

# BÖL

Bundesprogramm  
Ökologischer  
Landbau

## Biologische Kontrolle von Eulenraupen im Kohl mittels Baculoviren

Biological Control of the Cabbage Moth by Baculoviruses

FKZ: 01OE001

**Projektnehmer:**

Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum - Rheinland  
Abteilung Biotechnologischer Pflanzenschutz  
Breitenweg 71, 67435 Neustadt/Weinstraße  
Tel.: +49 6321 671-0  
Fax: +49 6321 671-222  
E-Mail: [dlr-rheinpfalz@dlr.rlp.de](mailto:dlr-rheinpfalz@dlr.rlp.de)  
Internet: <http://www.dlr.rlp.de>

**Autoren:**

Leinhos, G. M. E.; Wahl-Ermel, B. U.; Jehle, J. A.

**Herausgeberin:**

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)  
53168 Bonn  
Tel.: +49 228 6845-3280 (Zentrale)  
Fax: +49 228 6845-2907  
E-Mail: [geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de](mailto:geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de)  
Internet: [www.bundesprogramm-oekolandbau.de](http://www.bundesprogramm-oekolandbau.de)

Finanziert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz  
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL)

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> unter der BÖL-Bericht-ID 15725 verfügbar.

# **Biologische Kontrolle von Eulenraupen im Kohl mittels Baculoviren**

**Forschungsprojekt Nr. : 01OE001**

## **Abschlussbericht**

Vertragspartner, ausführende Stelle: Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) –  
Rheinpfalz  
Breitenweg 71  
67435 Neustadt/Wstr.

Projektleiter: Dr. J. A. Jehle  
Projektbearbeiter: Dr. G. M. E. Leinhos  
B. U. Wahl-Ermel

Weitere Projektpartner: Dr. N. Laun  
DLR – Rheinpfalz, Lehr- und Versuchsbetrieb  
Queckbrunnerhof

Zusammenarbeit mit anderen Stellen: Dr. Martin Knoch  
Probis – GmbH  
Daimler Straße 16/1  
75446 Wiernsheim

Laufzeit / Berichtszeitraum: 10.06.2002 bis 31.03.2004

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG DES PROJEKTES, DARSTELLUNG DES MIT DER FRAGESTELLUNG VERBUNDENEN ENTSCHEIDUNGSHILFE-/BERATUNGSBEDARF IM BMVEL .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. PLANUNG UND ABLAUF DES PROJEKTES .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND, AN DEN ANGEKNÜPFT WURDE .....</b>	<b>5</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. ANZUCHT UND VERMEHRUNG DER VERSUCHSORGANISMEN .....</b>	<b>9</b>
2.1.1. <i>Mamestra brassicae</i> .....	9
2.1.2. Vermehrung und Isolation der Baculoviren .....	9
<b>2.2. MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER VIRUSISOLATE MITTELS RESTRIKTIONSENDONUKLEASE-ANALYSE .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3. BIOASSAYS .....</b>	<b>11</b>
2.3.1. Infektion von Einzellarven durch die modifizierte <i>droplet feeding</i> -Methode .....	11
2.3.2. Infektion von Larven in Gruppen mit definierter Blattstückgröße .....	11
2.3.3. Formulierung von MbMNPV und Wirkungsprüfung .....	12
<b>2.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER BIOASSAYS .....</b>	<b>12</b>
<b>2.5. FREILANDVERSUCH .....</b>	<b>12</b>
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG UND DISKUSSION DER WICHTIGSTEN ERGEBNISSE .....</b>	<b>14</b>
3.1.1. Pathogenität von MacoNPV für <i>Mamestra brassicae</i> und Wirkungsvergleich mit MbMNPV .....	14
3.1.2. Molekulare Charakterisierung der Virusisolate .....	16
3.1.3. Temperaturabhängige Wirkung von MbMNPV und <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	18
3.1.4. Formulierung von MbMNPV und Freilandtestung .....	27
<b>3.2. NUTZUNG UND VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE FÜR DEN ÖKOLOGISCHEN LANDBAU; MÖGLICHKEITEN DER UMSETZUNG ODER ANWENDUNG DER ERGEBNISSE, INSBESONDERE ABLEITUNG VON VORSCHLÄGEN FÜR MAßNAHMEN, DIE DURCH BMVEL WEITER VERWENDET WERDEN KÖNNEN .....</b>	<b>32</b>

<b>4. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>33</b>
<b>5. GEGENÜBERSTELLUNG DER URSPRÜNGLICH GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH ERREICHTEN ZIELEN, GGF. MIT HINWEISEN AUF WEITERFÜHRENDE FRAGESTELLUNGEN .....</b>	<b>35</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>36</b>

# 1. ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG DES PROJEKTES, DARSTELLUNG DES MIT DER FRAGESTELLUNG VERBUNDENEN ENTSCHEIDUNGSHILFE-/BERATUNGSBEDARF IM BMVEL

## 1.1. PLANUNG UND ABLAUF DES PROJEKTES

Die Raupen der Kohleule (*Mamestra brassicae*) gehören sowohl im ökologischen als auch im integrierten Kohlanbau zu den wichtigsten Schädlingen. Für die Kontrolle der Kohleule und anderer Kohlschädlinge, wie der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) und der Kohlweißlinge (*Pieris*), stehen im ökologischen Anbau derzeit nur Bioinsektizide auf der Basis von *Bacillus thuringiensis* (Bt) zur Verfügung. Bt-Präparate zeigen eine gute Wirkung bei Applikation über 22°C. Bei kühler Witterung, z.B. in den Frühsätzen des Kohlanbaus, kann die Wirksamkeit gegenüber Eulenraupen jedoch stark vermindert sein. In Erwartung einer deutlichen Zunahme des ökologischen Landbaus in der Bundesrepublik wird sich in den kommenden Jahren das bestehende Kontrollproblem von Eulenraupen im Kohlanbau deutlich verstärken. Die Arbeiten im vorliegenden Forschungsprojekt nahmen Bezug zu dem im BMVEL bestehenden Beratungsbedarf zum Themenbereich F.3.2. Entwicklung von Strategien zur Regulierung bedeutsamer Schädlinge (einschl. Schnecken) im ökologischen Landbau, Teilprojekt b: Erarbeitung von Ansätzen für erfolgversprechende Strategien. Zielsetzung des Projektes war die Entwicklung und Prüfung eines biologischen Kontrollverfahrens für Kohleulenraupen mit dem eulenpathogenen Baculovirus *M. brassicae* Nukleopolyhedrovirus (MbMNPV) zur Wirkungsverbesserung von Kontrollstrategien bei kühler Witterung.

Es wurde geplant, in Laborversuchen die temperaturabhängige Wirksamkeit von MbMNPV zu bestimmen und diese mit der eines Bt-Präparates zu vergleichen. Ergänzend sollte die Wirkung eines weiteren, von einer nah verwandten Wirtsart (*Mamestra configurata*) isolierten Baculovirus (MacoNPV-A) geprüft werden. Neben der Wirkung auf die Mortalität der Eulenraupen sollte auch der temperaturabhängige Fraßschaden erfaßt werden. In vergleichenden Studien im Freiland sollte anschließend die Wirksamkeit des neu formulierten Baculovirus-Präparates mit der des Bt-Präparates in alleiniger Applikation und in Kombination verglichen werden. Dies sollte auch unter erhöhtem Befallsdruck durch künstliche Infestation mit Eulenraupen geprüft werden. Von Beginn an war geplant, die Entwicklung des Baculoviren-Präparates in Kooperation mit einer Bioinsektizidfirma

durchzuführen, um das dort vorhandene Wissen für die Präparat-Formulierung nutzen und nach Abschluß des Projektes ein den Anforderungen des ökologischen Landbaus entsprechendes Bioinsektizid für weitere Prüfungen zur Verfügung stellen zu können.

## **1.2. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND, AN DEN ANGEKNÜPFT WURDE**

Baculoviren-Präparate haben sich in vielen Kulturen als hoch wirksame Bioinsektizide erwiesen. Generell zeichnen sich Baculoviren durch ihre hohe Wirtsspezifität und Selektivität aus. Ein weiterer Vorteil der Baculoviren ist ihre dynamische Wirkung auf die Schadinsektenpopulationen, womit ein nachhaltiger Schutz der Kulturen verbunden sein kann.

In der Bundesrepublik sind im Obstbau bereits zwei Produkte auf der Basis von Baculoviren (Apfelwicklergranulosevirus (CpGV) und Apfelschalenwicklergranulosevirus (AdorGV)) zugelassen (BVL, 2004). Diese Produkte wurden zunächst ausschließlich im ökologischen Anbau verwendet, finden aber zunehmend Eingang in den integrierten Apfelanbau, sodass sich die Applikationsfläche innerhalb von vier Jahren mehr als verzehnfacht hat (Knoch, 2002). Baculoviren-Präparate werden im Obstbau (Stand 2002) auf insgesamt 8500 ha angewendet (Langenbruch, 2003). Im Gemüsebau stehen derzeit jedoch keine biologischen Präparate auf der Basis von Baculoviren zur Verfügung.

Das Nukleopolyhedrovirus der Kohleule (MbMNPV) ist seit vielen Jahren bekannt und wurde sogar als ein Hauptbegrenzungsfaktor dieses Schädling in Deutschland angesehen (Noll, 1967). Zu den für das MbMNPV suszeptiblen Schadinsekten zählen auch weitere wichtige Kohlschädlinge, wie z. B. die Kohlmotte (*P. xylostella*), die Gammaeule (*Autographa gamma*) und die Gemüseeule (*M. oleraceae*, *Lacanobia oleraceae*), weshalb MbMNPV in dieser Hinsicht einen relativ breiten Wirkungsbereich besitzt (Biache & Injac, 1988; Biache et al., 1989; Injac & Krnjajic, 1991).

Mehrere MbMNPV-Versuchspräparate wurden schon früher in der Bundesrepublik und in der ehemaligen DDR in Feldversuchen mit verschiedenen Kohlarten geprüft (Gröner, 1977; Gröner & Overbeck, 1978; Langenbruch et al., 1986; Geissler et al., 1991; Fritzsche et al., 1991). Bei niederen Aufwandmengen, d. h.  $10^{12}$  Viruseinschlußkörper (occlusion bodies = OBs) / ha, waren die Wirkungen in den meisten Fällen mit damaligen Standardinsektiziden ver-

gleichbar. Höhere Dosierungen (10fach) zeigten gleich hohe Wirkungsgrade wie die damals wirksamsten chemischen Insektizide. Die Wirkungen einer Kombination von MbMNPV mit Bt-Präparaten sowie Unterblattspritzungen mit MbMNPV können aus diesen frühen Versuchen nach heutigem Stand der Technik so gut wie nicht beurteilt werden. Denn einerseits wurden *B. thuringiensis* Stämme mit sehr geringer Wirkung gegen Eulenraupen eingesetzt, und zudem wurden die Präparate nicht alle auch als Einzelkomponenten geprüft. Andererseits war die Technik der Unterblattspritzung noch nicht hinreichend für die Versuche angepaßt (Langenbruch et al., 1986). Jüngste Untersuchungen von Wyss et al. (2003) mit dem *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Präparat 'Delfin' in kombinierter Ober- und Unterblattspritzung gegen Kohlräupen führten zu einer deutlichen Wirkungssteigerung gegenüber einer alleinigen Oberblattapplikation.

Die hohe Selektivität von MbMNPV bedingt auch, dass der zumeist in der aktuellen Feldsituation vorkommende Komplex an Schädlingen (insbesondere auch Kohlweißlinge) nicht mit dem alleinigen Ausbringen eines Baculoviren-Präparates kontrolliert werden kann. Zudem haben diese Präparate aufgrund ihres Wirkungsmechanismus eine langsame Anfangswirkung. Mortalität der Larven tritt etwa 6 Tage nach Behandlung auf, bis dahin kann ein deutlicher Fraßschaden durch die Larven erfolgen. Deshalb ist die Kombination von MbMNPV mit einem Bt-Präparat basierend auf dem auch verstärkt gegen Eulenraupen wirkenden *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* Stammes besonders interessant für den ökologischen Kohlanbau. Die Interaktion der Präparate bei kombinierter Anwendung ist jedoch noch nicht detailliert in Freilanduntersuchungen erfaßt. Im Bioassay mit *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* und einem Baculoviren-Präparat (*Spodoptera exigua* Nukleopolyhedrovirus, SeMNPV) wurden abhängig von den eingesetzten Konzentrationen sowohl antagonistische wie auch synergistische Interaktionen festgestellt (Geervliet et al., 1991). Peters und Coaker (1993) beobachteten eine gesteigerte Anfälligkeit besonders von älteren Raupen des Großen Kohlweißlings (*Pieris brassicae*) gegenüber *Pieris brassicae* Granulovirus, wenn dieses mit niederen Konzentrationen eines Insektizides oder eines Bt-Präparates (*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*) appliziert wurde. Die erhöhte Anfälligkeit wurde auf eine pH-Wertverschiebung im Darm der Larven zurückgeführt. Ähnliche Wirkungsweisen wurden in verschiedenen Wirt-Baculovirus-Interaktionen mit Bt-Präparaten festgestellt (Salama et al., 1993; Sun, 1993; Sun et al., 1993; Srinivisan et al., 1994; Rabindra und Jayaraj, 1994; Pingel und Lewis, 1999). Unterschiedliche Effekte ergaben die Kombination eines Baculoviren-Präparates (*Spodoptera frugiperda*

MNPV) mit dem neuen Insektizid Spinosad (Mendez et al., 2002), das einen Metaboliten eines bodenbürtigen Actinomyceten beinhaltet und z. B. in der Schweiz im ökologischen Anbau unter dem Produktnamen Audienz zugelassen ist.

