

Einsatz der Biotechnologie im biologischen Pflanzenschutz

Ralf-Udo Ehlers

Institut für Phytopathologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Herrmann-Rodewald-Str. 9, 24118 Kiel
(ehlers@biotec.uni-kiel.de)

Potenziale des biologischen Pflanzenschutzes

Agrarökosystem-Management

Grundlage jeder Agrarproduktion sind natürliche Regelkreise, die einer unbegrenzten Ausbreitung einzelner Individuen entgegenwirken. Wie jede Kulturpflanze von Pathogenen und Schädlingen befallen wird, so werden wiederum diese vom Menschen als Schadorganismen klassifizierten Organismen von sogenannten Antagonisten befallen bzw. konsumiert. Unter dem biologischen Pflanzenschutz verstehen wir also den Einsatz der Biologie zur Regulierung der Population von Schaderregern. Der Nutzen des biologischen Pflanzenschutzes wird im Allgemeinen unterschätzt. Das am Agrarstandort vorkommende Antagonistenpotenzial ist wesentlicher Bestandteil des Produktionsfaktors Boden. Ein falscher Einsatz der Produktionstechnik kann das Gleichgewicht zwischen Schädlingen und Nützlingen stören und weitere oft teure Maßnahmen notwendig machen. So reduziert z.B. die wendende Bodenbearbeitung nach Winterraps die Population ichneumonider Parasitoiden (z.B. *Phradis morionellus*) des Rapsglanzkäfers (*Meligethes* spp.) (Nitzsche & Ulber, 1998). Diese Antagonisten parasitieren die Larven des Rapsglanzkäfers und entwickeln sich während der Verpuppung des Käfers weiter, schlüpfen aber erst im darauf folgenden Jahr. Werden die parasitierten Larven tief im Boden vergraben, gelangen nur wenige im Frühjahr wieder an die Oberfläche und ihr Potenzial ist reduziert. Die Population insektenpathogener Nematoden (*Steinernema* und *Heterorhabditis* spp.) nimmt durch eine wendende Bodenbearbeitung ebenso ab (Brust, 1991; Susurluk, 2005). Nematoden können Rapsglanzkäfer während der Verpuppung auf nur 10% der Ausgangspopulation reduzieren (Nielsen & Philipsen, 2005). Auf den Rapsflächen sind sie jedoch fast gar nicht anzutreffen (Susurluk, 2005). Das Potenzial der Antagonisten ist reduziert und der Einsatz von Insektiziden wird unausweichlich.

Ein besseres Verständnis der Regelkreise und entsprechende Anpassungen der Produktionstechnik würden dagegen der Landwirtschaft Kosten sparen helfen. Die Entwicklung eines nützlicherschonenden Agrarökosystem-Managements ermöglicht also die optimale Ausnutzung antagonistischer Potenziale am Standort und Einsparungen bei der chemischen Bekämpfung.

Anwendungsformen des biologischen Pflanzenschutzes sind:

- Erhalt und Förderung von Antagonisten (Agrarökosystem-Management)
- Einbürgerung neuer Nützlingsarten (Klassischer biologischer Pflanzenschutz)
- Einbürgerung virulenterer Arten (Neoklassischer biologischer Pflanzenschutz)
- Periodische Freilassung von Antagonisten (Kurative und prophylaktische Behandlung)

Klassischer biologischer Pflanzenschutz

Ein weiteres Einsatzgebiet des biologischen Pflanzenschutzes ist die Einführung von Antagonisten zur Regulation der Population invasiver Arten. Diese Methode wird als klassischer biologischer Pflanzenschutz bezeichnet. Invertebrate Antagonisten und Pathogene der invasiven Schädlinge und Unkräuter werden in ihrem Herkunftsland gesammelt, in Massenzuchten vermehrt und dann in der Region, in der sich der Schädling bzw. das Unkraut unkontrolliert ausgebreitet hat, angesiedelt. Diese Methode des biologischen Pflanzenschutzes findet besonders in Übersee Einsatz auf weit über 3 Milliarden Hektar (ca. 10% der landwirtschaftlich genutzten Flächen) und ist bei Betrachtung der Kosten-Nutzen-Relation besonders effektiv. Zum Beispiel wurde der Knorpellattich *Chondrilla juncea* (Asteraceae) 1872 erstmal in Nordamerika festgestellt und verbreitete sich auf rund 3,4 Millionen Hektar. In Australien verursachte das Kraut ohne die Anwesenheit seiner Antagonisten ebenfalls große Schäden. Zur Bekämpfung wurde der Rostpilz *Puccinia chondrillina* und die Gallmücke *Cystiphora schmidtii* erfolgreich angesiedelt (Julien & Griffith, 1999). Das Kosten-Nutzen-Verhältnis des Bekämpfungsprogramms belief sich in Australien auf 1:112 (Cullen, 1985). Programme im klassischen biologischen Pflanzenschutz sind immer öffentlich finanziert, da Schäden nicht auf landwirtschaftlich genutzte Flächen begrenzt sind, sondern ganze Regionen betroffen sind. Biotechnische Methoden werden im klassischen biologischen Pflanzenschutz eingesetzt, um ausreichend große Populationen der Antagonisten für die Ansiedlung zu produzieren.

