifreilandversuche

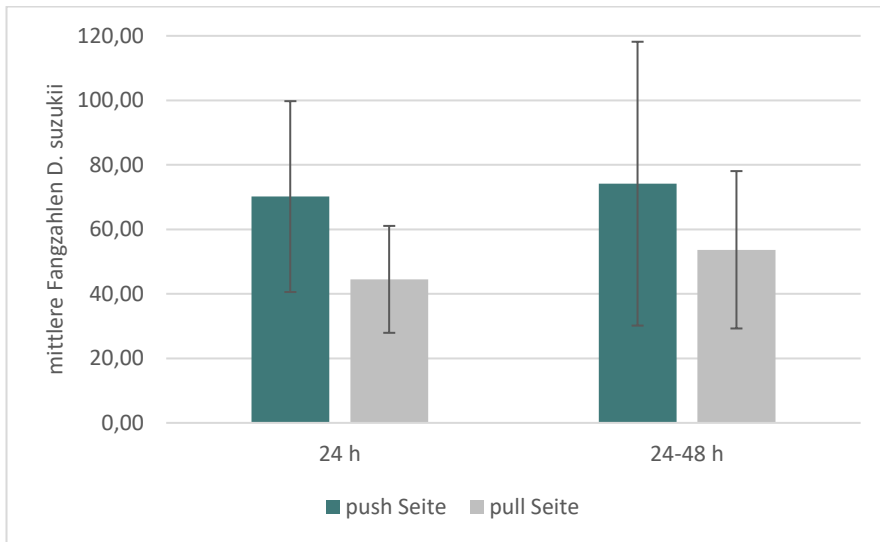
Parallel zu den Laborversuchen wurden verschiedene Push&Pull-Szenarien unter Semifreilandkonditionen überprüft. Die Versuche fanden in Großkäfigen (295 x 65 x 79cm) statt, welche auf dem Außengelände des DLR Rheinpfalz an einem windgeschützten Ort installiert wurden (Abb. 56). Der Käfigboden war offen, sodass die natürliche Vegetation den Fliegen zusätzlichen Schutz vor Regen und Hitze bot. Auf jeder Käfigseite stand eine Topfpflanze (Gattung Malus; Abstand der Pflanzen ca. 2,20m).



**Abbildung 56:** Großkäfige für Semifreilandversuche.

Zunächst wurde das Migrationsverhalten von *D. suzukii* bei gleichzeitiger Anwesenheit einer push- und einer pull-Komponente im Käfig untersucht. Als push-Komponente diente die Substanz BA. Davon wurden 400µl Reinsubstanz auf insgesamt 20g Maiskolbengranulat aufgebracht und in Petrischalen auf die Blumenerde in einer Käfigseite gestellt. Der Pflanztopf auf der gegenüberliegenden Seite enthielt kein Maiskolbengranulat. Der Rückfang der Fliegen erfolgte über Lockstofffallen, welche über den Topfpflanzen aufgehängt wurden. Die eingesetzten IS-Fallen (82 Löcher; Ø 2,6mm) enthielten auf der push-Seite als Fangflüssigkeit eine Mischung aus Merlot, Apfelessig und Wasser (Mischungsverhältnis: 4:3:1); während auf der gegenüberliegenden pull-Seite zusätzlich zu der Lockflüssigkeit eine Kombination aus drei verschiedenen Attraktantien eingebracht wurde. Unter dem Fallendeckel waren zwei Dispenserfläschchen befestigt, gefüllt mit (1) AC-Lösung (33mg/ml H<sub>2</sub>O) und (2) PE (1:500 in Mineralöl), in die Fangflüssigkeit wurden zudem 2,5µl IA pipettiert. Diese Dreierkombination aus Attraktantien stellte die pull-Komponente dar. Die Fallen auf der push-Seite dienten zum Nachweis jener Fliegen, welche trotz räumlicher Nähe des Repellents diese Seite wählten. Pro Käfig wurden 200 *D. suzukii* eingesetzt (1-2 Wochen alt, gemischtes Geschlechterverhältnis); die Versuchslaufzeit betrug 24 Stunden. Die Versuche fanden in 6-facher Versuchswiederholung statt.

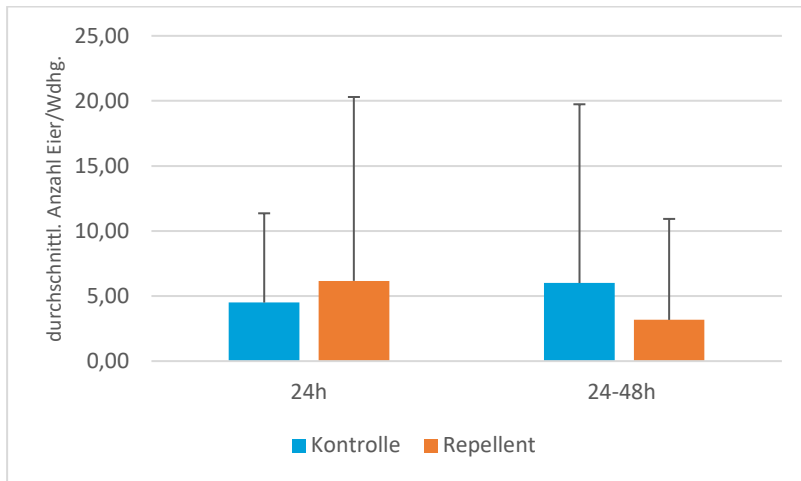
Im Anschluss an diese Versuche wurde ein aged residue Test durchgeführt, d.h. das auf das Maiskolbengranulat applizierte BA war bereits 24 Stunden gealtert als der Versuch startete. Ansonsten war der Versuchsaufbau identisch. Auch diese Testreihe lief in 6-facher Versuchswiederholung. Abbildung 57 zeigt die Ergebnisse beider Versuchsreihen.



**Abbildung 57:** Mittlere Fangzahlen *D. suzukii* in double choice Versuchen mit push- und pull-Komponente nach 24h und nach 48h; push-Komponente: 400µl BA auf Maiskolbengranulat, pull-Komponente: Attraktantien (AC, PE und IA) in Lockstofffalle, n=6.