Auf der Basis des MbMNPV wurde das kommerzielle Produkt MAMESTRIN durch Calliope (später Natural Plant Protection, NPP) entwickelt (Gullion, 1987) und 1993 in Frankreich zugelassen (Huber, 1998). Von MAMESTRIN ist u. a. auch eine Wirkung gegen *P. xylostella* bekannt (Knowles, 2001). Das Produkt wurde als Flüssigkonzentrat formuliert, welches sowohl einen Schutz für die Viruseinschlußkörper gegen UV-Strahlung als auch ein Fraßstimulanz enthielt. Alle Bestandteile waren biologisch abbaubar. MAMESTRIN wird jedoch derzeit und in naher Zukunft nach Auskunft der Firma nicht vermarktet (Bonhomme, persönl. Mitteilung). Deshalb war die Herstellung eines (neuen) formulierten Präparates im Rahmen dieses Projektes notwendig.

Andererseits wird derzeit in Kanada ein Bioinsektizid zur Kontrolle von *Mamestra configurata* mit dem Baculovirus MacoNPV entwickelt. Dieses Virus ist genetisch relativ nah verwandt mit *Spodoptera exigua* NPV, das unter dem Namen Spod-X eine Zulassung zur Kontrolle von *S. exigua* in den Niederlanden besitzt. Infektionsstudien haben gezeigt, dass *M. configurata* suszeptibel für MbMNPV ist (Erlandson, 1990). Die Infektiosität von MacoNPV für Larven von *M. brassicae* wurde bisher allerdings noch nicht untersucht. Das MacoNPV wurde mittlerweile sehr gut genetisch und molekular charakterisiert (Li et al., 1997; Li et al., 2002a und 2002b). Da MacoNPV ein großes Potential als Bioinsektizid in Kanada besitzt, wäre bei einer entsprechenden Wirkung auf *M. brassicae* eine größere Marktchance absehbar. Daher wurde in den vorliegenden Untersuchungen die Suszeptibilität von *M. brassicae* Larven gegenüber MacoNPV geprüft.

Der Einfluss der Temperatur auf die Wirkung von peroral aufzunehmenden Bioinsektiziden wie Bt- oder Baculoviren-Präparaten ist unter zwei Aspekten zu berücksichtigen: einerseits sinkt die Fraßaktivität der Larven bei niederen Temperaturen und damit die aufgenommene Menge bzw. die Aufnahmewahrscheinlichkeit; andererseits nimmt die physiologische Aktivität der Larven bei sinkenden Temperaturen ab und damit auch die Wirkung der Bioinsektizide. Für das Apfelwicklergranulosevirus (CpGV) und *Cydia pomonella* (L1-Larven) wurde in eigenen Untersuchungen eine enge Korrelation von Temperatur und Wirkgeschwindigkeit

festgestellt. Diese Abhängigkeit korrelierte jedoch nicht über den gesamten Temperaturbereich mit der Entwicklungsgeschwindigkeit der Larven (Steinecke et al., 2002).

Aus Feldbeobachtungen ist die geringere Wirksamkeit von Bt-Präparaten bei niederen Temperaturen bekannt. Andererseits wurde 1998 ein erster Feldversuch zur biologischen Kontrolle von *M. brassicae* auf dem Versuchsbetrieb Queckbrunnerhof (DLR Rheinpfalz) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jehle durchgeführt, der sehr viel versprechende Ergebnisse zeigte. Trotz kühler Witterung (Durchschnittstemperatur 16°C) konnte eine synergistische Wirkung der kombinierten Applikation eines Bt- und MbMNPV- Präparates (MAMESTRIN) mit einem Wirkungsgrad von 74% nachgewiesen werden (Prestele et al., 1998). Deshalb wurde in dem vorliegenden Projekt schwerpunktmäßig die Wirkung von MbMNPV bei niederen Temperaturen systematisch untersucht.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. ANZUCHT UND VERMEHRUNG DER VERSUCHSORGANISMEN

#### 2.1.1. *Mamestra brassicae*

Für die Vermehrung der Baculoviren, die Bioassays und die Freilandversuche wurde eine *M. brassicae*-Zucht am DLR Rheinpfalz in Neustadt/Wstr. etabliert. Ausgangsmaterial für die Zucht waren Eier aus einer *Mamestra*-Kolonie, die uns von Dr. M. Hommes (BBA Braunschweig) überlassen wurden. Die Etablierung erfolgte in Anlehnung an die Zuchtmethodik der BBA Braunschweig, wobei für Eiablage, Larvenschlupf und -anzucht Kohlbätter von Gewächshauspflanzen verwendet wurden.

Für die Massenvermehrung von *M. brassicae* wurden die Larven auf künstlichem Medium gehalten (Ivaldi-Sender (1974) in Undorf, 1991). Je nach Larvenstadium wurden dicht schließende Runddosen oder größere Rechteckdosen mit aufgelegtem Deckel aus klarem Polystyrol (Licefa) verwendet. Zum Verpuppen der Larven wurde ab Ende L6-Stadium eine Schicht trockene Erde (TKS 1) in die Dosen gefüllt. Für Paarung und Eiablage wurden die Falter in Rechteckdosen gehalten, die mit Polyethylenfolie ausgelegt waren. Die Zucht erfolgte in einer Klimakammer bei 22-24°C (Tag/Nacht-Rhythmus: 16h/8h) mit einer Zyklusdauer von ca. 40 Tagen.

#### 2.1.2. Vermehrung und Isolation der Baculoviren

Die Untersuchungen erfolgten mit dem MbMNPV Isolat 218 der BBA Darmstadt sowie mit dem MacoNPV Isolat 90/2 (MacoNPV-A) von M. Erlandson, Kanada. Für die Virusvermehrung wurden *M. brassicae* L3-Larven in Gruppen von 20 Larven mit oberflächlich kontaminierten Wirsing-Blättern (Sorte Tasmania, S&G, Syngenta Seeds GmbH) aus Gewächshausanzucht oder mit kontaminiertem künstlichen Medium gefüttert. Die Sprühapplikation auf Blätter oder Medium erfolgte mit einer Konzentration von ca.  $10^7$  OBs/ml. Nach 24-48 h wurden die Larven in frische Petrischalen bzw. Klarsicht-Kunststoffbecher transferiert, mit frischen, nicht kontaminierten Blättern bzw. Medium gefüttert und weiterhin im Inkubator bei 22-24°C und Tag/Nacht-Rhythmus (16h/8h) kultiviert. Absterbende Larven

wurden 8-12 Tage nach Infektion (kurz vor dem Zerfließen) gesammelt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und tiefgefroren (-20°C) bis zur Aufarbeitung gelagert.

Zur Verminderung einer bakteriellen Kontamination wurden alle Schritte der Virusisolierung soweit möglich im Eisbad bzw. bei 10°C durchgeführt. Die Larven wurden in 0,5%igem SDS aufgenommen, mit einer Schere grob zerkleinert und homogenisiert (WHEATON-Potter-Elvehjem Gewebe-Homogenisator). Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Homogenat über ein Mull-Watte-Mull-‘Sandwich’ filtriert und mit 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0) nachgespült. Nach Ultraschall (2 x 3 min) wurde das Filtrat abzentrifugiert (3.200 g, 30 min, 10°C), das Pellet in einem entsprechenden Volumen Tris-Puffer resuspendiert und über ein Saccharosebett (50%, w/w) zentrifugiert (41.000 g, 90 min, 15°C). Das Pellet wurde zweimal mit H<sub>2</sub>O bidest. gewaschen (Zentrifugation bei 6.300 g, 30 min, 10°C) und anschließend in H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen. Die Konzentration der OBs wurde mittels Auszählen in einer Petroff-Hauser-Zählkammer bestimmt. Die Virussuspensionen wurden in 100 µl Portionen (Stammsuspension) bzw. in 25 ml Volumen (Feldvermehrung) bei -20 oder -80°C tiefgefroren. Die im Vergleich zu anderen Autoren vereinfachte Methode der Aufreinigung über Saccharosebett anstelle eines Saccharosegradienten lieferte ein gut gereinigtes Präparat an NPV-OBs. Für die Freilandtestung wurden Virussuspensionsmengen für ca. 500 m<sup>2</sup> (MbMNPV) bzw. 200 m<sup>2</sup> (MacoNPV) produziert (berechnet für eine angenommene Applikationskonzentration von 1x10<sup>8</sup> OBs/m<sup>2</sup> bzw. 1x10<sup>12</sup> OBs/ha).

## **2.2. MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DER VIRUSISOLATE MITTELS DNA-RESTRIKTIONSENDONUKLEASE-ANALYSE**

Die Virionen wurden durch Inkubation mit 0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> bei 37°C (30 min) aus den OBs gelöst. Anschließend wurde die Suspension mit 1 M HCl auf pH 8,0 eingestellt. Vor der DNA-Extraktion wurde die Lösung mit RNase A (45 µg/ml) für 10 min und 37°C und anschließend mit 1% SDS und Proteinase K (250 µg/ml) für 1,5 h gleichfalls bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde dann zweimal mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde dreimal gegen TE-Puffer (pH 8,0) dialysiert.

Die Konzentration an viraler DNA wurde im Photometer bestimmt. Für Verdaus mit Restriktions-Endonukleasen wurden jeweils 600 ng DNA eingesetzt. Als Endonukleasen wurden *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *BglII*, *KpnI*, *SmaI*, *XhoI* und *PstI* nach den vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen verwendet. Die DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

## 2.3. BIOASSAYS

### 2.3.1. Infektion von Einzellarven durch eine modifizierte *droplet feeding*-Methode

Die letale Dosis (LD) von MacoNPV für *M. brassicae* wurde mit einer modifizierten *droplet feeding*-Methode bei 22°C nach 7 Tagen Inkubation bestimmt. Hierfür wurde 1 µl Suspension mit 0, 100, 1.000, 5.000, 10.000, 15.000 und 20.000 OBs auf ca. 6 mm<sup>2</sup> große Kohlblattstückchen (Wirsing, Sorte Tasmania) an Einzellarven im L2-Stadium in 24-Loch-Mikrotiterplatten für 24 h verfüttert. Die weitere Inkubation erfolgte in Gruppen von 4 Larven und frischem, nicht kontaminiertem Blattmaterial. Die Anzahl Larven je getesteter Dosis wurde 48 h nach Infektion bestimmt und somit Larven ausgeschlossen, die nicht gefressen hatten bzw. durch den Transfer geschädigt waren. Der Bioassay wurde täglich auf Mortalität ausgewertet. Der Versuchsansatz wurde insgesamt zweimal (mit ca. 24 bzw. 48 Larven je Dosis) innerhalb zwei Wochen durchgeführt.

### 2.3.2. Infektion von Larven in Gruppen mit definierter Blattstückgröße

Wässrige Suspensionen von MbMNPV, MacoNPV bzw. XenTari® (*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, Abbott/Bayer) wurden mit einem Glas-Chromatographie-Sprüher auf 875 mm<sup>2</sup> große Blattstückchen von Wirsing-Jungpflanzen appliziert. Als Netzmittel enthielten die Virussuspensionen 0,025% Citowett (Isooctylphenol-ethoxylat, Lutensol, AP6, BASF). Die Larven im L2-Stadium wurden in Gruppen von 10 Larven/Petrischale (Durchmesser 5,5 cm) einmalig mit einem kontaminierten Blattstückchen bei 24°C während 24 h infiziert. Anschließend wurde mit nicht kontaminierten frischen Blattstückchen gleicher Größe gefüttert und bei Temperaturen von 12, 16, 20 oder 24°C inkubiert. Geprüft wurde im Konzentrationsbereich von  $3 \times 10^3$  bis  $3 \times 10^9$  OBs/ml in halb logarithmischer Abstufung mit mindestens 6 Konzentrationen/Inkubationstemperatur. Die Auswertung erfolgte täglich durch

Bestimmen der Überlebensrate und durch Bonitur der gefressenen Blattfläche (Fraßschaden). Die Wirkungsgradberechnung für Mortalität und Fraßschaden erfolgte nach Abbott (1925).

### 2.3.3. Formulierung von MbMNPV und Wirkungsprüfung

OBs von MbMNPV wurden jeweils mit Citowett als Standard oder mit einer Neuformulierung der Probis GmbH (hier als "Formulierung" bezeichnet) gemischt und als 0,025%ige Citowett- bzw. 0,03%ige formulierte Suspension mit  $1,25 \times 10^6$  OBs/ml auf definierte Blattstückgrößen appliziert (siehe zuvor). Je Variante wurden 30 (Versuch 1) bzw. 40 Larven (Versuch 2 und 3) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 7 Tage bei 24°C. Als Kontrolle dienten hierbei die jeweiligen Leerformulierung (0,025% Citowett oder 0,03% Formulierung). Die Auswertung erfolgte täglich wiederum durch Bestimmen der Überlebensrate und durch Bonitur der gefressenen Blattfläche. Der Fraßschaden wurde durch Aufsummierung der gefressenen Blattfläche je Variante und Versuchsdauer (kumulativer Fraß) ermittelt.

## 2.4. STATISTISCHE AUSWERTUNG DER BIOASSAYS

Die Bioassays zur Pathogenitätsprüfung sowie zur temperaturabhängigen Wirkung wurden mittels Probit-Analyse nach Finney mit SAS-Software (release 8.2) analysiert. Als Datenbasis für die Schätzung der LD- bzw. LC-Werte (letale Konzentration) dienten entweder die Datensätze der Einzelversuche oder die der Mittelwerte aus mindestens drei Versuchsreihen einer Inkubationstemperatur. Die natürliche Mortalität wurde im Bioassay in den nur mit 0,025% Citowett behandelten Kontroll-Bioassays bestimmt. Die Versuchsergebnisse wurden nach der Formel von Abbott (1925) korrigiert.

## 2.5. FREILANDVERSUCH

Im Herbst 2002 und Frühjahr 2003 (Gewächshaus) wurde in Vorversuchen die künstliche Infestation von Kohlrabipflanzen mit *M. brassicae* Eigelegen geprüft. Anschließend wurden drei Freilandversuche in Kohlrabi (Sorte Korist, Bejo) auf dem Versuchsbetrieb Queckbrunnerhof (DLR Rheinpfalz, Schifferstadt) in randomisierter Blockanlage mit vier Wiederholungen und einer Parzellengröße von  $1,66 \times 5 \text{ m}^2$  (4 Reihen á 15 Pflanzen) angelegt.