Periodische Freilassung von Nutzarthropoden

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit im biologischen Pflanzenschutz ist die massenhafte Ausbringung von Antagonisten in Freiland- und Gewächshauskulturen zur gezielten Bekämpfung oder Prävention. Der Landwirt entscheidet über den Einsatz und muss die Kosten tragen. Zur Versorgung dieses Marktes hat sich in den letzten 20 Jahren eine florierende Branche von kleinen und mittleren Unternehmen (KMUs) entwickelt, die Antagonisten produzieren und vermarkten. Angefangen hat es mit dem Vertrieb von räuberischen Spinnmilben (*Phytoseiulus persimilis*) und Parasitoiden (*Encarsia formosa*) der Weißen Fliege in Gewächshäusern in den 70-iger Jahren durch die Firma Koppert (Niederlande). Mit der Entwicklung der Massenzucht von Hummeln und ihrem Einsatz als Bestäuber in Unterglaskulturen Ende der 80-iger Jahre durch die Firma Biobest (Belgien), musste der Einsatz von Insektiziden weiter zurückgefahren werden, um eine Schädigung der Hummeln zu vermeiden. Weitere chemische Anwendungen wurden

durch den Einsatz von Nutzinsekten substituiert. Heute werden >100 Nutzarthropoden in Europa angeboten. Mit ca. 30 Arten werden Lösungen für fast alle Schädlinge in Unterglaskulturen abgedeckt. Mehr als 30 Firmen sind in Europa aktiv mit einem jährlichen Umsatzvolumen von ca. 150 Millionen €. Über 600.000 Hummelvölker im Wert von >30 Millionen € werden vertrieben. Die jährlichen Wachstumsraten liegen zwischen 10 und 20% (Frost & Sullivan, 2001).

Bei Nutzarthropoden spielt die Entwicklung von Zuchtverfahren eine zentrale Rolle. Da das Angebot im Markt in Nordeuropa immer mehr einer Sättigung entgegenstrebt, fallen dementsprechend die Preise und konkurrenzfähige Massenproduktionsverfahren bestimmen über den Marktanteil der Firmen. Die Technologie ist meist nicht patentierbar, weshalb die Firmen Informationen zu Produktionsverfahren geheim halten. Inzwischen werden auch künstliche Diäten verwendet, um die Produktionskosten zu senken (Grenier & de Clercq, 2003) und die Verbesserung der Verpackungen hat dazu beigetragen, die Qualität der Produkte zu erhöhen (van Lenteren & Tommasini, 2003). Wichtigste Voraussetzung für die Entwicklung dieses Marktes war jedoch die Aufhebung der Zollschränken durch Einführung des gemeinsamen Europäischen Marktes und die Verbreitung der Kurierdienste, wodurch heute Produkte innerhalb von 1-2 Tagen überall in Europa zum Anwender geliefert werden können.

Nutzung von Mikroorganismen im Pflanzenschutz

Vergleichsweise in den Kinderschuhen steckt die Anwendung von mikrobiellen Pflanzenschutzmitteln. Bis in die 80-iger Jahre kannte man nur ein wichtiges biologisches Pflanzenschutzmittel, nämlich *Bacillus thuringiensis* (Bt), das etwa 95% des gesamten Marktes für biologische Pflanzenschutzmittel darstellte. Heute hat sich die Situation zugunsten von Nutzarthropoden geändert, die einen Anteil von 55% am jährlichen Gesamtumsatz in Europa haben, während mikrobielle Mittel auf 25% zurückgegangen sind, mit einem Umsatz von ca. 30 Millionen €. Davon wiederum ist der größte Anteil Bt. Trotz großer Anstrengungen einiger Unternehmen, in Europa Pflanzenschutzmittel auf der Basis von Mikroorganismen zuzulassen, ist die Anwendung bisher noch wenig entwickelt. In Tabelle 2 sind Mikroorganismen aufgeführt, die auf dem Annex 1 (EU Direktive 91/414) gelistet sind, bzw. die im Zulassungsverfahren sind. In Tabelle 3 sind solche Mikroorganismen verzeichnet, für die nach dem Liste-4-Verfahren eine Neuzulassung beantragt wurde, also Organismen, die vor dem 26.7.1993 eine Zulassung in einem EU Mitgliedsland hatten.

Das Potenzial von Mikroorganismen kann dem Pflanzenschutz auf vielfältige Art und Weise zu Gute kommen. Sie werden genutzt als

- Antagonisten im biologischen Pflanzenschutz
- Lieferanten von fungiziden, herbiziden und insektiziden Metaboliten für den Pflanzenschutz
- Quelle für Resistenzgene für die Pflanzenzüchtung

In erster Linie nutzt der biologische Pflanzenschutz die antagonistischen Potenziale dieser Organismen (Tab. 4). Mikroorganismen sind aber ebenso Lieferanten von Metaboliten, die im Pflanzenschutz genutzt werden können. Spinosyns A und D, die insektiziden Wirkstoffe im Produkt Spinosad (Dow Agro Inc., USA), sind Metabolite des Actinomyceten *Saccharopolyspora spinosa*. Sie werden aus der Fermentationsbrühe des Bakteriums aufgereinigt (Thompson et al., 2000). Für die Entwicklung der fungiziden Wirkstoffgruppe der Strobilurine diente ein Metabolit des Kiefernzapfenröhlings (*Strobilurus tenacellus*) als Ausgangssubstanz (Konradt et al. 1996).

Eine dritte Möglichkeit der Nutzung von Mikroorganismen ist die Identifikation und der Transfer von Genen in der Pflanzenzüchtung. Gene, die für die Bt Toxine kodieren, wurden in Kulturpflanzen übertragen, um so Resistenz gegen Insektenfraß zu erreichen (Peferoen, 1997). Toxingene des Bakteriums *Photobacterium luminescens*, ein Symbiont insektenpathogener Nematoden der Gattung *Heterorhabditis* (nematop, e-nema GmbH), wurden inzwischen ebenfalls genutzt, die Resistenz von Pflanzen gegen Insekten zu erreichen (Liu et al., 2003).