Entgegen den Erwartungen entschieden sich in jeder Versuchsreihe durchschnittlich mehr Fliegen für die Seite mit der push-Komponente: in den ersten 24 Stunden nach Applikation des Repellents wurden 35% der eingesetzten *D. suzukii* auf der push-Seite geködert, 22,3% auf der pull-Seite. Im Anschlussversuch mit gealtertem Repellent waren es auf der push-Seite 37%, auf der pull-Seite 26,8%.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, welche Auswirkungen die Anwesenheit des Repellents auf das Eiablageverhalten der Kirschessigfliegen hat. Dafür wurden den Fliegen Heidelbeeren als Wirtsfrüchte angeboten. Auf jeder Käfigseite lagen fünf Früchte in einer Petrischale im Pflanztopf. Auf der push-Seite standen zusätzlich Petrischalen mit insgesamt 400µl BA auf 20g pflanzlichem Maiskolbengranulat daneben. Für eine Versuchslaufzeit von 24 Stunden wurden 25 Weibchen pro Käfig eingesetzt und im Anschluss die Eiablage in den Früchten gezählt. Auch für diese Versuchsreihe wurde ein aged residue Test mit identischem Versuchsaufbau angeschlossen. Die Lockstofffallen kamen in diesem Versuchsaufbau nicht zum Einsatz. Abbildung 58 zeigt die Ergebnisse der Eiablageraten. Diese lagen in den ersten 24 Stunden nach Applikation des Repellents auf beiden Seiten auf einem ähnlichen Niveau (Kontrolle Ø 4,5 Eier/Wdhg., Repellent Ø 6,2 Eier/Wdhg.). Im Folgeversuch, bei Anwesenheit der gealterten Substanz BA, gab es einen leichten, aber nicht signifikanten, Rückgang der Eiablageraten in den Testfrüchten (Ø 3,2 Eier/Wdhg.) im Vergleich zu den Kontrollfrüchten (Ø 6 Eier/Wdhg.).

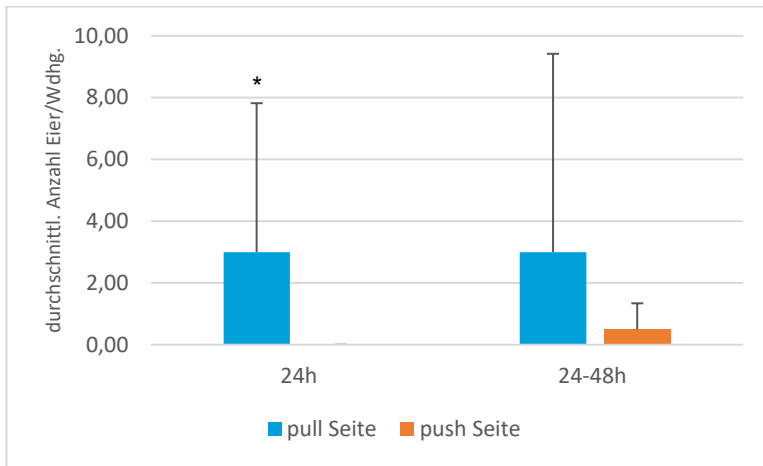


**Abbildung 58:** Durchschnittliche Anzahl Eiablagen/Wdhg. in double choice Versuchen mit push-Komponente nach 24h und mit gealtertem Duftstoff; push-Komponente: 400µl BA auf Maiskolbengranulat, n=6.

Im letzten Versuchsansatz wurden die Auswirkungen auf das Eiablageverhalten von *D. sukuzii* bei gleichzeitiger Anwesenheit beider Komponenten (push und pull) untersucht. Als push-Komponente wurden wie im Versuch zuvor 400µl BA auf 20g Maiskolbengranulat eingesetzt. Zusätzlich wurden als pull-Komponente auf der gegenüberliegenden Käfigseite Lockstofffallen mit der bereits beschriebenen Dreierkombination aus Attraktantien aufgehängt (Abb. 59). Für eine Versuchslaufzeit von 24 Stunden wurden auch hier 25 Weibchen pro Käfig eingesetzt und im Anschluss die Eiablage in den Früchten sowie die Fallenfänge ausgezählt. Auch für diese Versuchsreihe wurde ein aged residue Test mit identischem Versuchsaufbau angeschlossen. Abbildung 60 zeigt die Anzahl abgelegter Eier 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach Applikation des Repellents.



**Abbildung 59:** Versuchsaufbau push&pull-Versuch. Links: Lockstofffalle als pull-Komponente, rechts: Maiskolbengranulat mit Repellent (BA) als push-Komponente.



**Abbildung 60:** Durchschnittliche Anzahl Eiablagen/Wdhg. in double choice Versuchen mit push- und pull-Komponente nach 24h und mit gealtertem Duftstoff; push-Komponente: 400µl BA auf Maiskolbengranulat, pull-Komponente: Attraktantien (AC, PE und IA) in Lockstofffalle; Sterne über den Balken zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und Testfrüchten (Wilcoxon Rank-Sum Test;  $p < 0,05$ ),  $n=6$ .

Innerhalb der ersten Versuchsreihe (frisch appliziertes Repellent) wurden nur auf der pull-Seite Eier abgelegt. In den Folgeversuchen mit gealtertem Duftstoff stieg die Eiablage rate auch auf der push-Seite leicht an, lag aber mit durchschnittlich 0,5 Eiern/Wdhg. immer noch weit unter der Rate der pull-Seite (Ø 3 Eier/Wdhg.). Generell waren die Eiablageraten in beiden Versuchsreihen aber sehr gering, eine Überprüfung mit dem Wilcoxon Rank-Sum Test ergab für die ersten 24 Stunden signifikante Unterschiede zwischen den Eiablageraten auf der push- und der pull-Seite. Die Fangquoten der Lockstofffallen auf der pull-Seite lagen nach 24 Stunden im Mittel bei 53,3%, nach 48 Stunden (gealterter Duftstoff) bei 40% (Ergebnisse nicht grafisch dargestellt). Die geringen Eiablagen bei gleichzeitig niedrigen Fangquoten könnten auch auf schlechte Konditionen der Zuchtfliegen zurückzuführen sein.

### Zusammenfassung Semifreilandversuche

Die Substanz BA hatte in den durchgeführten Semifreilandversuchen weder einen repellenten Effekt auf das Migrationsverhalten von *D. sukukii* noch auf das Eiablageverhalten der Fliegen. Es war sogar ein gegenteiliger, anziehender Effekt erkennbar. Nur bei gleichzeitiger Anwesenheit der push- und der pull-Komponente (Lockstofffalle) kam es zu einer signifikanten Reduktion der Eiablage. Die generell niedrigen Eiablageraten in diesen Versuchsreihen machen eine gesicherte Aussage allerdings schwierig. Fliegen aus Laborzuchten, welche unter gleichbleibenden klimatischen Bedingungen gehalten werden, sind in der Regel nicht ausreichend an Freilandbedingungen angepasst. Insbesondere große Hitze, Trockenheit und Schwankungen von Temperatur und Luftfeuchte haben negative Auswirkungen auf die Fitness der Tiere. Weitere Untersuchungen zur Validierung der Ergebnisse wären notwendig.

In vorangegangenen Versuchen hatte sich bereits gezeigt, dass die Wirkung der Substanz BA auf *D. sukukii* stark konzentrationsabhängig ist. Der zunächst in Laborversuchen nachgewiesene repellente Charakter kann bei Verdünnung der Substanz in Attraktivität umschlagen. Dies betrifft sowohl das Flug- als auch das Eiablageverhalten der Kirschessigfliegen. Für einen Einsatz im Freiland wären Dispenser/Trägermaterialien erforderlich, welche über einen langen Zeitraum eine konstant hohe Abgaberate gewährleisten könnten. Eine möglichst großflächige Ausbringung im direkten Umfeld der zu schützenden Kulturpflanzen wäre dabei optimal. Herkömmliche Dispenser wirken nur punktuell und können größere Flächen nicht ausreichend abdecken.