Aufgrund der extrem heißen Witterung 2003 war jedoch nur ein Versuch auswertbar, der im Folgenden dargestellt wird.

Mit Ausnahme der Schädlingsbekämpfung erfolgten alle Kulturmaßnahmen einschließlich Beregnung betriebsüblich. Die künstliche Infestation mit *M. brassicae* erfolgte an je 5 Pflanzen in den Mittelreihen der Parzellen. Es wurde je ein Eigelege mit ca. 25 Eiern (schwarze Kopfkapsel sichtbar)/Pflanze auf ein als Dreieck gefaltetes Schlitz-Etikett montiert und an das 3. Laubblatt (gezählt von unten) der Kohlrabipflanzen gehängt. Die Behandlungsvarianten sind im **ERGEBNISTEIL** aufgelistet.

Der Versuch wurde in folgender Zeitabfolge durchgeführt:

Pflanzung: 05.08.2003

Infestation: 20.08.2003 (4-5 Blatt-Stadium)

Applikation: 26.08.2003 (L2-Stadium der Larven)

Auswertung: 1 h vor Applikation sowie 6, 8 und 14 Tage nach Applikation

Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Anzahl lebender Larven und Bonitur des Fraßschadens an den infestierten Pflanzen und nach dem Abwandern von L3-Larven auch an den Nachbarpflanzen. Die Überlebensraten wurden auf signifikante Unterschiede mittels Tukey-Test ( $p = 0,05$ ) nach einfaktorieller Varianzanalyse (SAS software) geprüft.

Während der Versuchsdauer herrschten folgende Temperaturen (20 cm ü. Boden):

Zeitraum (2003)	Mittelwert (°C)	Minimum (°C)	Maximum (°C)
2. Dek. August	24,2	12,6	40,1
3. Dek. August	20,0	9,9	34,0
1. Dek. Sept.	16,2	5,1	30,5
2. Dek. Sept.	16,5	6,5	33,9

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG UND DISKUSSION DER WICHTIGSTEN ERGEBNISSE

##### 3.1.1. Pathogenität von MacoNPV-A für *Mamestra brassicae* und Wirkungsvergleich mit MbMNPV

MacoNPV-A wurde in zwei Versuchen mit einer modifizierten *droplet feeding*-Methode an *M. brassicae* verfüttert, um eine Aussage über die tatsächlich wirksame Virusdosis treffen zu können. In den Versuchen wurden unterschiedlich alte L2-Larven eingesetzt, weshalb die Versuche getrennt ausgewertet wurden (Tab.1). Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass MacoNPV-A auch für *M. brassicae* pathogen ist. Die LD<sub>50</sub>-Werte betragen 2069 OBs (Versuch 1, L2-Larven bei Versuchsansatz noch z.T. in Häutung) und 3195 OBs (Versuch 2, Larven ca. 24 h älter). Erlandson (1990) ermittelte eine LD<sub>50</sub> von 20 OBs für *M. configurata* L1-Larven 10 Tage nach Infektion mit MacoNPV bei 21°C. Evans (1981) zeigte, dass die LD<sub>50</sub>-Werte von MbMNPV für *M. brassicae* L2-Larven etwa um den Faktor 100 höher als für L1-Larven lagen. Obwohl in jedem Bioassay eine andere Methodik eingesetzt wurde, kann – bei aller Vorsicht – eine ähnliche Empfindlichkeit von *M. brassicae* und *M. configurata* für MacoNPV angenommen werden.

Tabelle 1: Letaldosis (LD) von MacoNPV-A für *M. brassicae* (L2) am Tag 7 nach Infektion. Die Bioassays wurden mit Wirsingblattstückchen bei 22°C durchgeführt. Der Versuch 2 wurde mit ca. 24 h älteren Larven als Versuch 1 angesetzt. Die LD-Werte wurden mittels Probit-Analyse (SAS Institute, 2001) bestimmt.

<b>Versuch 1</b>	<b>OBs/Larve</b>	<b>95 % Vertrauensgrenzen</b>
LD <sub>10</sub>	34	1 - 520
LD <sub>50</sub>	2069	15 - 8129
LD <sub>90</sub>	$1,2 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$ - $6,4 \times 10^6$
<b>Versuch 2</b>		
LD <sub>10</sub>	166	44 - 371
LD <sub>50</sub>	3195	1984 - 4784
LD <sub>90</sub>	$6,1 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$ - $1,6 \times 10^5$

Zum Vergleich der Virulenz der beiden Isolate MacoNPV-A und MbMNPV gegenüber *M. brassicae* Larven wurde die mittlere Letalkonzentration (LC<sub>50</sub>) bestimmt (Tab. 2). Die LC<sub>50</sub> von MbMNPV für L2-Larven lag mit  $9,2 \times 10^4$  OBs/ml um den Faktor 4 höher als die von MacoNPV mit  $2,3 \times 10^4$  OBs/ml. Aus dem Vergleich der Vertrauensgrenzen sowie der Steigung der Wirkungsgeraden kann jedoch geschlossen werden, dass sich die Baculoviren in ihrer Virulenz gegenüber *M. brassicae* bei 24°C nicht signifikant unterscheiden. Auch anhand der grafischen Darstellung der Wirkungsgeraden wird deutlich, dass die biologische Aktivität von MacoNPV-A und MbMNPV annähernd identisch ist (Abb.1). Erlandson (1990) fand keine signifikanten Unterschiede zwischen den LD<sub>50</sub>-Werten von zwei MbMNPV-Isolaten aus den Niederlanden und einem MacoNPV-B-Isolat (MacoNPV-86/1) für *M. configurata* L1-Larven. Nur das MbMNPV-Isolat aus Deutschland war in diesen Untersuchungen signifikant weniger virulent.

Tabelle 2: Letalkonzentrationen (LC) von MacoNPV-A und MbMNPV für *M. brassicae* (L2) am Tag 8 nach Infektion. Die Bioassays wurden mit Wirsingblattstückchen bei 24°C durchgeführt. Die LC-Werte wurden mittels Probit-Analyse (SAS Institute, 2001) bestimmt.

<b>Virus</b> LC	<b>OBs/ml</b>	<b>95 % Vertrauensgrenzen</b>	<b>Steigung</b> <b>(Standardfehler)</b>
<b>MacoNPV-A</b>			
LC <sub>10</sub>	335	$1,0 - 2,8 \times 10^3$	0,704
LC <sub>50</sub>	$2,3 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3 - 7,1 \times 10^4$	(0,1389)
LC <sub>90</sub>	$1,5 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5 - 8,7 \times 10^7$	
<b>MbMNPV</b>			
LC <sub>10</sub>	1196	$2,6 \times 10^2 - 3,1 \times 10^3$	0,678
LC <sub>50</sub>	$9,2 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4 - 1,5 \times 10^5$	(0,0806)
LC <sub>90</sub>	$7,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6 - 2,8 \times 10^7$	

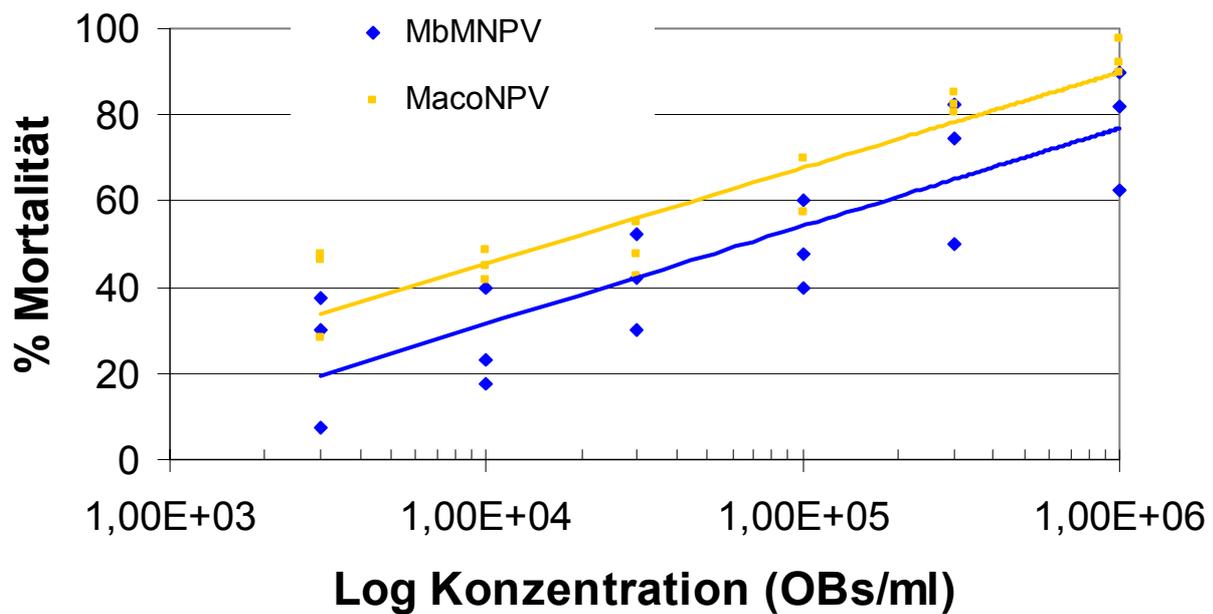


Abbildung 1: Konzentrations-Wirkungsgeraden von MbMNPV und MacoNPV-A für *M. brassicae* (L2) acht Tage nach Infektion im Blatt-Bioassay bei 24°C.

### 3.1.2. Molekulare Charakterisierung der Virusisolate

Da das in diesen Versuchen verwendete MbMNPV-Isolat bisher noch nicht molekular charakterisiert worden ist, wurde die Virus-DNA isoliert und mit 8 Restriktionsendonukleasen (REN) verdaut und gelelektrophoretisch analysiert (Abb. 2). In einem Vergleich mit publizierten Restriktionsprofilen von MbMNPV-Isolaten aus Deutschland, den Niederlanden und Frankreich zeigte das hier verwendete Isolat mit den beschriebenen niederländischen Isolaten die größte Ähnlichkeit (Possee und Kelly, 1988; Erlandson, 1990; Figueiredo et al., 1999; Rovesti et al., 2000).

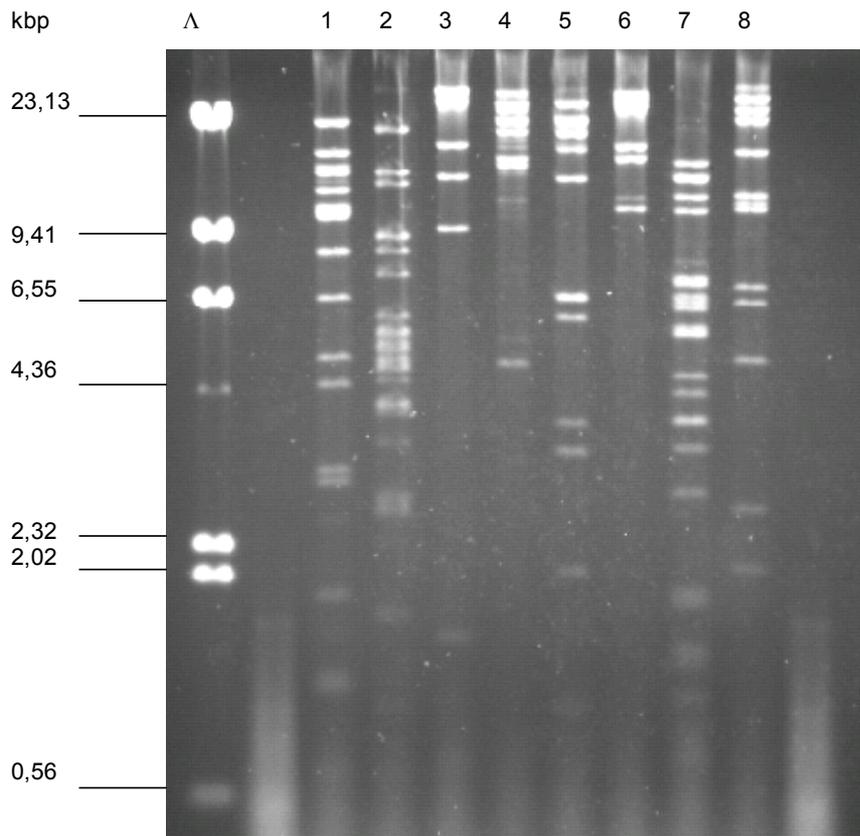


Abbildung 2: Restriktionsprofile für MbMNPV-DNA (Isolat 218, BBA Darmstadt) für die Endonukleasen *EcoRI* (1), *HindIII* (2), *BamHI* (3), *BglII* (4), *KpnI* (5), *SmaI* (6), *XhoI* (7) und *PstI* (8). Als Längenstandards sind die  $\lambda$ -DNA *HindIII* Fragmente aufgetragen.

Übereinstimmend mit den Untersuchungen von Erlandson (1990) waren die REN-Profile von MacoNPV 90/2 (MacoNPV-A) und MbMNPV für *PstI*, *BamHI* und *XhoI* deutlich verschieden (Abb.3). Andererseits zeigten vertiefte phylogenetische Untersuchungen von MacoNPV-A und MbMNPV, dass beide Viren sehr nah mit einander verwandt sind (Lange und Jehle, unveröffentlicht). Aufgrund der hohen Verwandtschaft und der sehr ähnlichen biologischen Aktivität der beiden Virusisolate wurde die temperaturabhängige Wirkung der Virusinfektion in den folgenden Versuchen nur mit MbMNPV geprüft.