Zum Einsatz als Antagonisten kommen Viren, Bakterien und Pilze. Andere Pathogene, zum Beispiel insektenpathogene Einzeller (Mikrosporidien), können häufig nicht *in vitro* vermehrt werden, weshalb sie nur schwer in ausreichenden Mengen zu konkurrenzfähigen Preisen bereitgestellt werden können. Die Wirkungsmechanismen sind vielfältiger Art und oft noch nicht vollständig aufgeklärt. Pilze der Gattungen *Trichoderma* (z.B. Trianium, Koppert BV, NL) und *Gliocladium* (Prestop, Verdera Oy, FIN) können mit Hilfe lytischer Enzyme in die Hyphen pflanzenpathogener Pilze eindringen und diese parasitieren (**Hyperparasitismus**).

Nachgewiesen wurde auch die Rhizosphärenkompetenz dieser Antagonisten, d.h. dass diese Pilze sich im Laufe des Wurzelwachstums auf der Oberfläche ihrer Wirtspflanze ausbreiten und damit nachwachsendem Gewebe ebenfalls Schutz bieten. Wie die meisten Mikroorganismen fördern sie das Wachstum der Pflanze und induzieren pflanzliche Resistenzmechanismen zur Abwehr von Pathogenbefall (Harman, 2006). Die Pilze *Coniothyrium minitans* (Contans, Prophyta GmbH) (Whipps & Gerlagh, 1992) und *Ampelomyces quisqualis* (AQ10, Intrachem SpA, I) (Falk et al., 1995) sind ebenfalls parasitisch, wobei ersterer die Überdauerungsorgane des Schadpilzes, die Sklerotien, als Nahrungsgrundlage nutzt.

Antibiose durch Toxine und Antibiotika sind andere wichtige Wirkungsmechanismen. Stämme von *B. subtilis* (Serenade, Agraquest Inc., USA; FZB 24, ABiTEP GmbH) produzieren fungizide Wirkstoffe (u.a. Bacilysin), die in Kontakt mit potenziellen phytopathogenen Pilzen abgesondert werden und die Konkurrenzkraft des Bakteriums erhöhen und den Schaderreger in der Ausbreitung behindern (Loeffler et al., 1986). Aromatische Heptaenpolyene (AHPs) sind fungizide Antibiotika, die von *Streptomyces griseoviridis* (Mycostop, Verdera Oy, FIN) produziert werden (Raatikainen et al., 1994). Pilztoxine sind auch an der Abtötung von Insekten beteiligt. *M. anisopliae* (z.B. Teanure, Earth Bioscience Inc., USA) dringt in das Haemocoel von Wirtsinsekten mittels

Proteinasen und Chitinasen vor und gibt dann Destruixine ab, die die Haemozyten letal schädigen (Vey et al., 2001). Toxine sind auch die Ursache der insektiziden Wirkung von Bt (z.B. Xentari, Valent Bioscience Inc., USA).

Tab. 2: Pflanzenschutzmittel auf der Basis von Mikroorganismen, für die eine Zulassung nach EU Direktive 91/414 erteilt wurde (+ = gelistet auf Annex 1) oder die sich im Zulassungsverfahren befinden (-)

Handelsname	Firma	Mikroorganismus	Anwendung	Ann. 1
Preferal	Biobest, B	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Antagonist Weiße Fliege	+
Contans	Prophyta, D	<i>Coniothyrium minitans</i>	Parasit der Sklerotien von <i>Sclerotinia</i> spp.	+
Cedomon	Bioagri, S	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Beizung von Getreide gegen samenbürtige Erreger	+
Prestop	Verdera, FIN	<i>Gliocladium catenulatum</i>	Multifunktionseller Parasit von Pilzpathogenen	+
AQ 10	Intrachem, I	<i>Ampelomyces quisqualis</i>	Parasit von <i>Oidium tuckeri</i>	+
Serenade	Agraquest, USA	<i>Bacillus subtilis</i>	Breitwirksames Fungizid	-
Bioact	Prophyta, D	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Nematodenantagonist	-
Sporodex	Plant Products, CAN	<i>Pseudozyma flocculosa</i>	Gegen Mehltau	-
Spod-X	Certis, B	<i>Spodoptera exigua</i> NPV	Virus von <i>Spodoptera exigua</i>	-
BOC-1	Bio-Oz, ISL	Zucchini Yellow Mosaic Virus	Milde Variante des ZYMV für Prämunisierung	-

Der wahrscheinlich wichtigste Wirkungsmechanismus der gegen Pflanzenkrankheiten eingesetzten Antagonisten ist die **Resistenzinduktion**. Im Gegensatz zu den Pflanzenpathogenen, die bei Befall der Pflanze ebenfalls Resistenzmechanismen der Wirtspflanze induzieren können, verursachen antagonistische Mikroorganismen keine Schadsymptome. Im biologischen Pflanzenschutz eingesetzte Antagonisten sind aus der Rhizosphäre isolierte, sogenannte PGPR („plant growth promoting rhizobacteria“) oder PGPF („plant growth promoting fungi“) oder sie wurden aus Pflanzenmaterial isoliert (Endophyten). Die Assoziation mit den Pflanzen hat symbiotische Eigenschaften.

Tab. 3: Mikroorganismen, die vor dem 27.7.1993 in einem Mitgliedsstaat zugelassen waren und für die gegenwärtig eine Zulassung nach 91/414 läuft (Liste 4)