## **AP 6.2 Versuche in Kirschanlagen**

Aufgrund der unzureichenden Wirkung der getesteten Formulierungen im Labor und Semifreiland wurden keine Freilandversuche in Kirschanlagen durchgeführt.

## **AP 6.3 Versuche in isolierten Weinbergen**

Aufgrund der unzureichenden Wirkung der getesteten Formulierungen im Labor und Semifreiland wurden keine Freilandversuche in Weinbergen durchgeführt.

## **2. Verwertung**

### **a) Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen**

Es wurden keine Schutzrechte angemeldet.

### **b) Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende**

Eine direkte, sich an das Projekt anschließende wirtschaftliche Verwertung der Projektergebnisse ist nicht möglich, da die Push&Pull-Strategie im Freiland nicht etabliert werden konnte. Die Spezifität der bereits in einem Vorgängerprojekt entwickelten Lockstofffalle konnte durch bautechnische Veränderungen dahingehend optimiert werden, dass durch die Ermittlung der optimalen Größe der Einfluglöcher für die Kirschessigfliege der Fang von größeren Nichtziel-Organismen verhindert wird. Die Erhöhung der Spezifität besonders gegenüber der häufig in den Fallen zu findenden kleineren Art *D. subsobscura* konnte jedoch weder durch bautechnische Veränderungen noch durch Zusatz von fruchtspezifischen Duftstoffen erreicht werden. Damit sehen wir selbst für den Einsatz der Lockstoff-Falle als Monitoringinstrument keine Marktchancen, im Vergleich zu den bereits auf dem Markt erhältlichen Fallen gibt es keinen Wettbewerbsvorteil. Bezüglich der Push-Komponente (Applikation des Repellents auf ein pflanzliches Trägermaterial) könnte aber, nach der Durchführung weiterer Forschungsarbeiten, eine Vermarktung möglich sein. Zur Abgabe von Repellents oder allgemein von Pheromonen/Semiochemikalien werden verschiedene Dispenser genutzt, diese lassen sich in Membran-, und Septumdispenser einteilen, eine weitere Kategorie stellen die sogenannten „Festmatrixspender“ dar. Für die Behandlung großer Anbauflächen werden alternativ sprühbare Formulierungen oder Aerosoldispenser eingesetzt (Klassen et al. 2023<sup>1</sup>). Die Ausbringung von Repellents mittels nachhaltig produziertem und biologisch abbaubarem, pflanzlichen Trägermaterial stellt eine interessante Alternative dar, der wir große Marktchancen einräumen.

Die im Projekt gewonnenen Erkenntnisse zur Anwendung biologisch wirksamer Substanzen in einer funktionellen Matrix eröffnen neue Möglichkeiten zur Erweiterung des Nanopool-Produktportfolios im Bereich Agrar- und Pflanzenschutzanwendungen. Die entwickelten Rezepturen und Verfahren könnten mit geringfügigen Anpassungen auch auf weitere Schädlingsarten oder Kulturpflanzen übertragen werden. Durch die Kombination von sprühfähiger Matrix und natürlichen Repellentien ergibt sich ein innovatives, umweltfreundliches Produktkonzept, das sich für landwirtschaftliche Betriebe mit hohem Qualitätsanspruch (z. B. im Obst- und Weinbau) eignet. Obwohl das Projekt die angestrebten Wirksamkeitsnachweise in Feldversuchen nicht vollständig erbringen konnte, liefern die entwickelten Konzepte und Formulierungen eine belastbare Basis für weiterführende Entwicklungen und Anwendungen.

<sup>1</sup>Klassen, D., Lennox, M. D., Dumont, M. J., Chouinard, G., & Tavares, J. R. (2023). Dispensers for pheromonal pest control. *Journal of Environmental Management*, 325, 116590.

### **c) Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende**

Die Projektergebnisse wurden auf Fachtagungen wie der Deutschen Pflanzenschutztagung und der Entomologentagung der DgaaE einem nationalen und internationalen wissenschaftlichen Publikum vorgestellt. Nach der Auflösung der RLP AgroScience zum 31. April 2025 können die Projektergebnisse nun vom DLR Rheinpfalz weiterhin wissenschaftlich und technologisch verwertet werden und zur Einwerbung neuer Forschungs- und Entwicklungsaufträge genutzt werden.

Die Öffentlichkeitsarbeit trägt auch dazu bei, die Firmen Insect Services und Nanopool im Bereich „Neue Bekämpfungsmethoden im Obst- und Pflanzenschutz“ bekannter zu machen. Damit erhöht sich ihre wissenschaftliche Konkurrenzfähigkeit deutlich, v.a. auch in Bezug auf eine zukünftige Beteiligung an Forschungs- und Entwicklungsaufträgen in diesem Themenbereich.

In dem Projekt wurden neue Ausbringungsmöglichkeiten von Duftstoffen ausprobiert, die über die klassischen Dispenser hinausgehen. Die Nutzung von biologisch abbaubaren pflanzlichen Trägermaterialien ermöglicht eine großflächige Ausbringung z.B. von Repellentstoffen. Diese innovativen technologischen Möglichkeiten können von Insect Services in neuen Forschungs- und Entwicklungsprojekten genutzt werden.

Das Projekt hat gezeigt, dass funktionale Beschichtungssysteme wie die von Nanopool entwickelten SiO<sub>2</sub>-basierten Matrizen auch im biologischen Pflanzenschutz technisch einsetzbar sind. Die erfolgreiche Einbindung natürlicher Wirkstoffe bei gleichzeitigem Erhalt ihrer Wirksamkeit unter Feldbedingungen stellt eine bedeutende Weiterentwicklung der bestehenden Technologieplattform dar. Technologisch besteht ein hoher Innovationsgrad im Bereich kontrollierter Wirkstofffreisetzung sowie in der sicheren Formulierung flüchtiger oder phytotoxisch kritischer Substanzen. Dieses Know-how kann auch für weitere Anwendungen wie Saatgutbehandlung, Lagerungsschutz oder Insektenbarrieren adaptiert werden. Die Ergebnisse werden zudem in bestehende F&E-Aktivitäten bei Nanopool integriert und als Grundlage für weitere FuE-Projekte genutzt – insbesondere im Zusammenhang mit nachhaltiger Landwirtschaft und funktionellen Oberflächen. Eine Zusammenarbeit mit landwirtschaftlichen Versuchseinrichtungen, Hochschulen und Praxispartnern ist weiterhin vorgesehen.