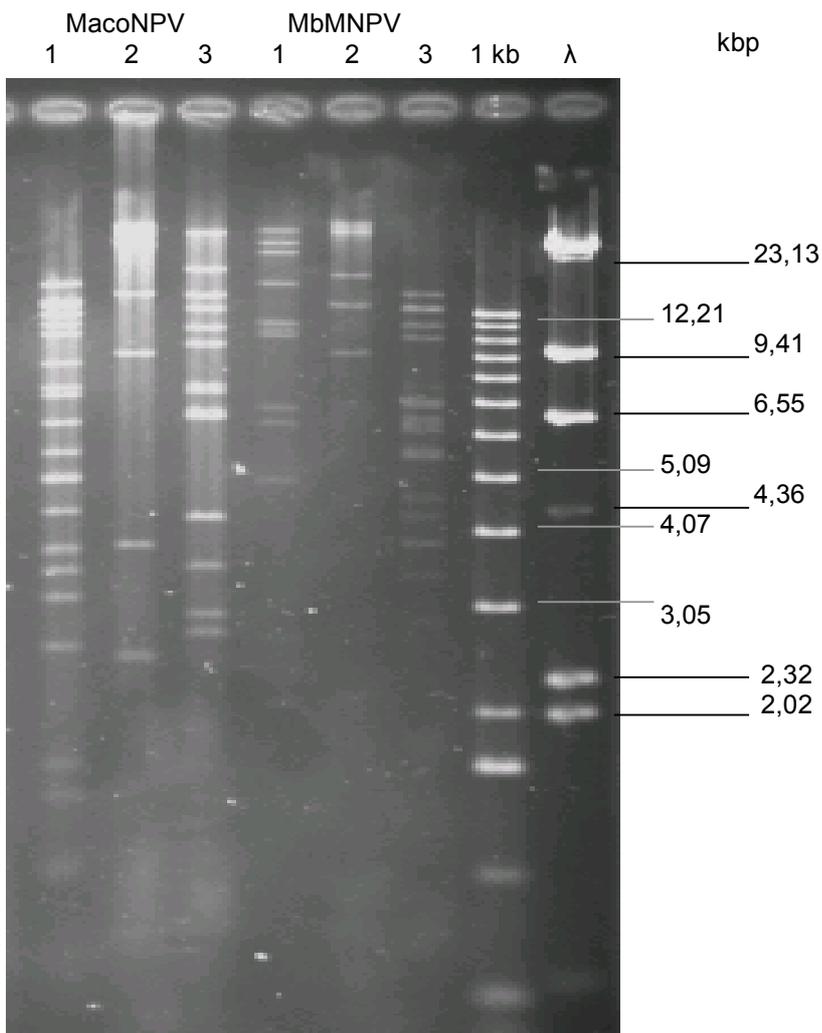


Abbildung 3: Restriktionsprofile der isolierten DNA von MbMNPV (Isolat 218 der BBA Darmstadt) und MacoNPV-A (90/2) für die Endonukleasen *Pst*I (1), *Bam*HI (2) und *Xho*I (3). Als Längenstandards sind die  $\lambda$ -DNA *Hind*III Fragmente und die 1-kb-Fragment-Leiter aufgetragen.

### 3.1.3. Temperaturabhängige Wirkung von MbMNPV und *Bacillus thuringiensis*

#### 3.1.3.1. Einfluss auf die Mortalität

Um die physiologische Wirkung der Bioinsektizide unabhängig von der Aufnahmezeit bei unterschiedlichen Temperaturen zu untersuchen, wurden die *M. brassicae* Larven in allen folgenden Versuchsansätzen 24 h bei 24°C mit kontaminierten Blattstückchen infiziert und dann bei 24, 20, 16 oder 12°C weiter inkubiert. Die biologischen Kontrollagenzien *B. thuringiensis* (Bt) und MbMNPV unterscheiden sich wesentlich in ihrer Wirkungsweise und Wirkge-

schwindigkeit. Während die toxische Wirkung von Bt zum Fraßstop und schnellem Absterben der Larven führt, sterben die Larven nach MbMNPV-Infektion erst nach einer massiven Virusvermehrung im Wirt ab. Für den direkten Vergleich im Bioassay wurde für Bt das formulierte Produkt XenTari® in der Feldkonzentration (bezogen auf 400 L Wasseraufwandmenge je ha, entspricht 0,25% Produkt) eingesetzt.

Für MbMNPV wurde eine Referenzkonzentration anhand der ersten Konzentrations-Wirkungsprüfungen (Tab. 2) von  $1 \times 10^6$  OBs/ml gewählt, die annähernd der  $LC_{90}$  beider Baculovirusisolate für L2-Larven nach 8 Tagen bei 24°C entspricht. Diese Konzentration wurde auch in allen weiteren Bioassays mit unterschiedlichen Inkubationstemperaturen eingesetzt. Im Vergleich zu der tatsächlich eingesetzten Feldkonzentration von  $10^{12}$  OBs/ha (bezogen auf 400 L Wasseraufwandmenge; siehe Freilandversuch) lag sie um den Faktor 2,5 niedriger. In Abbildung 4 ist der Wirkungsverlauf von Bt und MbMNPV in den entsprechenden Konzentrationen bei 24 und 16°C wiedergegeben.

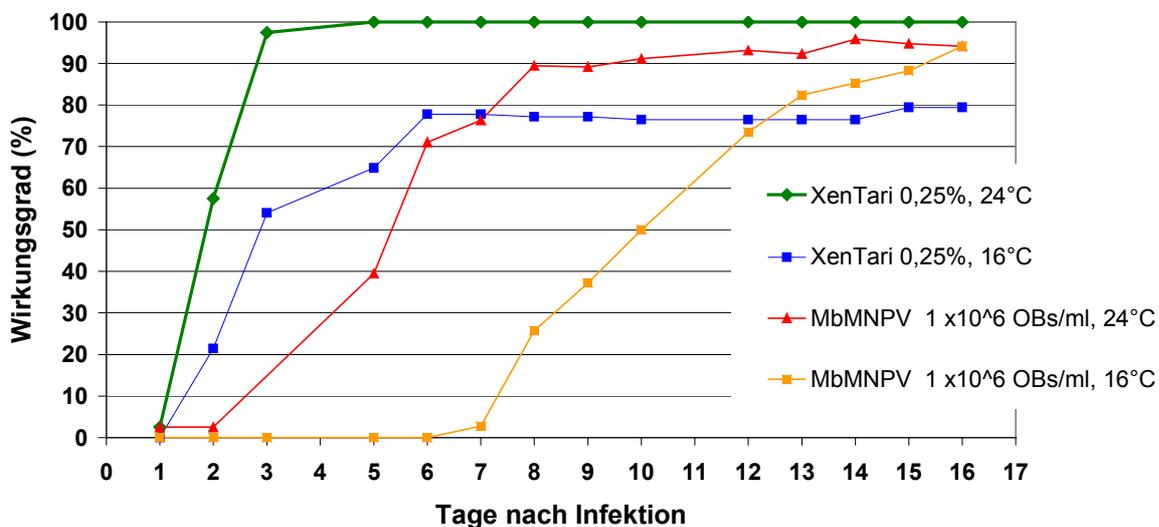


Abbildung 4: Temperatur-Zeit abhängiger Wirkungsverlauf von *Bacillus thuringiensis* (XenTari®) und MbMNPV auf die Mortalität von *M. brassicae* (L2-Larven) bei 24 und 16°C.

Die erwartete gute Bt-Wirkung bei 24°C konnte mit einem Wirkungsgrad bzgl. Larvenmortalität von annähernd 100% nach 3 Tagen bestätigt werden. Jedoch wies Bt bei der niedrigeren Inkubationstemperatur von 16°C mit 80% den niedrigsten Wirkungsgrad bei Versuchsende (16 Tage nach Behandlung) auf. Der Wirkungsgrad von MbMNPV betrug sowohl für 24°C als

auch 16°C zu diesem Termin ca. 95%. Die entsprechende Wirkungsgeschwindigkeit für die einzelnen Behandlungsvarianten charakterisiert durch die geschätzte mittlere Letalzeit (LT<sub>50</sub>-Werte) betrug ca. 2 Tage (Bt, 24°C), 3 Tage (Bt, 16°C), 5,5 Tage (MbMNPV, 24°C) und 10 Tage (MbMNPV, 16°C). Die langsamere MbMNPV Wirkung führte zwar zu einem höheren Fraßschaden durch Junglarven (L2-L4-Stadium). Da jedoch die größte Blattmenge durch die älteren Larvenstadien konsumiert wird (vgl. Abb. 6), ist anzunehmen, dass die höhere Überlebensrate der Larven in der Bt-Behandlung bei 16°C insgesamt zu einem größeren Fraßschaden im Freiland führt. Zusätzlich ist bei diesem direkten Bt – MbMNPV – Wirkungsvergleich zu berücksichtigen, dass die Versuchsbedingungen in dem Bioassay (Infektionstemperatur 24°C und Applikation in Feldkonzentration) die Wirkungseffizienz von Bt favorisieren.

In den nachfolgenden Versuchen wurde die konzentrations- und temperaturabhängige Wirkung von MbMNPV auf die Mortalität von *M. brassicae* L2-Larven ermittelt. Die Wirkung von MbMNPV war bei allen getesteten Inkubationstemperaturen deutlich konzentrationsabhängig (Tab. 3). Die LC<sub>50</sub>-Werte bei den Inkubationstemperaturen 20°C und 24°C unterschieden sich bezogen auf die Vertrauensgrenzen nicht signifikant. Für 16°C lag die mittlere Letalkonzentration 100fach höher, für 12°C 1000fach höher im Vergleich zu 20°C.

Die LC<sub>90</sub> betrug bei 12°C acht Tage nach Infektion  $4 \times 10^{10}$  OBs/ml, was zu einem deutlichen weißen Spritzbelag auf den Blättern führen würde. Die geringen Wirkungsunterschiede von MbMNPV bei 20 und 24°C könnten dadurch bedingt sein, dass möglicherweise mit 24°C der Optimumsbereich für die Larvenentwicklung überschritten worden ist (Johansen, 1997). Auch führte eine Larvenanzucht bei 24°C zur Induktion der Diapause (Dr. M. Hommes, BBA; persönliche Mitteilung, Juni 2002).

Die grafische Darstellung des Wirkungsgrades von MbMNPV acht Tage nach Infektion gibt die geringen Unterschiede in der Überlebensrate von *M. brassicae* bei 24°C bzw. 20°C wieder (Abb. 5). Der Wirkungsgrad der Referenzkonzentration von  $1 \times 10^6$  OBs/ml betrug bei 24°C bzw. 20°C ca. 75%, während er bei 16°C und 12°C stark vermindert war (ca. 20 bzw. 5%).

Tabelle 3: Temperaturabhängigkeit der Letalkonzentrationen (LC) von MbMNPV für *M. brassicae* (L2) am Tag 8 nach Infektion. Die Blatt-Bioassays wurden bei 12 (4 Versuche), 16, 20 und 24°C (je 3 Versuche) durchgeführt. Die Mortalität in den Kontrollen lag bei 1,5 – 8,3%.

Inkubations-temperatur	LC	OBs/ml	95 % Vertrauensgrenzen	Steigung (Standardfehler)
24°C	LC <sub>10</sub>	$1,1 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2 - 3,1 \times 10^3$	0,678
	LC <sub>50</sub>	$9,2 \times 10^4$	$5,5 \times 10^4 - 1,5 \times 10^5$	(0,0806)
	LC <sub>90</sub>	$7,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6 - 2,8 \times 10^7$	
20°C	LC <sub>10</sub>	$2,1 \times 10^4$	$5,2 \times 10^2 - 5,6 \times 10^4$	0,722
	LC <sub>50</sub>	$1,2 \times 10^5$	$6,7 \times 10^4 - 2,1 \times 10^5$	(0,0680)
	LC <sub>90</sub>	$7,4 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6 - 1,6 \times 10^7$	
16°C	LC <sub>10</sub>	$4,4 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4 - 1,5 \times 10^6$	0,937
	LC <sub>50</sub>	$1,0 \times 10^7$	$4,1 \times 10^6 - 2,1 \times 10^7$	(0,1573)
	LC <sub>90</sub>	$2,3 \times 10^8$	$8,4 \times 10^7 - 2,3 \times 10^9$	
12°C	LC <sub>10</sub>	$2,9 \times 10^6$	$9,6 \times 10^5 - 6,5 \times 10^6$	0,668
	LC <sub>50</sub>	$3,3 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8 - 5,5 \times 10^8$	(0,0556)
	LC <sub>90</sub>	$3,9 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10} - 1,2 \times 10^{11}$	

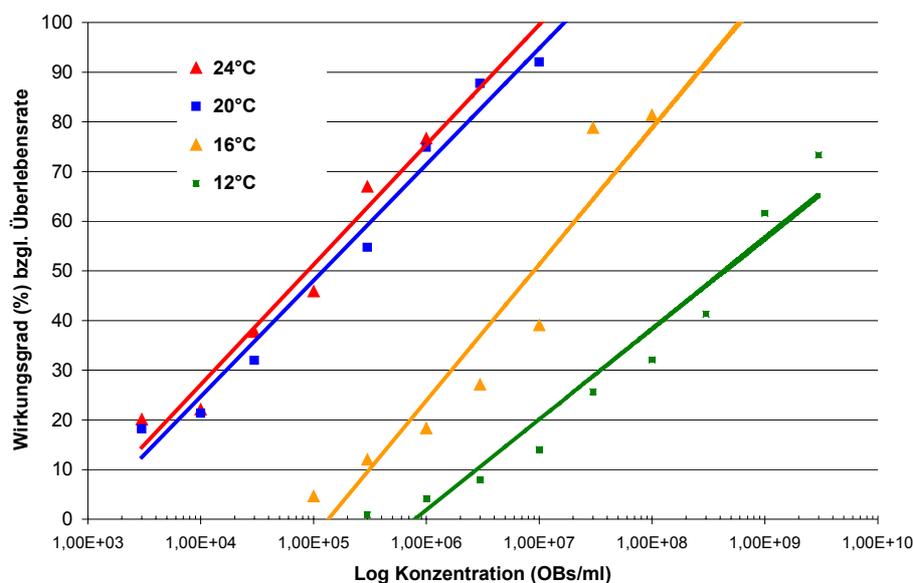


Abbildung 5: Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit des Wirkungsgrades von MbMNPV auf die Überlebensrate von *Mamestra brassicae* L2-Larven 8 Tage nach Infektion.