Mikroorganismus	Anwendung
<i>Cydia pomonella</i> Granulosis Virus	Gegen Apfelwickler (<i>Cydia pomonella</i>)
<i>Bacillus thuringiensis – aizawai</i>	Gegen Lepidopteren
<i>Bacillus thuringiensis - israelensis</i>	Gegen Nematoceren
<i>Bacillus thuringiensis - kurstaki</i>	Gegen Lepidopteren
<i>Bacillus thuringiensis - tenebrionis</i>	Gegen Kartoffelkäfer (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)
<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Antagonistisches Bakterien gegen Fusariosen und <i>Pythium</i>
<i>Beauveria bassiana</i>	Gegen bodenlebende Schadinsekten
<i>Beauveria brongniartii</i>	Gegen Engerlinge des Maikäfers
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Gegen bodenlebende Schadinsekten
<i>Phlebiopsis gigantea</i>	Konkurrenz um Infektionsstellen der Rotfäule (<i>Heterobasidion annosum</i>) im Forst
<i>Pythium oligandrum</i>	Hyperparasitismus bei <i>Pythium ultimum</i>
<i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma polysporum</i> <i>Trichoderma viride</i>	Multifunktionelle Hyperparasiten von Pilzkrankheiten mit wachstumsfördernden Eigenschaften, etc.
<i>Verticillium dahliae</i>	Resistenzinduktion gegen Ulmensterben <i>Ophiostoma novo-ulmi</i>
<i>Verticillium lecanii</i>	Antagonistischer Pilz gegen Weiße Fliege, Thrips und Blattläuse

Die Mikroorganismen werden durch Wurzelexudate angelockt und profitieren von der Nährstoffdichte in der Rhizosphäre. Nützlich für die Pflanze sind ihre „immunisierenden“ Eigenschaften ebenso wie die Wachsförderung. Die Induktion der Resistenz wird durch eine Vielzahl von Elicitoren ausgelöst. Von Gram-negativen Bakterien ist bekannt, dass z.B. Siderophore von *Pseudomonas* spp. Resistenz induzieren. Lipopolysaccharide (LPS), Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien, sind ebenso als Elicitoren identifiziert worden (van Loon et al. 1998), wie N-Acyl-L-Homoserin Laktone (AHL), die Gram-negative Bakterien synthetisieren und abgeben, um ihren Artgenossen die

Populationsdichte zu signalisieren (Quorum Sensing) (Schuhegger et al., 2006). Die durch antagonistische Mikroorganismen hervorgerufene induzierte systemische Resistenz löst unterschiedliche Resistenzreaktionen in der Pflanze aus, die sich von denen durch potenzielle Pathogene hervorgerufenen Abwehrmechanismen nicht wesentlich unterscheiden. Am Modell *Arabidopsis thaliana* werden mit Hilfe molekulargenetischer Methoden die systemische Resistenzinduktion, die Abwehrmechanismen der Pflanze und Interaktion der Antagonisten mit der Wirtspflanze immer weiter entschlüsselt (z.B. Pieterse et al., 2002; Iavicoli et al., 2003).

Tab. 4: Schutz vor Pflanzenpathogenen: Wirkungsmechanismen antagonistischer Bakterien und Pilze

Wirkungsweise	Mechanismen	Beispiel
Hyperparasitismus	Invasion und Wachstum im Wirt	<i>M. anisopliae</i> , <i>Trichoderma</i> spp.
Antibiose	Abtötung des Wirts durch Antibiotika, Toxine, Enzyme	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Streptomyces griseoviridis</i>
Resistenzinduktion	Elicitoren der Antagonisten regen gesteigerte Pflanzenabwehr an	<i>Bacillus subtilis</i> , v.a.
Wachstumsförderung	Produktion von Pflanzenhormonen	<i>Serratia plymuthica</i> , v.a.
Konkurrenz um Raum und Nährstoffe	Besiedlung von potentiellen Angriffsflächen der Pathogene	<i>Phlebiopsis gigantea</i>

Eine **Wachstumsförderung** bei der Pflanze wird bei vielen antagonistischen Mikroorganismen beobachtet. Da Pflanzen besonders im Jungstadium für Pathogene anfällig sind, ist dieser Effekt besonders vorteilhaft, da die Pflanzen den Pathogenen „davonwachsen“ (disease escape effect). Diese Wirkung wurde z.B. bei *Pseudomonas chlororaphis* (Cedomon, Bioagri, S) nachgewiesen, das im Getreide als Beizung gegen samenbürtige Krankheitserreger eingesetzt wird. Auch das Bakterium *Serratia plymuthica* (Rhizostar, e-nema GmbH) hat diese Effekte bei Raps und Erdbeeren durch Produktion des Pflanzenhormons Indol-3-Essigsäure (Kurze et al., 2001). Die Synthese von Pflanzenhormonen (Auxine, Zytokine, Gibberelline) wurden ebenfalls bei Rhizosphärebakterien und Endopyhten nachgewiesen (Frankenberger & Arshad, 1995; Bottini et al., 2004). Die Wachstumsförderung durch PGPR kann auch indirekt erfolgen, z.B. durch Unterdrückung des Wachstums von Pflanzenpathogenen. Nährstoffe, Mineralien und Infektionsstellen auf der Wurzel sind bereits durch den Antagonisten besetzt, wobei die Synthese von Toxinen und Antibiotika die **Konkurrenzkraft** der Antagonisten noch verstärkt. Andererseits sind PGPR auch in der Lage, Nährstoffe für die Pflanze besser verfügbar zu machen.

Gentechnische Methoden zur Optimierung von Mikroorganismen

Gentechnische Methoden zur Optimierung biologischer Pflanzenschutzmittel wurden bisher nur selten eingesetzt. Die bestehenden Zulassungsbedingungen für Mikroorganismen verursachen erhebliche Kosten, weshalb Firmen gar kein Interesse daran haben, ihre Organismen gentechnisch zu bearbeiten und damit die Zulassung auch noch zu erschweren. Im Übrigen würde ein wichtiger Kundenkreis, der biologisch-organische Landbau, wegfallen. Die grundsätzliche Möglichkeit der Optimierung von biologischen Pflanzenschutzmitteln existiert selbstverständlich und soll deshalb hier kurz am Beispiel von Bt behandelt werden, wobei die Nutzung von Bt Genen in transgenen Pflanzen nicht Gegenstand dieser Abhandlung ist.