### **d) Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit**

Die Entwicklung nachhaltiger, umweltschonender Bekämpfungsmethoden im Pflanzenschutz wird immer wichtiger. Die Anzahl der invasiven Arten ist vor allem in den letzten Jahren stark gestiegen, mit dem Klimawandel verschieben und vergrößern sich die Verbreitungsgebiete sowohl der invasiven als auch der einheimischen Schädlingarten. Unter diesem Blickwinkel und im Hinblick auf die von der EU im Rahmen des Green Deals angestrebte Reduktion der Pflanzenschutzmittel um 50% bis zum Jahr 2030 ist die Etablierung neuer Bekämpfungsmethoden dringend erforderlich.

Die auf einer Push&Pull-Strategie basierenden Projekterfahrungen können zum einen auf andere Schadinsekten übertragen werden. Zum anderen sind v. a. die Ergebnisse der Untersuchungen zur Abgabe der Repellentsubstanzen (Push-Komponente) aus verschiedenen Dispensern sehr wichtig. Das verwendete pflanzliche Trägermaterial (Maiskolbengranulat) stellt dabei einen hoch innovativen Ansatz dar, da das Material aus abgeernteten, nicht mehr verwendbaren Maiskolben gewonnen wird und somit nachhaltig und biologisch abbaubar ist. Ein wirksamer Dispenser muss im Freiland die Abgabe der Duftstoffe in gleichmäßig hoher Konzentration über einen möglichst langen Zeitraum gewährleisten. Insect Services wird überprüfen, ob weitere Versuche mit dem pflanzlichen Trägermaterial durchgeführt werden und wie diese Entwicklungsarbeiten finanziert werden können.

An der RLP AgroScience wurde bereits in einem parallel laufenden Projekt eine Push&Pull-Bekämpfungsstrategie gegen Psylliden entwickelt. Die Kombination beider Strategien ermöglicht nun neue

Forschungs- und Entwicklungszusammenarbeiten auch für das DLR Rheinpfalz und die Einwerbung neuer Forschungsprojekte. Das Projektkonsortium mit den beteiligten Firmenpartnern kann an diesen Projekten als potentielle Verwertungspartner beteiligt werden.

Die im Projekt gemachten Erfahrungen im Umgang mit biologisch wirksamen Substanzen in funktionellen Trägermaterialien können auf andere Anwendungsbereiche, Kulturen oder Zielorganismen übertragen werden und dienen als Ausgangspunkt für zukünftige Entwicklungen. Darüber hinaus bieten sich Möglichkeiten für vertiefende Forschung zur Einbettung von natürlichen Wirkstoffen, zur Optimierung der Formulierungsstabilität und Regenfestigkeit der SiO<sub>2</sub>-Matrix.

### 3. Erkenntnisse von Dritten

Erkenntnisse von Dritten sind während der Projektlaufzeit keine bekannt geworden.

### 4. Veröffentlichungen

Die Projektergebnisse wurden auf wissenschaftlichen Tagungen sowie der interessierten Öffentlichkeit durch folgende Beiträge bekannt gemacht:

- Publikationen:
  - S. Alexander, W. Jaraus, M. Runne, G. Krczal, C. Dippel, S. Schwindt, S. Lokermans-Schwindt (2023): Entwicklung einer Push-and-pull-Strategie zur Bekämpfung von *Drosophila suzukii* (Matsumura) mittels einer sprühfähigen Matrix und Extrakten aus Koniferen. Julius-Kühn-Archiv, 475, 521-522.
- Posterpräsentationen:
  - S. Alexander, W. Jaraus, M. Runne, G. Krczal, C. Dippel, S. Schwindt, S. Lokermans-Schwindt (2023): Entwicklung einer Push-and-pull-Strategie zur Bekämpfung von *Drosophila suzukii* (Matsumura) mittels einer sprühfähigen Matrix und Extrakten aus Koniferen. 63. Deutsche Pflanzenschutztagung, 26. – 29. September 2023, Göttingen.
  - S. Alexander, W. Jaraus, M. Runne, G. Krczal, C. Dippel, S. Schwindt, S. Lokermans-Schwindt (2025): Entwicklung einer Push-and-pull-Strategie zur Bekämpfung von *Drosophila suzukii* (Matsumura) mittels einer sprühfähigen Matrix und Extrakten aus Koniferen. DGaaE Entomologentagung 2025, 17.-20. März 2025, Hochschule Geisenheim.
- Präsentation des Projekts am Tag der offenen Tür des DLR Rheinpfalz und der RLP AgroScience am 31.08. – 01.09.2024

Darüber hinaus ist eine wissenschaftliche Publikation ausgewählter Projektergebnisse in Arbeit.

# ANHANG

## Teilvorhaben 1: Entwicklung einer Push-Methode zur Bekämpfung von *Drosophila suzukii*

### 1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens

Ziel des Teilvorhabens 1 (Federführung RLP AgroScience GmbH) war die Identifizierung und Wirksamkeitstestung von Repellentstoffen gegenüber *Drosophila suzukii* (Push-Komponente). Ausgebracht im Inneren von Erwerbsanlagen mit zu schützenden Wirtspflanzen sollten sie das Einwandern der Tiere in die Anlagen verhindern. In Vorarbeiten haben sich Duftstoffe aus Koniferen als repellent gegenüber dieser Spezies erwiesen. In einem umfangreichen Screening sollten weitere repellente Substanzen identifiziert und in anschließenden Bioversuchen im Labor, Gewächshaus und Freiland auf ihre Wirksamkeit hin untersucht werden.

### 2. Bearbeitete Arbeitspakete

#### AP 1 Identifizierung repellenter synthetischer Duftstoffe

In einem umfassenden Screening von potenziell repellenten Konifereninhaltsstoffen konnten aus insgesamt 32 getesteten Substanzen acht Stoffe identifiziert werden, welche in Laborversuchen signifikant repellent auf adulte Kirschessigfliegen wirkten (7 Einzelsubstanzen und ein Koniferenöl). Auffallend war, dass Einzelsubstanzen meist wirksamer waren als Koniferenöle, deren Duftstoffbouquet aus zahlreichen Einzelkomponenten besteht, von denen einige auch attraktiv auf *D. suzukii* wirkten. In weiteren Versuchen wurden die acht Kandidaten auf ihre fraßhemmenden und ovideterrenten Eigenschaften hin untersucht.

#### AP 2 Identifizierung attraktiver synthetischer Duftstoffe

##### AP 2.2 Test der synthetischen Duftstoffe in IS-Falle im Halbfreiland

Die vom Kooperationspartner Insect Services in Laborversuchen identifizierte attraktive Lockstoffkombination aus PE und AC-Lösung (AP 2.1) wurde in Semifreilandversuchen validiert. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für die folgenden Freilanduntersuchungen (AP 3.3), in denen die attraktive Duftstoffkombination in der optimierten IS-Falle angewandt wurde.

#### AP 3 Optimierung der IS-Falle

##### AP 3.1 Optimierung des Fallendesigns

Der in einem Vorgängerprojekt von Insect Services entwickelte Prototyp der IS-Falle wurde durch bauliche Veränderungen in folgenden Gesichtspunkten angepasst: Anzahl, Anordnung sowie Durchmesser der Einfluglöcher. Zudem wurde eine Variante mit partieller roter Einfärbung des sonst transparenten Fallenkorpus hergestellt.