### 3.1.3.2. Einfluss auf den Fraßschaden (gefressene Blattfläche im Bioassay)

Erwartungsgemäß war der durch *M. brassicae* verursachte Fraßschaden deutlich temperaturabhängig. Beispielsweise waren zwölf Tage nach Versuchsbeginn von nicht infizierten Larven bei 24°C die 8fache bzw. 4fache Blattmenge konsumiert worden als bei 12°C bzw. 16°C (Abb.6A). Schon eine 4°C niedrigere Inkubationstemperatur (20°C) verminderte die gefressene Blattfläche auf annähernd die Hälfte. Allerdings hatten die Larven bei 24°C nach 12 Tagen schon das L4- bzw. L5-Stadium erreicht, während bei den niedrigeren Temperaturen die Larvenentwicklung verzögert war.

Betrachtet man dagegen den Gesamtfraßschaden, der bis zur Verpuppung der Larven entstand, so lag dieser bei 16°C etwa 40% höher als bei 24°C (Abb. 6B). Bei 16°C verblieben die Larven 12 Tage länger im Larvenstadium und zeigten deshalb einen entsprechend längeren und größeren Blattkonsum. Bis zum L4/5-Stadium, das bei 24°C bzw. 16°C nach ca. 12 bzw. 20 Tagen erreicht wurde, wurden 59 bzw. 51 cm<sup>2</sup> Blattfläche/Larve konsumiert. Von den älteren Larvenstadien (L5 und L6) wurden bei 24°C 80 % der Gesamtblattfläche, bei 16°C sogar über 85% konsumiert. Für *Pieris rapae* wurde gleichfalls ein Anstieg der konsumierten Blattmenge bei niederen Temperaturen bis zur Verpuppung der Larven festgestellt sowie ein höherer Blattkonsum im L5-Stadium bei Temperaturen unter 20°C im Vergleich zu 24°C nachgewiesen (Tatchell, 1981).

Die Quantität an gefressener Blattfläche von *M. brassicae* variierte auch in Abhängigkeit vom Blattalter (Blatttete) der verfütterten Wirsingblätter und den jahreszeitliche bedingten Schwankungen des Pflanzenwachstums im Gewächshaus. Die dadurch bedingte Varianz der konsumierten Blattmenge zwischen den Versuchsreihen war bei 24°C am größten; beispielsweise betrug die kumulative Blattfläche nach 12 Tagen in Abb. 6A 42 cm<sup>2</sup>/Larve, in dem Versuchsansatz bis zur Verpuppung der Larven 59 cm<sup>2</sup> (Abb. 6B).

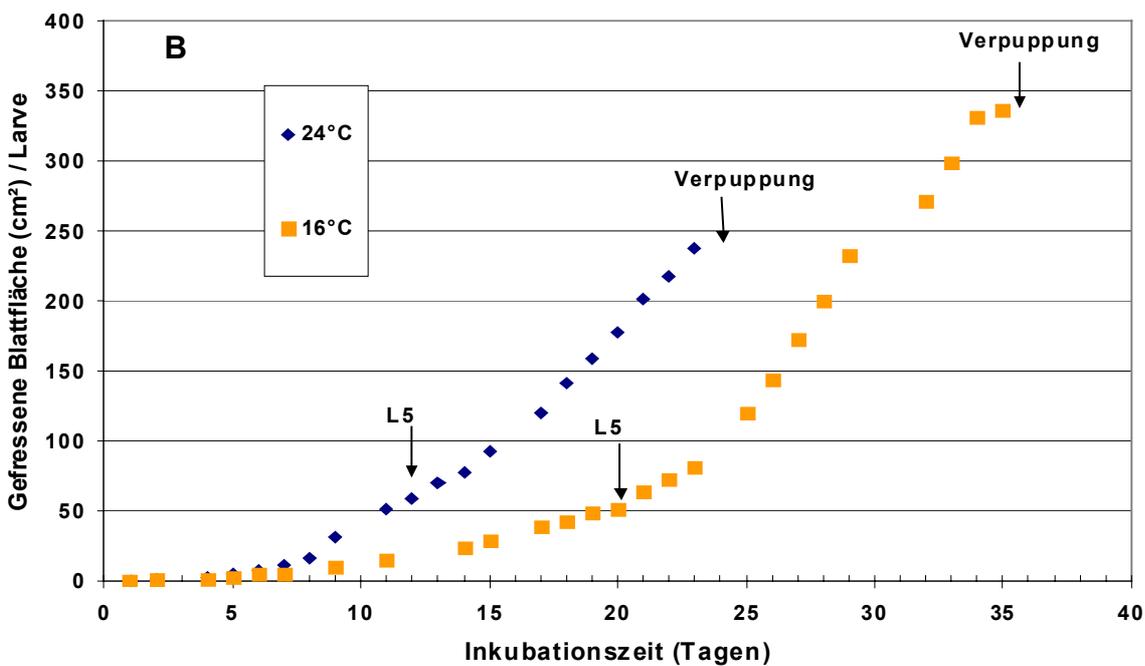
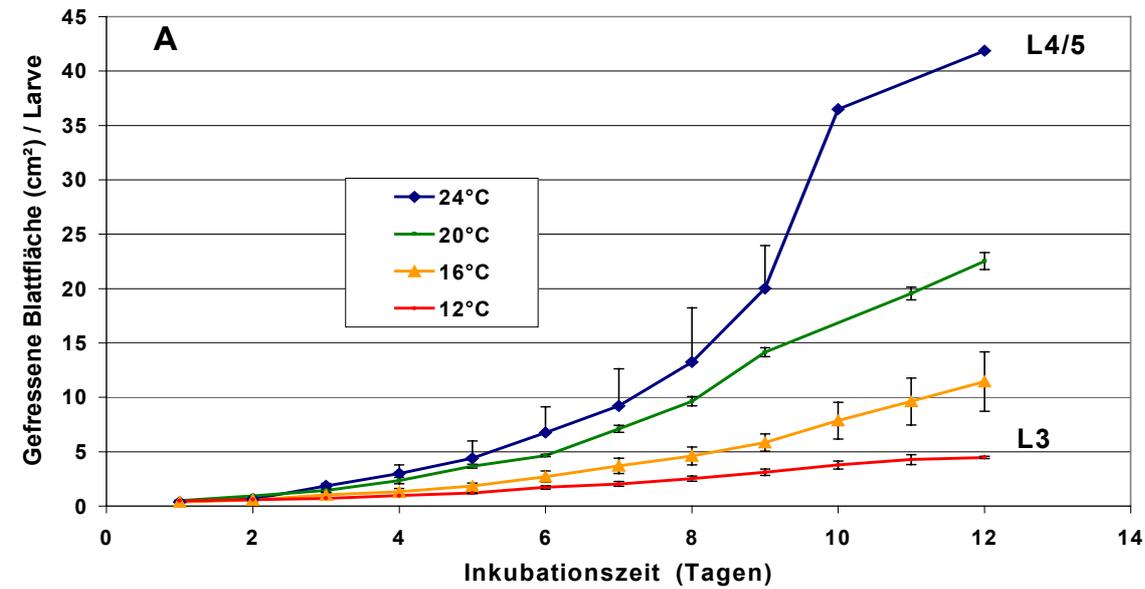


Abbildung 6: Temperaturabhängiger Fraßschaden von nicht infizierten *Mamestra brassicae* Larven bestimmt im Bioassay mit jungen Wirsingblättern (Beginn der Messungen im L2-Stadium) **A**: 12 Tage inkubiert bei 12, 16, 20 bzw. 24°C (L3 = 3. Larvenstadium, L4/5 = 4. und 5. Larvenstadium überwiegend vorhanden, Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 Versuchsreihen je Temperaturstufe; bei 24°C waren bei 11 und 12 Tagen Inkubation nur 2 Werte vorhanden, deshalb wurde keine Standardabweichung berechnet) **B**: Inkubation bis zur Verpuppung der Larven bei 16 bzw. 24°C (1 Versuchsreihe mit 10 Larven je Temperaturstufe).

Nach MbMNPV Infektion von *M. brassicae* L2-Larven konnte in allen vier Temperaturstufen mit steigender Viruskonzentration ein verminderter Blattfraß nachgewiesen werden. Bei 24°C führte die niedrigste geprüfte Konzentration von  $3 \times 10^3$  OBs/ml zu einer signifikanten Fraßreduktion 8 Tage nach Infektion, nach 12 Tagen war der Fraßschaden annähernd halbiert (Abb. 7A). Bei 16°C wurde eine Halbierung des Fraßschadens bei Konzentrationen von  $3 \times 10^5$  OBs/ml bis  $1 \times 10^6$  OBs/ml nach 12 Tagen erreicht (Abb. 7B). Bei 12°C war der kumulative Fraß durch *M. brassicae* sehr gering; jedoch konnte auch hier eine signifikante Reduktion der konsumierten Blattfläche nach Infektion der Larven mit  $1 \times 10^6$  OBs/ml nachgewiesen werden.

Analog zu Abb. 5 (Wirkungsgrad bzgl. Überlebensrate) ist in Abb. 8 der Wirkungsgrad von MbMNPV auf den Fraßschaden acht Tage nach Infektion von *M. brassicae* dargestellt. Obwohl für die Inkubationstemperatur von 20°C nur ein Datensatz für die Berechnungen der gefressenen Blattfläche zur Verfügung stand, kann aus dem Vergleich der beiden Abbildungen auf temperaturabhängige Unterschiede im Wirkungsgrad von MbMNPV hinsichtlich der Parameter Überlebensrate und Fraßschaden geschlossen werden.

Der bei 24°C vergleichsweise hohe Blattkonsum von *M. brassicae* Larven (auch im L2- bis L4-Stadium) und die verzögert einsetzende Wirkung einer Baculovireninfektion führte zu einem Fraßschaden, der anschließend nicht mehr durch hohe Mortalitätsraten ausgeglichen werden konnte. So betrug der Wirkungsgrad von  $1 \times 10^6$  OBs/ml MbMNPV auf die Überlebensrate 75% (Abb. 5), der Fraßschaden wurde hingegen bei dieser Konzentration nur um 50% reduziert (24 und 20°C; Abb. 8). Der  $LC_{50}$ -Wert bei 24°C betrug  $9,2 \times 10^4$  OBs/ml (Tab. 3).

Die Regressionsgerade bei 24°C zeigt eine geringere Steigung im Vergleich zu denjenigen bei 16 bzw. 12°C, d. h. die Wirkeffizienz von MbMNPV bzgl. Fraßschaden ist bei niederen Temperaturen größer. Eine 50%ige Reduktion des Fraßschadens konnte bei 16°C bzw. 12°C mit Konzentrationen von  $2 \times 10^7$  OBs/ml bzw.  $6 \times 10^7$  OBs/ml erzielt werden; die entsprechenden  $LC_{50}$ -Werte betragen  $1 \times 10^7$  OBs/ml bzw.  $3,3 \times 10^8$  OBs/ml. Bei 20°C wies MbMNPV eine annähernd gleiche Geradensteigung bzw. Wirkeffizienz wie bei 16 oder 12°C auf. Ein Wirkungsgrad von 90% bzgl. Fraßschaden konnte bei dieser Temperatur mit  $1 \times 10^8$  OBs/ml erreicht werden, der entsprechende  $LC_{90}$ -Wert betrug  $7,4 \times 10^6$  OBs/ml (Tab. 3).

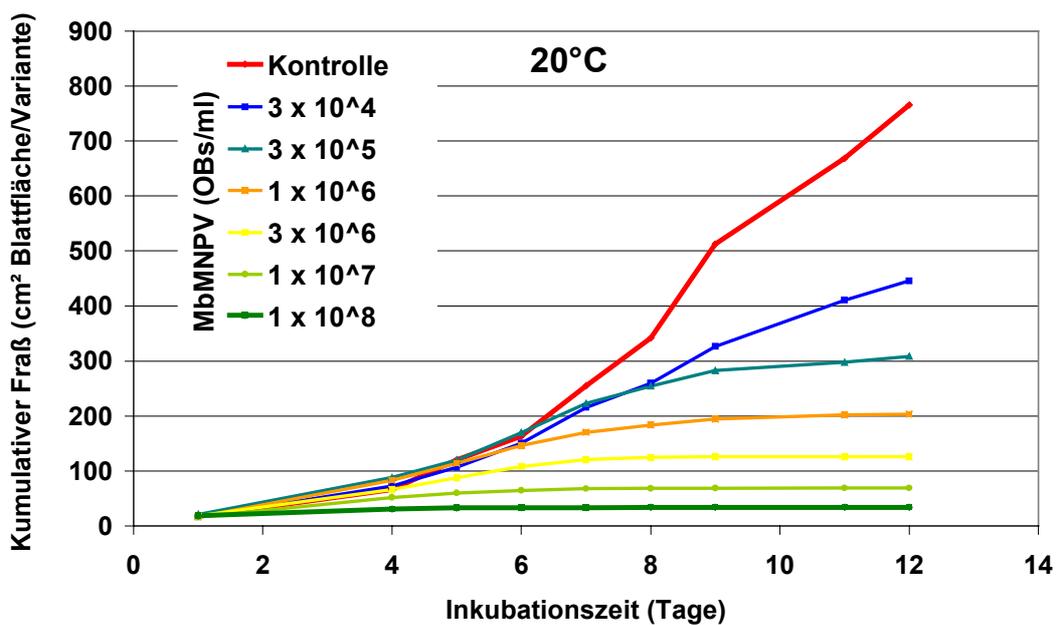
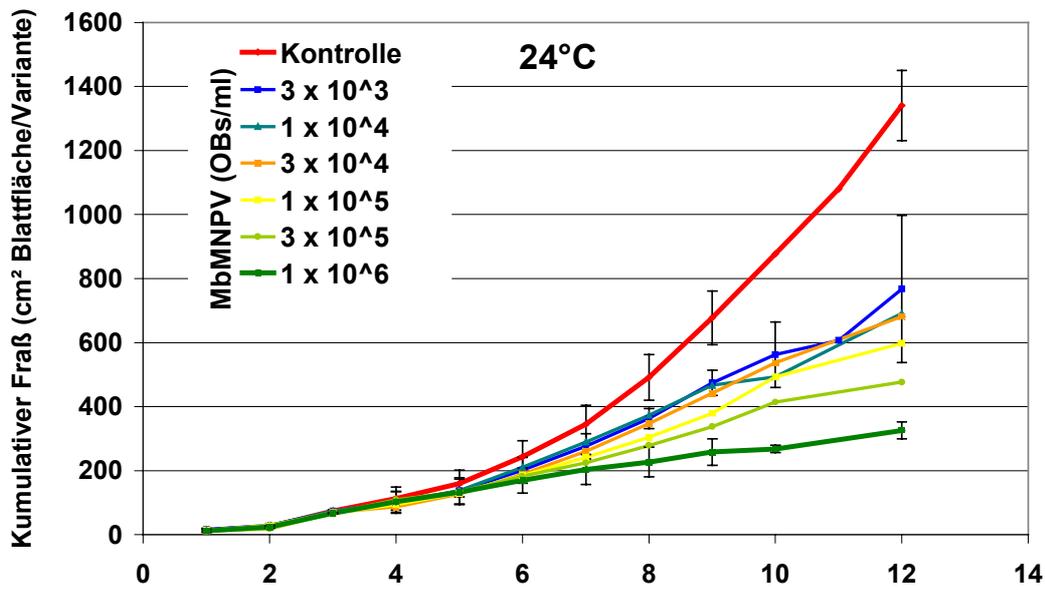


Abbildung 7A: Einfluß der Temperatur (24 und 20°C) auf die konsumierte Blattmenge von *Mamestra brassicae* nach Infektion mit MbMNPV. Im Bioassay mit jungen Wirsingblättern wurde der kumulative Fraß von 40 L2-Larven bestimmt; bei 24°C ist der Mittelwert aus 3 Versuchen und die doppelte Standardabweichung bei ausgewählten Konzentrationen; bei 20°C ist der Verlauf eines Versuches dargestellt.