Bt Stämme aus vier Unterarten, *kurstaki*, *aizawai*, *tenebrionis* und *israelensis* sind in den heutigen Produkten enthalten. Die Wirkung basiert auf den Proteinkristallen (Abb. 1), die während der Ausbildung der Sporen synthetisiert werden. Die entsprechenden Gene sind i.a. auf Plasmiden lokalisiert und werden als Kristallgene (Cry1 bis Cry50) bezeichnet. Die Diversität der Cry Genfamilie ist hoch (http://www.lifesci.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/), mehr als 200 Gene wurden sequenziert. Innerhalb dieser Hauptgruppen werden weitere Unterschiede auf der Basis von Sequenzunterschieden gemacht. Dieses Potenzial ist weitgehend ungenutzt.

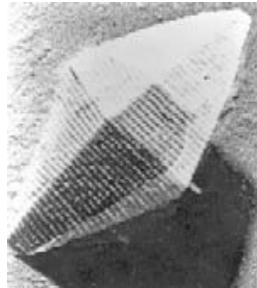


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Kristallproteins mit Aktivität gegen Lepidopteren (Foto: *Bacillus thuringiensis* Toxin Specificity Database, Canada)

Bt Produkte reagieren im Vergleich zu synthetischen Insektiziden langsamer. Ihr Wirtsspektrum ist begrenzt und sie werden im Feld durch Sonnenlicht sehr schnell inaktiviert. Zudem sind erstmals im Freiland Resistenzen bei *Plutella xylostella* beobachtet worden (van Rie & Ferre, 2000). Um diese Nachteile zu überwinden, wurde versucht, Bt Produkte zu verbessern. Zunächst wurde durch Konjugation versucht, die Plasmide so zu kombinieren, dass Stämme mit einem breiteren Wirtsspektrum dabei herauskamen. Konjugation ist ein natürlicher Paarungsvorgang bei Bakterien, wobei Plasmide von einer Zelle (Donor) in die andere Zelle (Rezipient) gelangen können. Mit Hilfe dieser Technik wurde z.B. ein Produkt (Foil, Ecogen Inc.) mit Aktivität gegen Lepidopteren und gegen Kartoffelkäfer erzeugt. Ein weiteres Produkt (MVP der Firma

Mycotec Inc.) kam in den USA auf den Markt. Um den Abbau des Proteintoxins bei Sonneneinstrahlung zu verringern, wurde die Gensequenz für die Produktion des Toxins in *Pseudomonas fluorescens* übertragen. Pseudomonaden lagern Pigmente in der Zellmembran ein, was sie vor UV Strahlung schützt. Das Toxin wurde mittels dieses Bakteriums produziert und bei Abschluss der Fermentation wurde das Bakterium abgetötet, wodurch das Toxin damit in die pigmentierte Zelle eingepackt war (Sanchis, 2000). Ein interessanter Ansatz wurde von der Firma Crop Genetics International verfolgt. Sie transferierten Cry Gene in das endophytische Bakterium *Clavibacter xyli*, das im vaskulären System in Maispflanzen lebt. Saatgut wurde mit den Bakterien behandelt (Produktname InCide). Erreicht wird damit ein Schutz gegen den Maiszünsler, der aufgrund seiner Lebensweise im Inneren der Maispflanze sonst nur sehr schwer zu bekämpfen ist (Lampel et al., 1994). Da Bt im Boden nicht eingesetzt werden kann, gab es auch Überlegungen, Cry Gene in Rhizobien zu transferieren und so Schutz gegen den Bodenschädling *Sitona* sp. an Leguminosen zu erreichen (Skot et al., 1990). Denkbar ist auch eine Bekämpfung der Resistenz, die mit einer Modifikation des Rezeptors in der Darmwand des Insekts korreliert. Sollte es gelingen, die Toxinsequenz so zu ändern, dass sie an den mutierten Rezeptor ankoppelt, könnte so die Resistenz überwunden werden. Da es jedoch keine Kreuzresistenz bei Bt Toxinen mit unterschiedlichen Rezeptoren gibt, kann das Problem bisher auch durch Produktwechsel zu einem Stamm mit Toxinen, die an andere Rezeptoren binden, gelöst werden. Was hier zunächst nur für Bt beschrieben wurde, wäre auch für andere Antagonisten denkbar, sofern die Wirkungsmechanismen aufgeschlüsselt werden können. In dieser Hinsicht ist jedoch Bt bisher einzigartig und die gentechnische Optimierung von anderen Mikroorganismen für den biologischen Pflanzenschutz ist deshalb in nächster Zukunft eher unwahrscheinlich.

Biotechnische Methoden zur Produktion von Mikroorganismen und Nematoden

Voraussetzung für die Entwicklung von biologischen Pflanzenschutzmitteln ist die Möglichkeit der kostengünstigen Massenproduktion der Antagonisten und ihre möglichst verlustfreie Lagerung. Einige Pilzstämme (z.B. *Metarhizium anisopliae*) produzieren nur in Feststoffkultur infektiöse Sporen, müssen also auf Feststoffmedien produziert werden, was die Handhabung und damit die Arbeitskosten für den Produktionsprozess erhöht. Die Firma Prophyta (www.prophyta.de) hat eine einzigartige Technologie zur Massenproduktion filamentöser Pilze auf Festsubstrat entwickelt. In ihrer Anlage können bis zu 500 kg pilzliche Biomasse pro Tag produziert werden.

Sofern die Vermehrung jedoch in Flüssigmedien möglich ist, eignen sich für die Herstellung von Mikroorganismen und auch für insektenpathogenen Nematoden die Nutzung so genannter Bioreaktoren, wie sie in der Pharma- und Nahrungsmittelindustrie Verwendung finden. Für Nematoden mussten diese Verfahren jedoch erst entwickelt werden (Ehlers, 2001).