##### AP 3.3 Validierung der Falle im Freiland

An mehreren Standorten im Raum Neustadt an der Weinstraße wurden in Obst- und Beerenobst-Kulturen sowie in Wildhabitaten die verschiedenen Fallen-Modifikationen auf ihre Fängigkeit getestet. Durch die Anpassung des Durchmessers der Einfluglöcher konnte der Beifang größerer Nicht-Zielorganismen im Vergleich zu einer im Handel erhältlichen Massenfalle deutlich reduziert werden. Kombiniert wurden die modifizierten IS-Fallen mit ausgewählten, attraktiven Lockstoffkombinationen, welche in Laboruntersuchungen bei Insect Services ermittelt wurden (AP 3.2). Dies sollte die Spezifität der Falle gegenüber *D. suzukii* erhöhen.

## **AP 4 Entwicklung einer nicht phytotoxischen SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix zur Einbindung der Duftstoffe**

### **AP 4.1 Entwicklung einer nicht phytotoxischen SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix**

Die vom Kooperationspartner Nanopool entwickelten SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrices und SiO<sub>2</sub>-Matrixes wurden durch Applikation auf diverse Kulturpflanzen auf ihre Phytotoxizität untersucht. Die Basisformulierungen sowie ihre Einzelkomponenten konnten als nicht phytotoxisch eingestuft werden. Auch bei Einbindung von Cyclodextrin-Duftstoff-Komplexen wurden keine Schäden am Pflanzenmaterial festgestellt. Bei Zugabe von Duftstoffen in die reine SiO<sub>2</sub>-Matrix kam es jedoch konzentrationsabhängig zu Blattschäden an den Testpflanzen.

### **AP 4.4 Bestimmung der Abgaberate der Duftstoffe (GC/MS)**

Die im Projektantrag geplante Freisetzungsanalyse der gebundenen Duftstoffe konnte aus organisatorischen Gründen nicht durchgeführt werden. Stattdessen wurde der tatsächlich eingebundene Anteil eines exemplarischen Cyclodextrin-LI-Komplexes mittels GC/MS bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nur ein geringer Teil der ursprünglich eingesetzten Duftstoffmenge im Cyclodextrin gebunden war. Abhängig vom verwendeten Lösungsmittel (Aceton oder Wasser) lag diese bei 5% (Aceton) bzw. zwischen 0,04% und 0,14% (Wasser). Zudem bestätigte sich, dass der Lösungsprozess im Wasser über einen längeren Zeitraum andauert.

## **AP 5 Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der „push“ und der „pull“-Matrix**

### **AP 5.1 Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der „push“-Matrix in Bioversuchen**

Ausgewählte repellente Substanzen wurden vom Kooperationspartner Nanopool in verschiedenen Mengen und Konzentrationen sowie unter Verwendung verschiedener Herstellungsmethoden in eine SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix bzw. SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebaut und im Anschluss in verschiedenen double choice Versuchen im Gewächshaus auf ihre Wirksamkeit gegenüber *D. suzukii* überprüft.

Bei Verwendung von Cyclodextrin-Einschlusskomplexen konnte keine repellente Wirkung festgestellt werden, die über 24 Stunden hinausging. Um die Konzentration der eingesetzten Repellentien zu erhöhen, wurde im Anschluss eine direkte Einbindung der Duftstoffe in die SiO<sub>2</sub>-Matrix vorgenommen. Da dies bei direkter Applikation auf die Testpflanzen zu phytotoxischen Schäden führte, wurden alternative Lösungsansätze untersucht: klassische Dispenser sowie verschiedene Trägermaterialien (Unkrautvlies, Dispensermembran, Maiskolbengranulat).

## **AP 6 Validierung der Push&Pull-Strategie**

Zur Validierung der hergestellten Formulierungen wurden diese in Push&Pull-Szenarien unter Semifreilandbedingungen getestet. Die als pull-Komponente eingesetzte IS-Falle enthielt neben der Fangflüssigkeit (Mischung aus Merlot, Apfelessig und Wasser im Verhältnis 4:3:1) eine Kombination aus drei verschiedenen Attraktantien: AC-Lösung (33mg/ml H<sub>2</sub>O) und PE (1:500 in Mineralöl) in Dispenserfläschchen, sowie 2,5µl IA in der Fangflüssigkeit. Als push-Komponente diente die Substanz BA, welche auf ein pflanzliches Trägermaterial appliziert wurde (Maiskolbengranulat). Die Substanz BA hatte in den durchgeführten Semifreilandversuchen weder einen repellenten Effekt auf das Migrationsverhalten von *D. suzukii* noch auf das Eiablageverhalten der Fliegen. Es war sogar ein gegenteiliger, anziehender Effekt erkennbar. Nur bei gleichzeitiger Anwesenheit der push- und der pull-Komponente, ließen sich Tendenzen zur Reduktion der Eiablage erkennen. Die generell niedrigen Eiablagelraten in diesen Versuchsreihen machen eine gesicherte Aussage allerdings schwierig.

### 3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens

In verschiedenen Bioassays im Labor konnten mehrere Konifereninhaltsstoffe identifiziert werden, welche sowohl repellente als auch fraßhemmende und ovideterrente Eigenschaften gegenüber *D. suzukii* aufweisen. Die Wirkung ist dabei stark konzentrationsabhängig und kann bei zu niedriger Dosierung in Attraktivität umschlagen.

Der bereits vorliegende Fallen-Prototyp vom Kooperationspartner Insect Services konnte durch Anpassung des Lochdurchmessers dahingehend optimiert werden, dass der Beifang von größeren Nicht-Zielorganismen weitgehend reduziert wurde. Der zusätzliche Einsatz von fruchtspezifischen Duftstoff-Kombinationen führte zu keiner maßgeblichen Steigerung der Kirschessigfliegenfänge. Die eingesetzte Lebensmittelmischung aus Merlot, Apelessigessig und Wasser in der transparenten IS-Falle führte auch ohne den Zusatz der getesteten Attraktantien zu hohen Fangerfolgen. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass weder die Höhe der Fänge noch die Selektivität der Fallen während der Fruchtreife, wenn die Lockstoffe mit dem Duftstoffbouquet der Wirtsfrüchte konkurrieren, erhöht werden konnten.

Die zu Projektbeginn angestrebte Einbindung der Duftstoffe in Beta-Cyclodextrine brachte einige Schwierigkeiten mit sich. Die tatsächliche Menge Duftstoff, welche nach der Komplexierung im Einschlusskomplex vorliegt, ist zu gering, um für einen längeren Zeitraum olfaktorisch wirksam gegenüber *D. suzukii* zu sein. Um eine ausreichend abstoßende Wirkung auf die Fliegen zu erreichen, müssten die untersuchten Repellentien in hohen Konzentrationen eingesetzt werden. Bei direkter Einbindung der Substanzen in die SiO<sub>2</sub>-Matrix zeigten sich bei den Testpflanzen starke phytotoxische Reaktionen. Da eine Direktapplikation auf das Pflanzengewebe somit nicht in Frage kam, wurden verschiedene Trägermaterialien und Dispenser zur Ausbringung der Substanzen getestet. Da der Wirkradius dieser Materialien im Vergleich zu der großflächigen Besprühung der Pflanzen räumlich begrenzt ist, blieb der gewünschte Effekt auf die Fliegen aus.