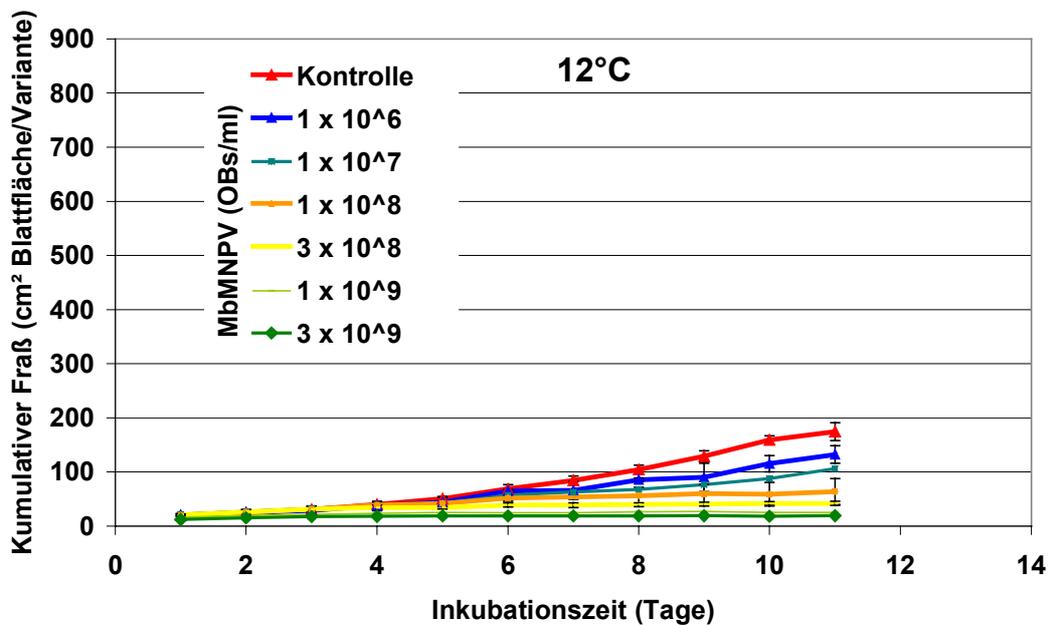
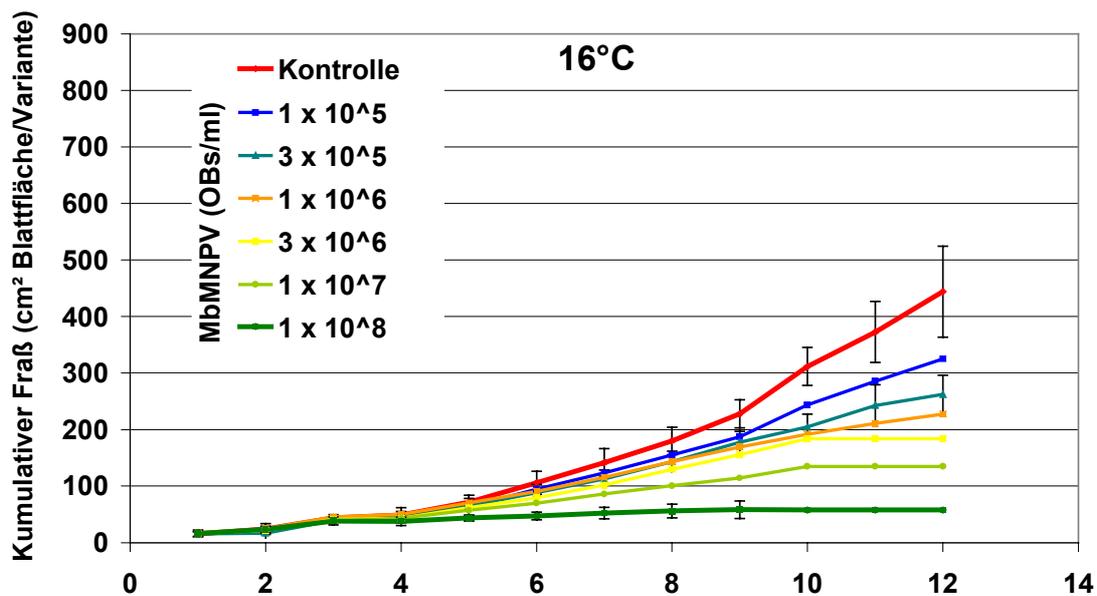


Abbildung 7B: Einfluß der Temperatur (16 und 12°C) auf die konsumierte Blattmenge von *Mamestra brassicae* nach Infektion mit MbMNPV. Im Bioassay mit jungen Wirsingblättern wurde der kumulative Fraß von 40 L2-Larven bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 (16°C) bzw. 4 (12°C) Versuchen und die doppelte Standardabweichungen bei ausgewählten Konzentrationen; für die direkte Vergleichbarkeit wurde bei beiden Temperaturen die gleiche Skalierung für die Ordinatenachse verwendet.

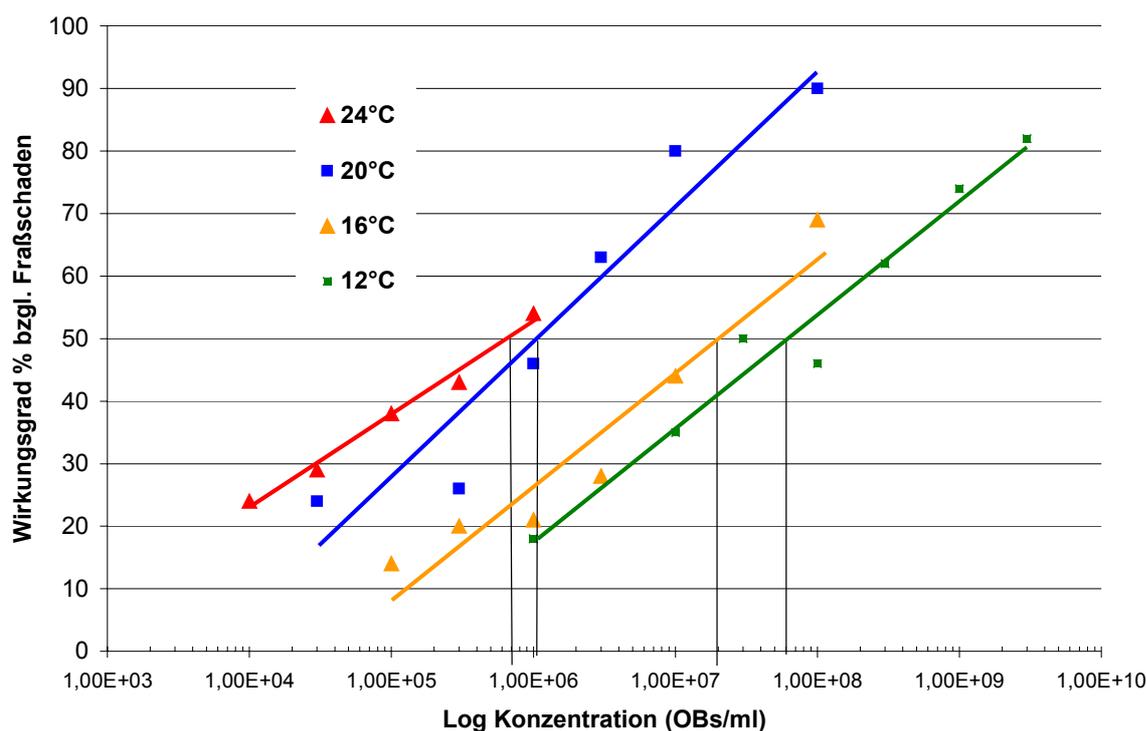


Abbildung 8: Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit des Wirkungsgrades von MbMNPV auf den Fraßschaden (gefressene Blattfläche im Bioassay) verursacht durch *Mamestra brassicae* L2-Larven 8 Tage nach Virusinfektion (markiert sind jeweils die Konzentrationen mit einem Wirkungsgrad von 50%).

### 3.1.4. Formulierung von MbMNPV und Freilandtestung

Vor der Freilandprüfung wurde der Wirkungsgrad des formulierten MbMNPV-Präparates ( $1,25 \times 10^6$  OBs/ml) mit der Applikation der gleichen Viruskonzentration in 0,025% Citowett im Bioassay bei 24°C verglichen. Da die Wirkgeschwindigkeit und die Fraßaktivität der Larven zwischen den drei durchgeführten Versuchsreihen stark variierte, werden die Versuchsergebnisse getrennt dargestellt (Abb. 9A und 9B).

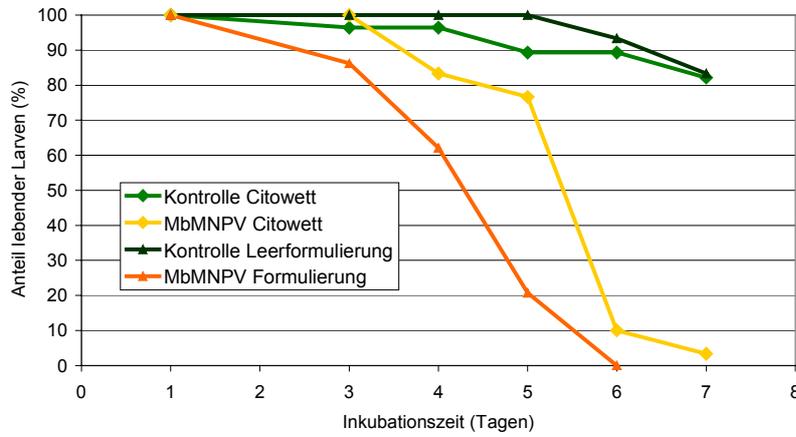
In allen drei Versuchen hatte die Leerformulierung alleine weder einen Einfluß auf die Aufnahmerate (Blattfraß am Tag 1) noch auf die Überlebensrate und den Fraßschaden von *M. brassicae* L2-Larven. Die Überlebensrate in den MbMNPV Varianten erreichte nach 6-7 Tagen annähernd 0%. Das neu formulierte Präparat zeigte in den ersten beiden Versuchen tendenziell eine höhere Wirksamkeit sowohl bzgl. Mortalität als auch Reduktion des

Fraßschadens. Eine ähnliche Wirkungsverbesserung konnte mit der in diesen Versuchen verwendeten Formulierung und CpGV beobachtet werden (Dr. M. Knoch, Probis GmbH, pers. Mitteilung, 2003). Der höchste Wirkungsgrad bzgl. Fraßschaden wurde im 1. Versuch mit 50% in der MbMNPV-Citowett-Variante und mit 78% durch das neu formulierte Präparat erzielt. In Versuch 3 war die Fraßaktivität der Larven im gesamten Versuchsverlauf stark reduziert, obwohl die Überlebensraten in den Kontrollvarianten bis zu Versuchsende (Tag 6) gleichbleibend hoch waren. Die geringe Fraßaktivität und damit möglicherweise auch eine geringere physiologische Aktivität kann dazu geführt haben, dass mögliche Wirkungsunterschiede zwischen den beiden unterschiedlich formulierten MbMNPV-Varianten nicht erfaßt werden konnten. Andererseits deuten die Ergebnisse der ersten beiden Versuche darauf hin, dass durch die Formulierung (bzw. Zusatzstoffen) von Baculoviren die Wirkgeschwindigkeit gesteigert wird und damit vor allem eine größere Verminderung des Fraßschadens erzielt werden kann.