Die Produktion beginnt mit der Herstellung von Reinkulturen. Im nächsten Schritt werden die Organismen zunächst in Erlenmeyerkolben vorgezogen und dann in

Reaktoren im Labormaßstab überführt (Abb.1). Ist die Kultur erst einmal in diesen Bioreaktoren, laufen alle weiteren Prozessschritte im „Scaling-up“ in geschlossenen Systemen, d.h. die Inokulumkultur aus dem kleineren Gefäß wird über dampf-sterilisierte Leitungen in den nächst größeren Bioreaktor übertragen, wodurch das Kontaminationsrisiko erheblich reduziert wird. Die wichtigsten Prozessfaktoren (Sauerstoffkonzentration, Temperatur, Druck, pH, Drehzahl des Rührwerks) werden mit Messsonden erfasst und an den Prozessrechner weitergeleitet, der die Werte mit den Sollwerten abgleicht und entsprechend seinen Vorgaben den Prozess regelt. Dieser Rechner ist über das Intranet mit der gesamten Anlage vernetzt und kann im Idealfall von den Betreibern jederzeit über das Internet erreicht und notfalls nachjustiert werden. Die Prozessdauer beläuft sich bei Bakterien auf 1-3 Tage, bei Pilzen auf 2-5 Tage und bei Nematoden auf 10-16 Tage. Aufgrund der hohen Investitionskosten für Bioreaktoranlagen (im Prinzip ist jeder größere Bioreaktor ein Prototyp und die Kosten sind entsprechend hoch) und für die Peripherie (Steuer- und Regelungstechnik, Kompressoren, Dampfgeneratoren, Kühlanlagen, Ernte- und Lagermaschinen), ist neben den Medienkosten der Posten für den Kapitaldienst je nach der Anzahl Prozessstage der zweitwichtigste Kostenfaktor. Mit der Größe der Anlage reduzieren sich die Arbeitskosten, sofern auch die Reinigung der Behälter automatisiert werden kann, da eine Person in etwa den gleichen Aufwand betreibt für die Produktion in einer Pilotanlage (bis ca. 1.000 Liter) wie in einer industriellen Anlage (mehrere Kubikmeter).

Nach Abschluss des Wachstums schließt sich das so genannte „downstream processing“ an. Im Allgemeinen wird für die Produktion biologischer Pflanzenschutzmittel weniger Aufwand notwendig, da die Zellmasse durch einfaches Zentrifugieren aufkonzentriert werden kann und dann für die Haltbarmachung durch Trocknungsverfahren oder Kühlung zur Verfügung steht. Für einige Organismen kann selbst dieser Prozessschritt eingespart werden, da die Fermentationsbrühe direkt weiterverarbeitet werden kann. Wird dagegen ein Metabolit aus der Fermentationsbrühe gewonnen (z.B. Spinosad), schließen sich kostenträchtige Aufreinigungsschritte an.

Kritisch für biologische Pflanzenschutzmittel ist häufig ihre Lagerung. Gelingt die Entwicklung von Trocknungsverfahren, d.h. die Organismen tolerieren niedrige Wasseraktivitäten, dann kann man die Produkte durch Sprüh-, Wirbelschicht- oder Gefriertrocknung konservieren. Nematoden sind diesen Verfahren nicht zugänglich und werden deshalb „frisch“ vermarktet. Nur die entsprechende Transportlogistik kann sicherstellen, dass solche Produkte den Anwender in hoher Qualität erreichen. Gram-negative Bakterien können ebenfalls nicht getrocknet werden und sind deshalb nur sehr begrenzt haltbar zu machen. Gram-positive Bazillen und die meisten Pilze lassen sich dagegen lange lagern und die Formulierung und Vermarktung ist dadurch erheblich erleichtert. Das Einmischen von Zusatzstoffen kann die Lebensdauer aller Produkte sowohl im Lager als auch auf dem Feld erheblich verlängern und ihre Wirkung steigern (Burges, 1998).