Im Fokus der Versuche stand die Substanz BA, da diese in den ätherischen Ölen vieler Nadelbäume wie Tannen, Lärchen, Douglasien, Fichten und Kiefern enthalten ist und bereits eine Zulassung in der Lebensmittelindustrie als Aromastoff besitzt. Unter Laborbedingungen wirkte die Substanz signifikant repellent gegenüber adulten *D. suzukii*. In Gewächshaus und Semifreilandversuchen hat sich gezeigt, dass die Wirkung stark konzentrationsabhängig ist und bei zu starker Verdünnung in Attraktivität gegenüber der Adulte sowie zu einer Steigerung der Eiablagen führen kann.

In den anwendungsorientierten Push&Pull-Versuchen im Semifreiland ließ sich nur bei gleichzeitiger Anwesenheit der push-Komponente (BA auf Maiskolbengranulat als Trägermaterial) und der pull-Komponente (IS-Falle mit Dreier-Duftstoffkombination) eine signifikante Reduktion der Eiablage feststellen. Allerdings machen die generell niedrigen Eiablagerraten in diesen Versuchsreihen eine gesicherte Aussage schwierig. Für einen Einsatz im Freiland wären Dispenser/Trägermaterialien erforderlich, welche über einen langen Zeitraum eine konstant hohe Abgaberate gewährleisten könnten. Eine möglichst großflächige Ausbringung im direkten Umfeld der zu schützenden Kulturpflanzen wäre dabei optimal. Herkömmliche Dispenser wirken nur punktuell und können größere Flächen nicht ausreichend abdecken.

## **Teilvorhaben 2: Entwicklung einer Pull-Methode zur Bekämpfung von *Drosophila suzukii***

### **1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens**

In Teilvorhaben 2 (Federführung Insect Services GmbH) sollte eine effektive Pull-Methode zur Bekämpfung von *D. suzukii* entwickelt werden. Voraussetzung dafür ist die Identifikation hochwirksamer, attraktiver Duftstoffe im Laborversuch mit der anschließenden Überprüfung der Wirksamkeit der Lockstoffe im Gewächshaus bzw. im Halbfreiland und Freiland. Die in einem Vorgängerprojekt entwickelte Lockstofffalle gegen die Kirschessigfliege sollte hinsichtlich des Fallendesigns und der Spezifität der Lockstoffe weiter verbessert und der Fangerfolg der optimierten Falle im Freiland überprüft werden.

### **2. Bearbeitete Arbeitspakete**

In Teilvorhaben 2 wurden insgesamt fünf Arbeitspakete bearbeitet. In Rahmen von AP 1 und AP 2 wurden attraktiv bzw. repellent wirkende synthetische Duftstoffe identifiziert. Die Arbeiten in AP 3 beinhalteten die Optimierung der bereits vorhandenen Massenfangfalle hinsichtlich der Spezifität des Lockstoffes. Ziel der Arbeitspakete 5 und 6 war die Überprüfung der Wirksamkeit der push- wie auch der pull-Matrizen der zu etablierenden alternativen, umweltschonenden Bekämpfungsstrategie.

#### **AP 1 Identifizierung repellenter synthetischer Duftstoffe**

Mit ausgewählten, repellent wirkenden Substanzen wurden Versuche zu Dosis-Wirkungsbeziehungen durchgeführt, die Duftstoffe wurden in unterschiedlicher Menge und Konzentration hinsichtlich ihrer Wirksamkeit untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass bei einigen Substanzen deutlich abschreckende Verhaltensantworten bei Verwendung von höheren Konzentrationen und Mengen erzielt wurden. War die Dosierung dagegen zu niedrig, führte dies in einigen Fällen zum Verlust der Wirkung bzw. wirkten die Substanzen dann sogar attraktiv.

Mit vier repellent wirkenden Substanzen wurden, zur Unterstützung der Arbeiten beim Kooperationspartner RLP AgroScience, Untersuchungen zur Verhinderung der Eiablage von *D. suzukii* durchgeführt. In diesen Versuchen führte nur der Einsatz von BA im Vergleich zur Kontrolle zu einer stärkeren Reduktion der Eiablage. Die statistische Auswertung der Daten mittels t-Test zeigte aber keinen signifikanten Unterschied an.

#### **AP 2 Identifizierung attraktiver synthetischer Duftstoffe**

Mit 17 auf Grundlage einer Literaturrecherche ausgewählten fruchtspezifischen Substanzen wurden Versuche zur olfaktorischen Wirkung dieser Duftstoffe auf die Kirschessigfliege durchgeführt. Es wurden sechs attraktiv wirkende Duftstoffe identifiziert, bei diesen Substanzen zeigten sich bei Verwendung von 1µl Testsubstanz signifikante Unterschiede bezüglich der Fangquoten von Test- und Kontrollschalen. Die Fangquoten lagen in den Versuchen jedoch auf einem niedrigen Niveau von knapp 40% bis 60%. Bei höherer Dosierung (3µl) konnte für drei der Substanzen eine deutliche Steigerung der Fangquote auf bis zu 80% nachgewiesen werden. Mit insgesamt acht Substanzen wurden zudem Zweier-Kombinationen (in unterschiedlichen Mengen) getestet, dabei trat bei einer Substanzkombination ein leichter synergistischer Effekt bei der anlockenden Wirkung auf.

#### **AP 3 Optimierung der IS-Falle**

Die Optimierung des aus einem Vorgängerprojekt bereits vorhandenen Fallen-Prototyps sollte mittels baulicher Veränderungen sowie durch Verbesserung der Selektivität des Lockstoffes erfolgen.

### **AP 3.1 Optimierung des Falldesigns**

Für dieses Arbeitspaket stellte Insect Services dem Kooperationspartner RLP AgroScience mehrere Fallen-Prototypen zur Verfügung. Dort wurden vor Ort bauliche Veränderungen vorgenommen und die Fallen im Freiland getestet. Mittels dieser Untersuchungen konnte der optimale Durchmesser der Einfluglöcher für den Zielorganismus *D. suzukii* ermittelt werden. Damit lässt sich der Beifang von größeren Nicht-Zielorganismen deutlich reduzieren.