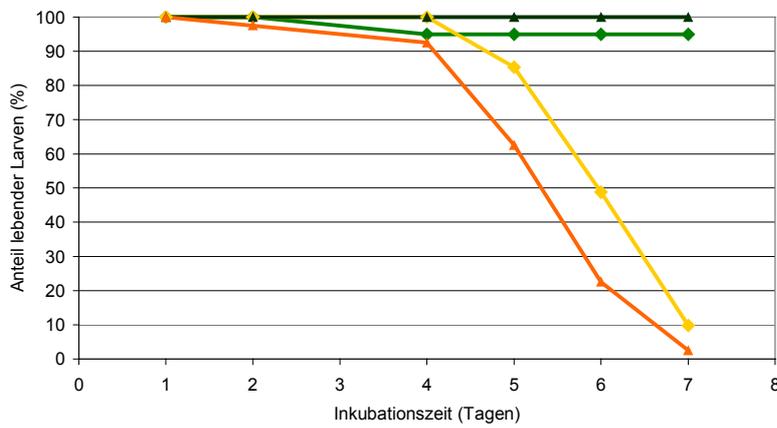
Im anschließenden Freilandversuch mit künstlicher Infestation von Kohlrabipflanzen wurde das neu formulierte MbMNPV-Präparat und XenTari® in alleiniger Form und in Tankmischung geprüft (Tab. 4). Unter den Versuchsbedingungen 2003 unterschied sich nur die Kombination beider Präparate signifikant von der Kontrolle; der Wirkungsgrad dieser Behandlung lag bei 84% bzgl. Larvenmortalität bzw. 73% bzgl. Reduktion des Fraßschadens. Obwohl die MbMNPV-Konzentration mit  $10^{12}$  OBs / ha in diesem Freilandversuch um den Faktor 10 niedriger lag als in Versuchen beispielsweise von Langenbruch et al. (1986), konnte dennoch in der Kombination eine deutliche Wirkungssteigerung gegenüber der alleinigen Bt-Wirkung selbst bei den für XenTari® optimalen Einsatztemperaturen 2003 erreicht werden.

In Abbildung 10 ist ergänzend der Wirkungsverlauf der Behandlungen auf die Überlebensrate der Larven dargestellt. Sechs und acht Tage nach Applikation von XenTari® (alleine oder in Kombination) war die Anzahl lebender Larven in den Versuchspartellen um ca. 50% reduziert, während die Wirkung von MbMNPV erst 14 Tage nach Applikation im gleichen Umfang nachgewiesen werden konnte. Diese verzögert einsetzende Wirkung bedingt auch den geringen Wirkungsgrad (39%) von MbMNPV bzgl. Fraßschaden.

### Versuch 1



### Versuch 2



### Versuch 3

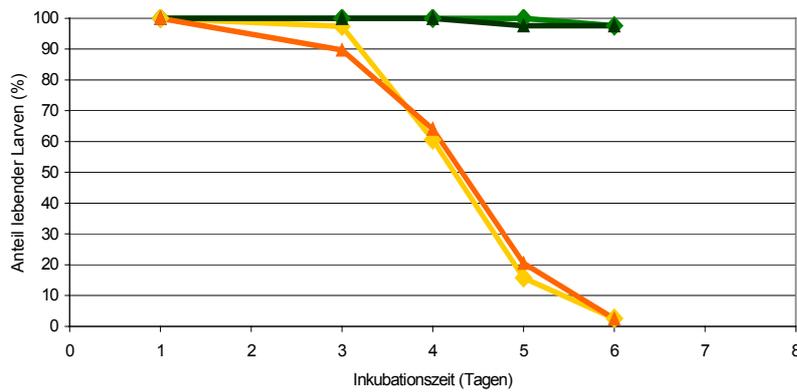
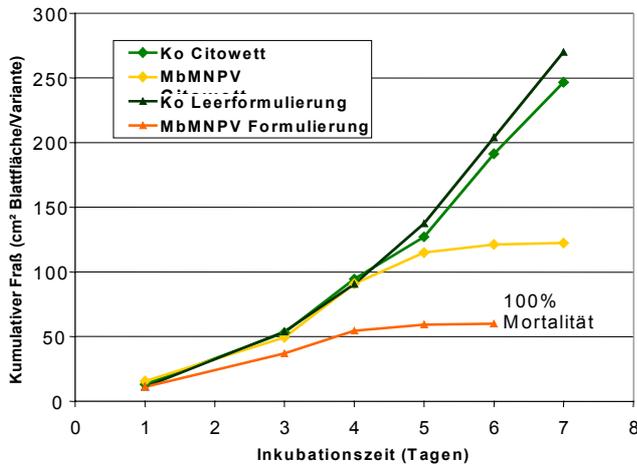
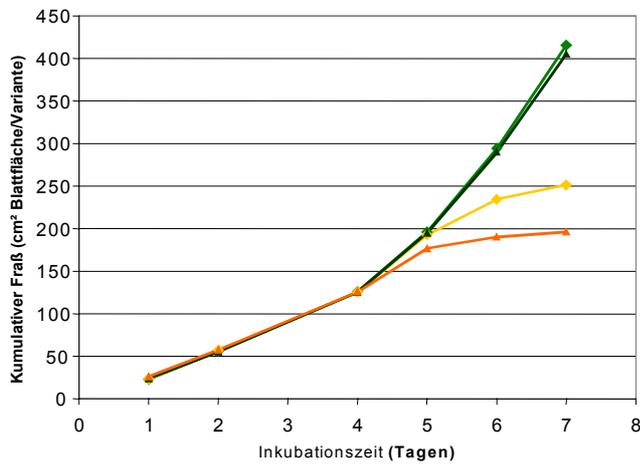


Abbildung 9A: Wirkung von MbMNPV ( $1,25 \times 10^6$  OBs/ml) in unterschiedlichen Formulierungen auf die Überlebensrate von *Mamestra brassicae* L2-Larven im Bioassay bei 24°C (Citowett: 0,025 %; Formulierung: 0,03 %)

### Versuch 1 (30 Larven/Variante)



### Versuch 2 (40 Larven/Variante)



### Versuch 3 (40 Larven/Variante)

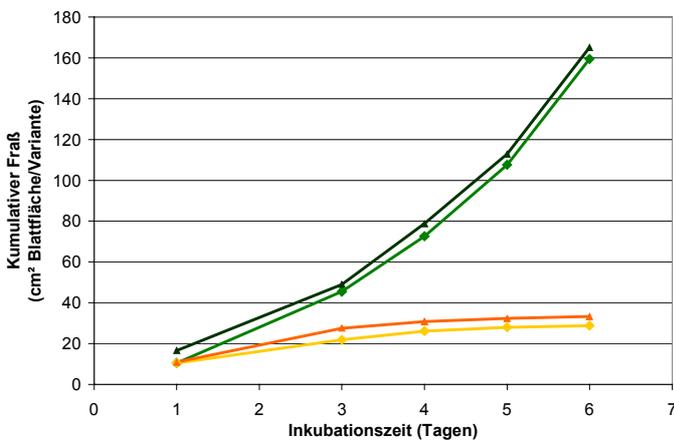


Abbildung 9B: Wirkung von MbMNPV ( $1,25 \times 10^6$  OBs/ml) in unterschiedlichen Formulierungen auf den Fraßschaden von *Mamestra brassicae* L2-Larven im Bioassay bei 24°C (Citowett: 0,025 %; Formulierung: 0,03 %)

Tabelle 4: Wirkung von MbMNPV und *Bacillus thuringiensis* (XenTari®) auf die Anzahl überlebender Larven nach künstlicher Infestation von 5 Kohlrabi-Pflanzen/Parzelle mit *Mamestra brassicae* Gelegen\* (Behandlungsstadium: L2-Larven; Auswertung: 14 Tage nach Behandlung, Sorte: Korist; Standort: Queckbrunnerhof, Schifferstadt)

Prüfmittel	Aufwandmenge (Spritzmenge 400 L /ha)	Anzahl überlebender Larven **/ Parzelle	Wirkungsgrad (%)	
			Mortalität	Fraßschaden
Kontrolle (unbehandelt)		17,25 <sup>a</sup>		
MbMNPV-Formulierung	10 <sup>12</sup> OBs / ha	7 <sup>ab</sup>	59	39
XenTari®	1 kg / ha	5 <sup>ab</sup>	71	63
MbMNPV-F. + XenTari®	10 <sup>12</sup> OBs / ha + 1 kg /ha	2,75 <sup>b</sup>	84	73

\*Als weitere Schädlinge traten im Versuchszeitraum 20. Aug. –9. Sept. 2003 *Brevicoryne brassicae* und *Phyllotreta* sp. auf.

\*\* Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgliedern (Tukey's Studentized Range Test:  $p = 0,05$ )

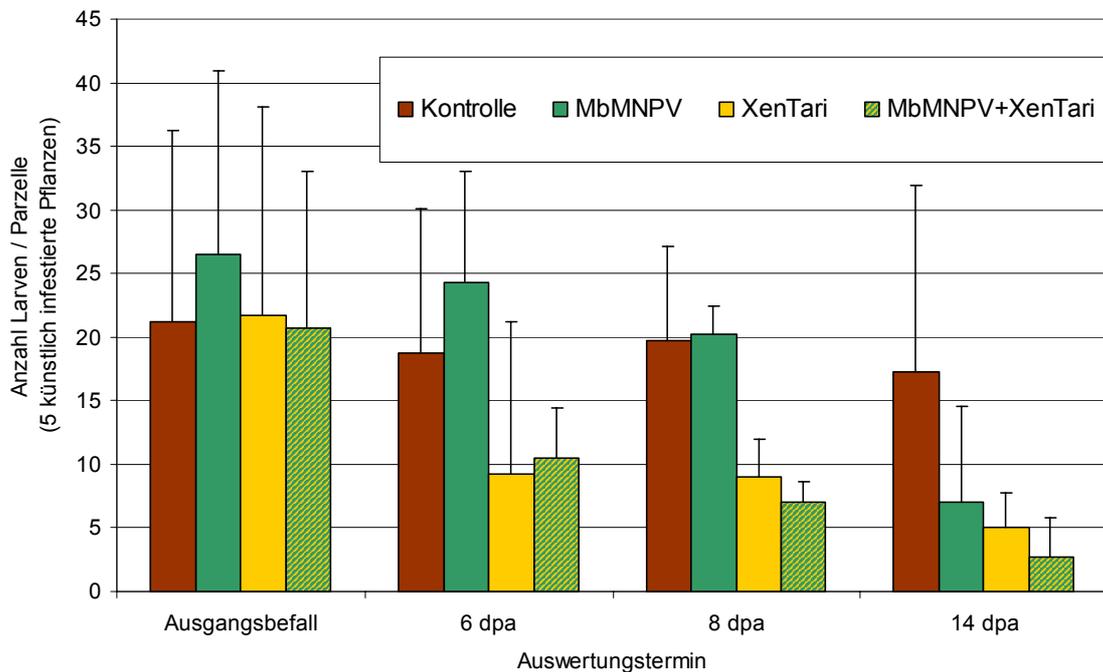


Abbildung 10: Wirkungsverlauf von MbMNPV und *Bacillus thuringiensis* (XenTari) auf die Anzahl überlebender Larven von *Mamestra brassicae*. Je 5 Kohlrabi-Pflanzen/Parzelle (Sorte Korist) wurden mit *Mamestra brassicae* Gelegen künstlich infestiert; die Behandlung (siehe Tab. 4) wurde im L2-Stadium der Larven durchgeführt (Mittelwerte aus 4 Wiederholungen und Standardabweichung; dpa = days post application, Freiland Standort: Queckbrunnerhof, Schifferstadt).

### 3.2. Nutzung und Verwertbarkeit der Ergebnisse für den ökologischen Landbau; Möglichkeiten der Umsetzung oder Anwendung der Ergebnisse, insbesondere Ableitung von Vorschlägen für Maßnahmen, die durch BMVEL weiter verwendet werden können

Präparate auf der Basis von Baculoviren gelten als die selektivsten unter den derzeit bekannten Bioinsektiziden. Für den ökologischen Gemüsebau stehen jedoch momentan keine derartigen Produkte zur Verfügung.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde erstmals nachgewiesen, dass MbMNPV auch bei niederen Temperaturen im Bioassay einen hohen Wirkungsgrad erzielen und damit möglicherweise die Wirkungsschwäche von zugelassenen *Bacillus thuringiensis* (Bt)-Präparaten im ökologischen Kohlanbau ausgleichen kann. Zwar wirken Bt-Präparate generell schneller als Baculoviren, doch konnte gezeigt werden, dass bei 16°C die Endmortalität bei MbMNPV infizierten *M. brassicae* Larven deutlich über der von *B. thuringiensis* lag.

Mit einer den Richtlinien des ökologischen Landbaus entsprechende Neu-Formulierung von MbMNPV konnte in den vorläufigen Prüfungen eine Wirkungssteigerung gegenüber der nicht formulierten Virussuspension nachgewiesen werden. Im Freiland Einsatz dieses Präparates in Tankmischung mit einem Bt-Präparat konnte eine Wirkungssteigerung gegenüber der alleinigen Bt-Wirkung nachgewiesen werden. Somit könnte durch MbMNPV eine höhere Wirkungssicherheit in der Kohleulenkontrolle im ökologischen Anbau erzielt werden.

Gleichfalls konnte erstmals nachgewiesen werden, dass auch MacoNPV-A für Larven der Kohleule pathogen ist und gegenüber L2-Larven von *M. brassicae* eine ähnliche Virulenz wie MbMNPV besitzt. Mit diesen Untersuchungen wurde ein weiterer suszeptibler Wirt von MacoNPV-A identifiziert. Bei einer künftigen Produktentwicklung auf Basis des MacoNPV, die derzeit in Kanada geplant wird, könnte somit auch ein weiteres Bioinsektizid gegen *M. brassicae* zur Verfügung stehen.

Eine breite Freilandtestung von Baculoviren-Präparaten auf der Basis von MbMNPV oder MacoNPV gegen Kohlschädlinge bei kühler Witterung alleine und in Kombination mit neuesten Bt-Präparaten sowie neuester Applikationstechnik wird empfohlen.

#### **4. ZUSAMMENFASSUNG**

Baculoviren sind als hoch selektive biologische Kontrollagentien für Eulenraupen seit längerem bekannt und ihre gute Wirksamkeit wurde schon in mehreren Gewächshaus- und Freilandversuchen nachgewiesen. Dennoch stehen derzeit keine Bioinsektizide auf der Basis von Baculoviren für den ökologischen Gemüseanbau zur Verfügung. Die Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen war, einerseits die biologische Wirkung von *Mamestra brassicae* Nukleopolyhedrovirus (MbMNPV) und einem kürzlich bei *Mamestra configurata* gefundenen

Virus (MacoNPV-A) zu vergleichen; andererseits sollte die Wirkung von MbMNPV auf die Mortalität und den Fraßschaden von Larven der Kohleule (*Mamestra brassicae*) bei niedrigeren Temperaturen geprüft werden. Daraus waren Empfehlungen für eine größere Wirkungssicherheit bei der Kontrolle der Kohleule im ökologischen Anbau abzuleiten.