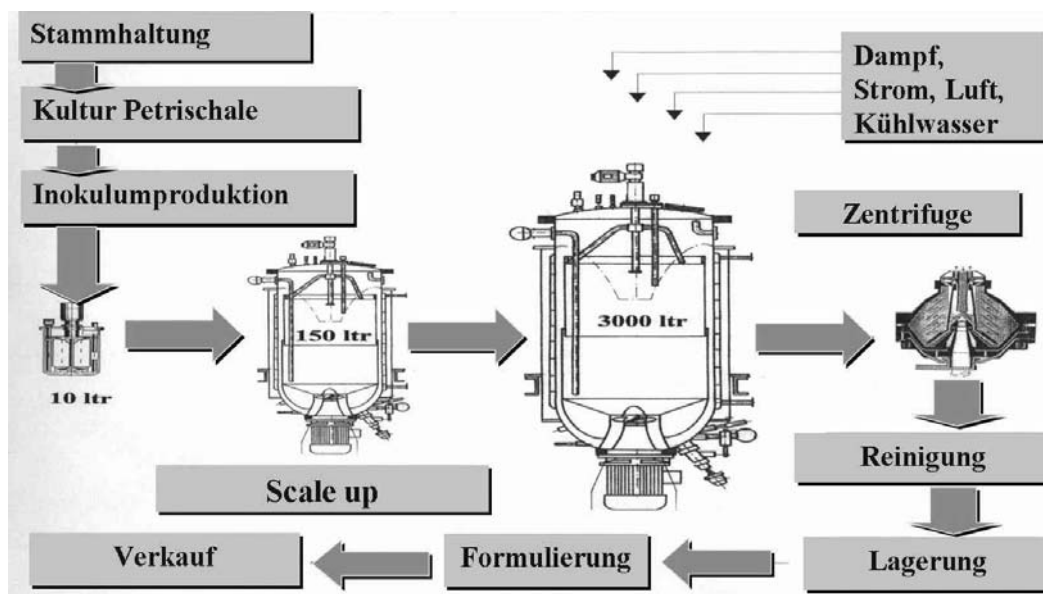


Abb. 2: Biotechnischer Produktionsprozess für Mikroorganismen und Nematoden

Sozioökonomische Aspekte im biologischen Pflanzenschutz

Die Funktion und das Potenzial der Mikroorganismen sowohl in der Pflanze (Endophyten) als auch in der Rhizosphäre beginnt man gerade erst zu entschlüsseln. Berücksichtigt man, dass nur ca. 5% der Organismen in der Rhizosphäre überhaupt kultiviert werden können und somit ihre Biologie zugänglich wird, aber kaum Kenntnisse über nicht-kultivierbare Arten vorliegen, kann man erahnen, welche Potenziale für die Pflanzenproduktion noch ungenutzt sind. Selbst die bekannten Organismen werden bisher noch wenig eingesetzt. Dafür gibt es verschiedene Gründe, die mit der Struktur des Marktes für biologische Pflanzenschutzmittel zu tun haben. Alle Firmen, die sich dem Thema widmen, sind KMUs, die nur über sehr limitierte finanzielle Ressourcen für F&E und Vermarktung verfügen. Die meisten handeln nur mit einzelnen Produkten, was ein kosteneffizientes Marketing erschwert. Einige dieser Firmen verfügen über Sammlungen von Mikroorganismen und Ergebnisse aus assoziierten Forschungseinrichtungen, können diese aber nicht in die Vermarktung bringen. Aufgrund des kleinen Produktportfolios sind die Umsätze niedrig. Biologische Pflanzenschutzmittel zeichnen sich durch eine hohe Wertspezifität aus - ökologisch ein Vorteil, ökonomisch ein Nachteil, da der Markt auch entsprechend klein ist.

Größtes Hindernis für die Vermarktung stellt das Zulassungsverfahren dar. Die EU Richtlinie 91/414 regelt das Zulassungsverfahren in der EU. Sie wurde ursprünglich für synthetische Wirkstoffe entwickelt, wurde aber ebenso auf mikrobielle Pflanzenschutzmittel übertragen, obwohl keine vergleichbaren Risiken mit der

Anwendung von Mikroorganismen im Pflanzenschutz identifiziert wurden. Überregulierung hat die Umsetzung des wissenschaftlichen Fortschritts in die Praxis erheblich behindert, so dass heute kein Europäisches Unternehmen neue Mikroorganismen für den Pflanzenschutz zur Zulassung bringt. Was den biologischen Pflanzenschutz betrifft, war das Pflanzenschutzrecht den potenziellen Risiken nicht angepasst. Die Richtlinie wurde deshalb für Mikroorganismen angepasst (EU Dir. 2001/36 und 2005/25). Trotz dieser Bemühungen der EU Behörde (SANCO), die Regeln den besonderen Eigenschaften von Mikroorganismen anzupassen, dauert die Zulassung im Vergleich z.B. zu den USA ca. dreimal länger. Den Firmen fehlen die Einnahmen aufgrund der Verzögerung der Zulassung auf EU Ebene und weitere Zeitverluste ergeben sich durch die anschließenden nationalen Zulassungen. Der wissenschaftliche Fortschritt auf dem Gebiet kann nicht entsprechend umgesetzt werden. Viele potenzielle Antagonisten schlummern in den Kultursammlungen der Wissenschaftler. Kaum ein Organismus schafft es aus dem Labor auf den Markt. Nur solche Firmen haben in Europa Zulassungen von Produkten auf der Basis von Mikroorganismen beantragt, die finanzkräftige Partner im Hintergrund haben oder erhebliche Fördermittel zur Verfügung hatten. Andere Firmen wiederum trauen sich gar nicht erst an die Beantragung der Zulassung und haben ihre Geschäftsaktivitäten in andere Bereiche verlagert. Eine von der EU geförderte Aktion (REBECA – Regulation of Biological Control Agents; www.rebeca-net.de) will jetzt versuchen, alternative Vorschläge für die Regulierung zu erarbeiten, um die Verfügbarkeit dieser Produkte (auch Pheromone, Nützlinge und Pflanzenextrakte) zu verbessern (siehe auch www.rebeca-net.de).

Ausblick

Betrachtet man die Methoden, die für die Umsetzung des biologischen Pflanzenschutzes genutzt werden, kann man den biologischen Pflanzenschutz insgesamt der Biotechnologie zuordnen. Die Produktion großer Mengen von invertierten Nützlingen ist ebenso wie die *in vitro* Produktion von Mikroorganismen nur unter Nutzung biotechnologischer Methoden möglich. Auf diesem Sektor wurden in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte erzielt und der biologische Pflanzenschutz spielt heute eine zunehmende Rolle sowohl im Gartenbau als auch in der Landwirtschaft. Der dramatischen Entwicklung von Resistenzen gegen Insektizide im Gemüsebau, begleitet von der Problematik der Belastung mit Rückständen von chemischen Pflanzenschutzmitteln in Lebensmitteln, kann durch Integration des biologischen Pflanzenschutzes in die Bekämpfungsstrategien entgegen gewirkt werden. Die Rahmenbedingungen, die durch Zulassungsverfahren auferlegt werden, behindern jedoch die optimale Nutzung der Technologie. Unsere moderne Gesellschaft ist eine „Risikogesellschaft“ geworden. Man lässt sich bei dem Management der potenziellen Risiken eher von dem Vorsorgeprinzip leiten, als wissenschaftlichen Erkenntnissen und Erfahrungen zu vertrauen. Wissenschaftliche Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Risiken beim Einsatz des biologischen Pflanzenschutzes vergleichsweise gering sind, ja die Vorteile für den

Umweltschutz massiv überwiegen. Von einer ausgewogenen Gestaltung der Zulassungsverfahren wird es in der Zukunft abhängen, ob weiterhin hohe Wachstumsraten im biologischen Pflanzenschutz erzielt werden.