### **AP 3.2 Optimierung der Spezifität des Lockstoffes**

Ziel war es, durch die Zugabe von fruchtspezifischen Duftstoffen eine erhöhte Selektivität der Falle zu erreichen. Im Fokus stand dabei die im Vergleich zur Kirschessigfliege deutlich kleinere Art *D. subobscura*, die sehr häufig als Beifang in den Fallen gefunden wird. Für diese Versuche wurden vier hochgradig fruchtspezifische Substanzen ausgewählt, die in unterschiedlichen Mengen (und in Kombination mit verschiedenen Fangflüssigkeiten) mit dem Fallen-Prototyp getestet wurden. Eine Erhöhung der Selektivität konnte aber durch die Zugabe dieser Duftstoffe nicht erreicht werden. Die Ergebnisse der Versuche belegen, dass die getesteten Substanzen bei Einsatz in den Fallen nur in Kombination mit Lebensmittelgemischen als Fangflüssigkeit ihre attraktive Wirkung entfalten. Ohne dieses „Hintergrund-Duftstoffbouquet“ liegen die Fallenfänge von *D. suzukii* in einem deutlich niedrigeren Bereich. Dies ist bemerkenswert, da somit davon ausgegangen werden muss, dass keine Falle entwickelt werden kann, die nur auf dem Einsatz synthetischer Lockstoffe basiert.

### **AP 3.3 Validierung der Falle im Freiland**

Von der RLP AgroScience wurden verschiedene Fallen-Varianten in Obst- und Beerenobst-Kulturen sowie in Wildhabitaten unter Freilandbedingungen getestet. Die Versuche in den isolierten Weinbergen in der Nähe von Potsdam (Insect Services) sind weggefallen. Stattdessen wurden von Insect Services ergänzende Laborversuche zur Eiablagereduktion (s. AP 1) wie auch verschiedene Experimente zur Wirkung der push- und pull-Komponenten übernommen.

## **AP 5 Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der „push“ und der „pull“-Matrix**

### **AP 5.1 Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der „pull“-Matrix in Bioversuchen**

Die in AP 2 identifizierten, attraktiven Substanzen wurden vom Kooperationspartner Nanopool in verschiedenen Mengen und Konzentrationen in eine SiO<sub>2</sub>-Matrix eingebaut. Dies erfolgte sowohl mit als auch ohne die Zugabe von Cyclodextrinen. In anschließenden Bioassays zur Wirksamkeitsprüfung mit *D. suzukii* wurde in fast allen Fällen eine deutliche Reduktion bzw. der Verlust der attraktiven Wirkung festgestellt.

## **AP 6 Validierung der Push&Pull-Strategie**

In Arbeitspaket 6 sollten die Einzelkomponenten der zu etablierenden Push&Pull-Strategie hinsichtlich ihrer gemeinsamen Wirksamkeit gegen *D. suzukii* untersucht werden. Mittels sogenannter simulated-use Versuche wurden diese Untersuchungen zusammengefasst, d.h., dass in jedem Versuch die push- wie auch die pull-Komponente zum Einsatz kam.

Als pull-Komponente wurde der Fallen-Prototyp mit einer Fangflüssigkeit bestehend aus Merlot, Apfelessig und Wasser sowie den Duftstoffen PE, einer wässrigen AC-Lösung und IA in den Gazezelten eingesetzt. Als push-Komponente wurde BA verwendet, diese repellent wirkende Substanz wurde in verschiedenen Mengen eingesetzt und es wurde die Abgabe von unterschiedlichen Trägermaterialien untersucht (Dispenserfäschchen, Membranscheibe, SiO<sub>2</sub>-Matrix plus Emulgator mit eingebundenem BA,

Maiskolbengranulat). Um die Bedingungen im Freiland möglichst gut zu simulieren, kamen in den Experimenten Pflanzen und Wirtsfrüchte zum Einsatz. Am Ende des Versuchs wurden die im Zelt verbliebenen Individuen und die mit der Falle gefangenen Tiere bonitiert und in den Wirtsfrüchten wurden die Larven der Kirschessigfliegen gezählt. Die Ergebnisse dieser im Labor durchgeführten anwendungsorientierten Versuche zeigen zum einen, dass sich die Fangquoten der Lockstofffalle (pull-Komponente) deutlich reduzieren, sobald Duftstoffe von Pflanzen und Wirtsfrüchten hinzukommen. Zum anderen belegen die Ergebnisse, dass die Wirkung der push-Komponente von der im Versuch eingesetzten Menge und Konzentration des Repellents abhängt. Die in den Luftraum abgegebene Menge der abschreckend wirkenden Substanz wird dabei stark vom verwendeten Trägermaterial/Dispenser bestimmt. In den simulated-use Versuchen wurden die besten Ergebnisse (= niedrige Zahl abgelegter Eier) mit hohen Repellentmengen bei Abgabe von der Membranscheibe und vom Maiskolbengranulat erzielt. Die mittels der SiO<sub>2</sub>-Matrix direkt auf die Blätter ausgebrachte Menge BA führte bei geringer Konzentration (2% BA) dazu, dass die abschreckende Wirkung in eine anlockende Wirkung überging. Auch bei höherer Konzentration (9% BA) konnte keine Reduktion der Eiablage beobachtet werden, zudem traten bei den eingesprühten Pflanzen phytotoxische Langzeitschäden auf.

### **3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens**

Im Labor wurden mit den durchgeführten Bioassays sowohl verschiedene attraktive wie auch repellente Duftstoffe identifiziert. Mittels der Untersuchung von Dosis-Wirkungsbeziehungen konnte für die verhaltensmodifizierenden Substanzen und Substanzkombinationen der beste Wirkungsgrad ermittelt werden. Bemerkenswert ist dabei, dass einige Duftstoffe in Abhängigkeit der Konzentration entweder repellent oder attraktiv wirken.

Der bereits vorliegende Fallen-Prototyp konnte durch bauliche Veränderungen (Größe der Einfluglöcher) dahingehend optimiert werden, dass der Beifang von größeren Nicht-Zielorganismen weitestgehend ausgeschlossen wurde. Die angestrebte Erhöhung der Selektivität der Falle vor allem im Hinblick auf die sehr häufig auftretende Essigfliegenart *D. subobscura* wurde durch die Zugabe von fruchtspezifischen Substanzen allerdings nicht erreicht. Die diesbezüglich erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Entwicklung eines Lockstoffes ausschließlich bestehend aus synthetischen Duftstoffen als unrealistisch einzuschätzen ist.

Mit den etablierten anwendungsorientierten Versuchen (simulated-use) zur Überprüfung der Wirkung der push- und der pull-Komponente können bereits im Labor Aussagen über deren Effektivität getroffen werden. Die erzielten Ergebnisse dienen im Projekt als Entscheidungsgrundlage, auf die geplanten kosten- und zeitintensiven Freilanduntersuchungen zu verzichten. Generell ist der erfolgreiche Einsatz von Repellents (push-Komponente) in der Schädlingsbekämpfung eng an die verwendeten Dispenser gekoppelt. Diese müssen unter Freilandbedingungen die Abgabe des Repellents über einen längeren Zeitraum bei gleichzeitig konstant hohen Abgaberraten gewährleisten. Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche belegen, dass der abschreckend wirkende Duftstoff in der SiO<sub>2</sub>-Matrix bei zu geringer Konzentration eine anlockende Wirkung auf die Kirschessigfliege entfaltet. Bei höherer Konzentration war kein verhaltensmodifizierender Effekt erkennbar, bei den eingesprühten Pflanzen traten aber phytotoxische Langzeitschäden auf. Mit dem verwendeten Maiskolbengranulat konnten hingegen erste positive Ergebnisse produziert werden. Das nachhaltige, biologisch abbaubare Granulat stellt als Trägermaterial für Duftstoffe ein Novum dar und könnte im Rahmen von alternativen, umweltschonenden Bekämpfungsmaßnahmen als innovative Dispensertechnik eine große Verbreitung finden.