In Bioassays wurde nachgewiesen, dass auch MacoNPV-A für *M. brassicae* pathogen ist. Die LC<sub>50</sub>-Werte von MbMNPV und MacoMNPV-A zeigten keinen statistischen Unterschied. Somit können beide Viren zur biologischen Kontrolle von *M. brassicae* eingesetzt werden. Die molekulare Charakterisierung mittels DNA-Restriktionsendonukleasen-Profilen zeigte, dass die beiden Isolate unterschiedliche Viren sind.

Anhand von MbMNPV wurde im Bioassay mit Wirsingblättern eine temperaturabhängige Wirkung auf die Larvenmortalität von *M. brassicae* und den verursachten Fraßschaden nachgewiesen. Eine deutliche Wirkung konnte auch bei vergleichsweise niedrigen Inkubationstemperaturen ermittelt werden. Die LC<sub>50</sub>-Werte von MbMNPV lagen zwischen  $9,2 \times 10^4$  OBs/ml (24°C),  $1,2 \times 10^5$  OBs/ml (20°C),  $1,0 \times 10^7$  OBs/ml (16°C) und  $3,3 \times 10^8$  OBs/ml (12°C). Eine Reduktion der gefressenen Blattfläche um 50% wurde durch Konzentrationen von  $1 \times 10^6$  OBs/ml (24 und 20°C),  $2 \times 10^7$  OBs/ml (16°C) und  $6 \times 10^7$  OBs/ml (12°C) erzielt.

In einem Freilandversuch mit künstlich infestierten Kohlrabi-Pflanzen wurde eine neue Formulierung für MbMNPV getestet. Die Leerformulierung (Flüssigformulierung) wurde von M. Knoch (Probis GmbH, Wiernsheim) zur Verfügung gestellt. Das formulierte MbMNPV-Präparat wies eine Wirkungssteigerung im Bioassay gegenüber dem nicht formulierten Virus-Präparat auf. Durch die Kombination von *Bacillus thuringiensis* (Bt)-Präparat und MbMNPV-Präparat wurde eine weitere Steigerung des Wirkungsgrades im Freiland erzielt.

Zur biologischen Kontrolle der Kohleule bei kühler Witterung empfiehlt sich der Einsatz eines Präparates auf der Basis von MbMNPV oder möglicherweise MacoNPV-A. Auch bei niedrigen Temperaturen kann hiermit eine hohe Mortalitätsrate erzielt und insbesondere die Entwicklung älterer Larvenstadien (L5 und L6) verhindert werden; diese Larvenstadien sind für 80% (24°C) bzw. 85% (16°C) des verursachten Gesamtfraßes verantwortlich. Eine weitere Wirkungssteigerung und eine größere Wirkungssicherheit von Bioinsektiziden kann durch die entsprechende Formulierung des Baculovirus-Präparates sowie durch die Kombination mit einem *Bacillus thuringiensis* Präparates erreicht werden.

## 5. GEGENÜBERSTELLUNG DER URSPRÜNGLICH GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH ERREICHTEN ZIELEN, GGF. MIT HINWEISEN AUF WEITERFÜHRENDE FRAGESTELLUNGEN

Im Folgenden sind geplante Vorgehensweise und Ziele aufgelistet; anschließend ist jedes Teilziel als entweder erreicht (√) oder teilweise erreicht (z.T. √) markiert.

### 1. Bereitstellung der Versuchsorganismen, Methodik

- 1.1. Zucht von *M. brassicae* √
- 1.2. Vermehrung von MbMNPV und Pathogenitätsnachweis von MacoNPV für *M. brassicae* sowie Vermehrung von MacoNPV √
- 1.3. Formulierung von MbMNPV √

### 2. Bestimmung der temperaturabhängigen Wirkung von MbMNPV und Bt

- 2.1. Blatt-Bioassays mit MbMNPV und Bt √
- 2.2. Statistische Auswertung √

### 3. Wirkungsvergleich im Feld

- 3.1. Orientierende Versuche zur optimalen Infestationsdichte √
- 3.2. Feldversuche 1 und 2 z. T. √
- 3.3. Statistische Auswertung √

### 4. Projektmanagement und Berichte

- 4.1. Informationsaustausch und Vorträge √
- 4.2. Berichte (Sachstandsberichte, Zwischenbericht, Abschlußbericht) √
- 4.3. Publikationen **in Vorbereitung** √

### Als Meilensteine wurden definiert:

- MS 1 08/02: Etablierung einer *M. brassicae*-Zucht √
- MS 2 09/02: Vermehrung von MbMNPV und MacoNPV √
- MS 3 10/02: Bestimmung der optimalen Infestationsdichte im Feld √
- MS 4 03/03: Bestimmung der temperaturabhängigen Wirkung von MbMNPV √
- MS 5 10/03: Wirkungsvergleich Applikationen im Feld z. T. √

Die gesetzten Ziele wurden größtenteils im Projektzeitraum erreicht. Unter den extrem heißen Witterungsbedingungen des Jahres 2003 konnte allerdings eines der angestrebte Teilziele – sichere Kontrolle von Kohleulenlarven durch Baculoviren bei kühler Witterung – nicht erfolgen. Deshalb sind weitere Freilandversuche in Fröhsätzen des Kohlanbaus unbedingt

notwendig. Sehr sinnvoll wäre auch die Prüfung der Bioinsektizide in einer Unterblattapplikation auf dem Stand der nunmehr zur Verfügung stehenden verbesserten Applikationstechnik.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265-267.
- Biache, G., Injac, M. (1988) Effect of treatment of a cabbage crop with a nuclear polyhedrosis virus, associated with a synthetic pyrethroid, on the pests *Mamestra brassicae* and *Plutella xylostella* and their parasitoids *Chrysopa carnea* and *Apanteles glomeratus*. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent 53, 987-995.
- Biache, G., Severini, M., Injac, M. (1989) Sensitivity of *Plutella xylostella* to a mixture of nuclear polyhedrosis virus of *Mamestra brassicae* and a synthetic pyrethroid. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent 54, 917-921.
- BVL (2004). Verzeichnis zugelassener Pflanzenschutzmittel (Stand 12.08.2004). Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) (<http://www.bvl.bund.de/pflanzenschutz/psmdbstart.html>).
- Erlanson, M. A. (1990) Biological and biochemical comparison of *Mamestra configurata* and *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus isolates pathogenic for the bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Invertebrate Pathology 56, 47-56.
- Evans, H. F. (1981) Quantitative assessment of the relationships between dosage and response of the nuclear polyhedrosis virus of *Mamestra brassicae*. J. Invertebr. Pathol. 37, 101-109.
- Figueiredo, E., Munoz, D., Escribano, A., Mexia, A., Vlak, J. M., Caballero, P. (1999) Biochemical identification and comparative insecticidal activity of nucleopolyhedrovirus isolates pathogenic for *Heliothis armigera* (Lep., Noctuidae) larvae. J. Appl. Ent. 123, 165-169.
- Fritzsche, R., Geissler, K., Schliephake, E. (1991) Ergebnisse von Bekämpfungsversuchen mit Granulose- und Kernpolyeder-Viruspräparaten im Obst-, Gemüse- und Zierpflanzenbau. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 43, 92-95.

- Geissler, K., Schliephake, E., Rutsckaja, V. (1991) Investigations on the insecticidal efficiency of the nuclear polyhedrosis virus of the cabbage moth (*Mamestra brassicae* L.). Archiv für Phytopathologie und Pflanzenschutz 27, 157-161.
- Geervliet, J. B. F., Vlak, J. M., Smits, P. H. (1991) Effects of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* mixtures on mortality of beet armyworm, *Spodoptera exigua*. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent 56, 305-311.
- Gröner, A. (1977) Development and testing of a virus preparation (nuclear polyhedrosis virus) for control of the cabbage moth. Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft Berlin Dahlem: 41st German Plant Protection Conference in Münster 10th-14th October 41(10), 180.
- Gröner, A. (1986) Specificity and safety of baculoviruses. In: R.R. Granados and B.A. Federici (Eds), The Biology of Baculoviruses, Vol.I, Biological Properties and Molecular Biology, pp. 177-202. CRC Press, Boca Raton.
- Gröner, A., Overbeck, H. (1978) Field tests on the control of the cabbage moth (*Mamestra brassicae* L.), Lep.: Noctuidae) with a nuclear polyhedrosis virus. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 30, 7-12.
- Gullion, M. (1987) Marketing of baculovirus based biological insecticides application to *Mamestra brassicae* and *Spodoptera littoralis* NPV. Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent 52, 147-153.
- Injac, M., Krnjajic, S. (1991) The characteristics of baculoviruses (NPV) of cabbage moth (*Mamestra brassicae* L.) Zastita Bilja 42, 137-152 (Summary).
- Johansen, N. S. (1997) Influence of temperature on development, fecundity and survival of cabbage moth *Mamestra brassicae* (L.) (Lep., Noctuidae) in relation to the improvement of forecasting and control methods. J. Appl. Ent. 121, 81-88.
- Knoch, M. (2002). CpGV - aus der Sicht des Bioinsektizidproduzenten. Tagungs-CD-ROM Fachgespräch Trends und Innovation bei der Kontrolle des Apfelwicklers mit Granuloviren, SLFA Neustadt an der Weinstr. 11.04.2002
- Knowles, A. (2001) Trends in pesticide formulations. Agrow Reports, PJB Publications Ltd.
- Langenbruch, G. A., Hommes, M., Gröner, A. (1986) Field trials with the nuclear polyhedrosis virus of the cabbage moth (*Mamestra brassicae*). Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 93, 72-86.

- Langenbruch, G. A. (2003) Kommerzialisierung mikrobieller Pflanzenschutzmittel. BBA-Fachgespräch 27./28. Nov. 2003, Darmstadt.
- Li, S., Erlandson, M., Moody, D., Gillott, C. (1997) A physical map of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome and sequence analysis of the polyhedrin gene. *Journal of General Virology* 78, 265-271.
- Li, Q., Donly, C., Li, L., Willis, L. G., Theilmann, D. A., Erlandson, M. (2002a) Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* 294, 106-121.
- Li, L., Donly, C., Li, Q., Willis, L. G., Keddie, B. A., Erlandson, M., Theilmann, D. A (2002b) Identification and genomic analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata*. *Virology* 297, 226-244.
- Mendez, W. A., Valle, J., Ibarra, J. E., Cisneros J., Penagos, D. I., Williams, T. (2002) Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological Control* 25, 195-206.
- Noll, J (1967) Eine Polyhedrose als Hauptbegrenzungsfaktor für die Massenvermehrung der Kohleule (*Mamestra brassicae*). *Arch. PflSchutz* 3, 27-48.
- Peters, S. E. O., Coaker, T. H. (1993) The enhancement of *Pieris brassicae* (L.) (Lep., Pieridae) granulosis virus infection by microbial and synthetic insecticides. *Journal of Applied Entomology* 116, 72-79.
- Pingel, R. L., Lewis, L. C. (1999) Effect of *Bacillus thuringiensis*, *Anagrapha falcifera* multiple nucleopolyhedrovirus, and their mixture on three lepidopteran corn ear pest. *Journal of Economic Entomology* 92, 91-96.
- Possee, R. D., Kelly, D. C. (1988) Physical maps and comparative DNA hybridization of *Mamestra brassicae* and *Panolis flammea* nuclear polyhedrosis virus genomes. *J. Gen. Virol.* 69, 1285-1298.
- Prestele, C., Laun, N., Jehle, J. A. (1998) Versuche im deutschen Gartenbau – Blumenkohl – Pflanzenschutz.
- Rabindra, R. J., Jayaraj, S. (1994) Effect of granulosis virus infection on the susceptibility of *Helicoverpa armigera* larvae to *Bacillus thuringiensis*, endosulfan and chlorpyrifos. *Pest Management and Economic Zoology* publ. 1996, 2, 7-10.
- Rovesti, L., Crook, N. E., Winstanley, D. (2000) Biological and biochemical relationships between the nucleopolyhedroviruses of *Mamestra brassicae* and *Heliothis armigera*. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 2-8.

- Salama, H. S., Sharaby, A., El Din, M. M. (1993) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus in the larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Insect Science and its Application* 14, 537-543.
- SAS Institute (2001) SAS software release 8.2 , SAS Institute, Cary, N. C.
- Steinecke, S., Jehle, J. A., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Huber, J., Roßberg, D., Backhaus, H. (2002) Mathematische Modellierung der Populationsdynamik von genetisch veränderten Mikroorganismen am Beispiel der Baculoviren. Forschungsbericht UBA-FB 000358.
- Srinivisan, G., Sundara Babu, P. C., Sathiah, N., Balasubramanian, G. (1994) Field efficacy of HaNPV alone and in combination with delfin for control of gram pod borer, *Heliothis armigera* (Hubner) on chickpea. *Pest Management and Economic Zoology* 2, 45-48.
- Sun, F. R. (1993) Studies on the control of *Clanis bilineata tsingtauca* (Lep.: Sphingidae) with polyhedrosis virus. *Chinese Journal of Biological Control* 9, 26-28.
- Sun, F., Wang, H., Ji, M. (1993) Studies on the nuclear polyhedrosis virus disease of *Clanis bilineata tsingtauca* Mell. *Acta Agriculturae Boreali Sinica* 8, 59-63.
- Tatchell, G. M. (1981) The effect of a granulosis virus infection and temperature on the food consumption of *Pieris rapae* [Lep.: Pieridae]. *Entomophaga* 26, 291-299.
- Undorf, K. (1991) Beitrag zur Risikoabschätzung bei der Freisetzung von gentechnisch veränderten Baculoviren. Diss. TH Darmstadt, 185 S.
- Wyss, E., Specht, N., Daniel, C., Rüegg (2003) Prüfung des Bt var. kurstaki Präparats „Delfin“ bei Ober- und Unterblattapplikation gegen Kohlräupen in biologischem Rosenkohl. FIBL Mittelprüfung 03/18e. <http://orgprints.org/00002594/>.