Literatur

- Bottini, R., Cassan, F., Piccoli, P., 2004: Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65, 497-503.
- Brust, G.E., 1991: Augmentation of an endemic entomogenous nematode by agroecosystem manipulation for the control of a soil pest. *Agriculture Ecosystems and Environment* 36, 175-184.
- Burges, H.D., 1998: Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Cullen, J.M., 1985: Bringing the cost benefit analysis of biological control of *Chondrilla juncea* up to date. In: Proceedings VI International Symposium on Biological Control of Weeds. E.S. Delfosse (ed.) Agriculture Canada, pp. 145-152.
- Ehlers, R.-U., 2001: Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied Microbiology & Biotechnology* 56, 623-633.
- Falk, S.P., Gadoury, D.M., Cortesi, P., Pearson, R.C., Seem, R.C., 1995: Parasitism of *Uncinula necator* cleistothecia by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. *Phytopathology* 85, 794-800.
- Frankenberger, W.T., Arshad, M., 1995: Phytohormones in soils. Marcel Dekker Inc., New York.
- Frost and Sullivan, 2001: Introduction to the European Biopesticides Market. <http://www.frost.com/prod/servlet/report-homepage.pag?repid=3905-01-00-00-00>
- Grenier, S., De Clerq, P., 2003: Comparison of artificially vs. naturally reared natural enemies and their potential for use in biological control. In: J.C. van Lenteren (ed.) Quality control and production of biological control agents - Theory and testing procedures. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 115-132.
- Harman, G.E., 2006: Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma spp.* *Phytopathology* 96, 190-194.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Metraux, J.P., 2003: Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interactions* 16, 851-858.
- Julien, M.H., Griffiths, M.W., 1999: Biological Control of Weeds. A World Catalogue of Agents and their Target Weeds. CABI Publishing, Oxon, UK.
- Konradt, M., Kappes, E.M., Hiemer, M., Petersen, H.H., 1996: Amistar Reg. - a strobilurin for the control of cereal diseases. *Gesunde Pflanzen* 48, 126-134.
- Kurze, S., Bahl, H., Dahl, R., Berg, G., 2001: Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Plant Disease* 85, 529-534.

- Lampel, J.S., Canter, G.L., Dimock, M.B., Kelly, J.L., Anderson, J.J., Uratani, B.B., Foulke, J.S. Jr, Turner, J.T., 1994: Integrative cloning, expression, and stability of the cryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 501-508.
- Liu, D., Burton, S., Glancy, T., Li, Z.S., Hampton, R., Meade, T., Merlo, D.J., 2003: Insect resistance conferred by 283-kDa *Photobacterium luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology* **21**, 1222-1228.
- Loeffler, W., Tschen, J.S.M., Vanittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T.F., Wu, T.G., 1986: Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus antibiotics*. *Journal of Phytopathology* **115**, 204-213.
- Nielsen, O., Philipsen, H., 2005: Susceptibility of *Meligethes spp.* and *Dasyneura brassicae* to entomopathogenic nematodes during pupation in soil. *BioControl* **50**, 623-634.
- Nitzsche, O., Ulber, B., 1998: Einfluss differenzierter Bodenbearbeitungssysteme nach Winterraps auf die Mortalität einiger Parasitoiden des Rapsglanzkäfers (*Meligethes spp.*). *Zeitschr Pflkr Pflschutz.* **105**, 417-421.
- Peferoen, M., 1997: Insect control with transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. In: Carozzi, N., Koziel, M. (eds.) *Advances in insect control*. Taylor & Francis, London, pp. 21-48.
- Pieterse, C.M.J., Wees, S.C.M. van, Ton, J., Pelt, J.A. van, van Loon, L.C., 2002: Signalling in rhizobacteria-induced systematic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **4**, 535-544.
- Raatikainen, O.J., Paivinen, T.H., Tahvonen, R.T., 1994: HPLC separation and subsequent detection of aromatic heptaene polyenes in peat after treatment with *Streptomyces griseoviridis*. *Pesticide Science* **41**, 149-154.
- Sanchis, V., 2000: Biotechnical improvement of *Bacillus thuringiensis* for agriculture control of insect pests: benefits and ecological implications. In: Charles, J.-F., Delécluse, A., Nielsen-Le Roux, C. (eds.): *Entomopathogenic Bacteria : from Laboratory to Field Application*. Kluwer, Dordrecht, pp. 441-460.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., Hutzler, P., Schmid, M., Breusegem, F.van, Eberl, L., Hartmann, A., Langebartels, C., 2006: Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing *Rhizosphere bacteria*. *Plant Cell & Environ* **29**, 909-918.
- Skot, L., Harrison, S.P., Nath, A., Mytton, L.R., Clifford, B.C., 1990: Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* containing the delta-endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Plant and Soil* **127**: 285-295.
- Susurluk, A., 2005: Establishment and persistence of the entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. CAU Kiel.

- Thompson, G.D., Dutton, R.; Sparks, T.C., 2000: Spinosad - a case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Management Science* 56, 696-702.
- van Lenteren, J.C., Tommasini, M.G., 2003: Mass production, storage, shipment and release of natural enemies. In: J.C. van Lenteren (ed.) *Quality control and production of biological control agents - Theory and testing procedures*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 181-190.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998: Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36, 453-483.
- Van Rie, J., Ferré, J., 2000: Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein. In: Charles, J.-F., Delécluse, A., Nielsen-Le Roux, C. (eds.): *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*. Kluwer, Dordrecht, pp. 219-236.
- Vey, A., Hoagland, R., Butt, T.M., 2001: Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: T.M. Butt, C. Jackson, N. Magan (eds.) *Fungi as biocontrol agents - progress, problems and potential*. CABI Publishing, Oxon, UK, pp. 311-346.
- Whipps, J.M., Gerlagh, M., 1992: Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research* 96, 897-907.