## **Teilvorhaben 3: Entwicklung einer SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix zur Einbindung repellenter und attraktiver Duftstoffe für *Drosophila suzukii***

### **1. Ziel und Gegenstand des Teilvorhabens**

Ziel des Teilvorhabens 3 (Federführung Nanopool GmbH) war die Entwicklung einer funktionalen SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix zur Einbindung von Duftstoffen für den Einsatz im Pflanzenschutz. Diese Matrix sollte sowohl attraktive als auch repellente Wirkstoffe kontrolliert freisetzen, ohne phytotoxische Effekte an den Kulturpflanzen zu verursachen. Im Fokus stand dabei insbesondere die Herstellung einer phytokompatiblen Formulierung sowie die Optimierung von Komplexierung, Einbindung und Freisetzung der Wirkstoffe.

### **2. Bearbeitete Arbeitspakete**

Im Rahmen des Teilvorhabens wurden vier aufeinander abgestimmte Arbeitspakete bearbeitet, die jeweils unterschiedliche Aspekte der Entwicklung und Bewertung der SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix abdeckten.

#### **AP 4.1 Entwicklung einer nicht phytotoxischen SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix**

In diesem Arbeitspaket wurde eine wasserbasierte Matrix auf Basis von Siliciumdioxid entwickelt, die  $\beta$ -Cyclodextrin zur Einbindung von Duftstoffen enthielt. Ziel war die technische Optimierung der Matrix hinsichtlich Homogenität, Stabilität und Herstellungsverfahren. Zusätzlich wurde die Pflanzenverträglichkeit der Matrix und ihrer Einzelkomponenten in umfangreichen Versuchsreihen geprüft, insbesondere im Hinblick auf mögliche phytotoxische Effekte. Die Applikation erfolgte auf verschiedene Kulturpflanzen, wobei sich die Matrix als verträglich erwies.

#### **AP 4.2 Einbindung verschiedener Repellentstoffe in die Matrix**

Die Einbringung repellenter Duftstoffe erfolgte zunächst ohne Cyclodextrine, um die chemische Kompatibilität mit der Matrix zu prüfen. Nach positiven Stabilitätstests wurden auch Cyclodextrin-Komplexe ausgewählter Repellentstoffe hergestellt, diese zeigten jedoch teilweise unerwünschte Wirkungsverluste oder Umkehrwirkungen (attraktive statt repellente Effekte). Daher wurde der Fokus auf die direkte Einbringung der Wirkstoffe in die SiO<sub>2</sub>-Matrix gelegt. Die optimierten Formulierungen wurden auf ihre repellente Wirkung gegenüber *Drosophila suzukii* bei den Kooperationspartnern getestet (double choice Versuche).

#### **AP 4.3 Einbindung attraktiver Duftstoffe in die Cyclodextrin-Matrix**

In Abstimmung mit den Projektpartnern und auf Basis wissenschaftlicher Literatur wurden 17 potenziell attraktive Verbindungen identifiziert und in Gazezeltversuchen auf ihre Anlockwirkung getestet. Einige Substanzen zeigten unverdünnt eine erhöhte Attraktivität. Die anschließende Einbindung in die SiO<sub>2</sub>-Matrix führte jedoch zu einem fast vollständigen Verlust der Anlockwirkung, unabhängig von der Einbindungsmethode (mit oder ohne Cyclodextrine). Die Hypothese lautet, dass hydrophile Substanzen nicht effizient in die Matrix eingebunden werden können.

#### **AP 4.4 Bestimmung der Abgaberate der Duftstoffe (GC/MS)**

Ursprünglich war eine Freisetzungsanalyse vorgesehen, die aus organisatorischen Gründen nicht durchgeführt werden konnte. Stattdessen wurde der tatsächlich eingebundene Anteil eines exemplarischen Cyclodextrin-LI-Komplexes mittels GC/MS bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nur ein geringer Teil der ursprünglich eingesetzten Duftstoffmenge im Cyclodextrin gebunden war. Abhängig vom verwendeten Lösungsmittel (Aceton oder Wasser) lag diese bei 5% (Aceton) bzw. zwischen 0,04% und 0,14% (Wasser).

Zudem bestätigte sich, dass der Lösungsprozess im Wasser über einen längeren Zeitraum andauert. Dies unterstreicht die Herausforderungen bei der kontrollierten Wirkstofffreisetzung aus der Matrix.

### **3. Wesentliche Ergebnisse des Teilvorhabens**

Es konnte sowohl eine SiO<sub>2</sub>-Cyclodextrin-Matrix sowie eine SiO<sub>2</sub>-Matrix entwickelt werden, die als Trägersysteme für Duftstoffe dienen. Die Basis-Formulierungen der Matrizen zeigten bei Applikation auf verschiedene Pflanzenarten keine phytotoxischen Effekte. Auch nach Einbindung verschiedener Cyclodextrin-Duftstoff-Komplexe zeigten sich keine phytotoxischen Reaktionen. Bei Kontakt des Spritzbelags mit Wasser kam es noch nach Wochen zu einer leichten Geruchsentwicklung des komplexierten Repellents. Jedoch konnte in anschließenden double choice Versuchen mit *D. sukii* keine Langzeitwirkung über 24 Stunden hinaus nachgewiesen werden. Daher wurde die Cyclodextrin-Komplexierung mit den Repellentien verworfen und diese direkt in die SiO<sub>2</sub>-Matrix eingearbeitet. Dies führte bei höherer Duftstoff-Konzentration und direkter Applikation auf die Pflanzen zu phytotoxischen Reaktionen an diesen. Die Einbindung attraktiver Duftstoffe in die Matrizen – mit und ohne Cyclodextrin – führte weitgehend zum Verlust der Anlockwirkung gegenüber *D. sukii*. Wahrscheinlich liegt dies an der unzureichenden Einlagerung hydrophiler Substanzen in die Matrixstruktur.

Die im ursprünglich geplanten Umfang nicht realisierte GC/MS-Analyse der Abgaberate wurde durch eine Alternativuntersuchung ersetzt: Dabei wurde gezeigt, dass nach Komplexierung lediglich ein Bruchteil des Wirkstoffs tatsächlich im Cyclodextrin gebunden vorlag. Mit Aceton konnten etwa 5% der ursprünglichen Menge wieder freigesetzt werden, mit Wasser hingegen nur < 1%. Dies zeigt die deutliche Lösungsmittelabhängigkeit der Freisetzbarkeit.