



Schlussbericht zum Thema

EcoGuard - Regenfeste
Abgabesysteme zum Schutz der
Weinrebe vor Rebenperonospora
und Kirschessigfliege

FKZ: 2818OE039 | 2818OE002 | 2818OE041

Projektnehmer: DWI – Leibniz-Institut für
Interaktive Materialien e.V., Rheinisch-Westfälische
Technische Hochschule Aachen, Julius Kühn-Institut

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung
und Landwirtschaft auf Grund eines Beschlusses des
Deutschen Bundestages im Rahmen des
Bundesprogramms Ökologischer Landbau.

Das Bundesprogramm Ökologischer Landbau Landwirtschaft (BÖL) hat sich zum Ziel gesetzt, die Rahmenbedingungen für die ökologische und nachhaltige Land- und Lebensmittelwirtschaft in Deutschland zu verbessern. Es wird vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) finanziert und in der BÖL-Geschäftsstelle in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) in Bonn in die Praxis umgesetzt. Das Programm untergliedert sich in zwei ineinandergreifende Aktionsfelder, den Forschungs- und den Informationsbereich.

Detaillierte Informationen und aktuelle Entwicklungen finden Sie unter www.bundesprogramm.de

Wenn Sie weitere Fragen haben, wenden Sie sich bitte an:

Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung
Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau
Deichmanns Aue 29
53179 Bonn
Tel: 0228-6845-3280
E-Mail: boel@ble.de

I. Schlussbericht zum Vorhaben EcoGuard

Gefördert durch



Bundesministerium
für Ernährung
und Landwirtschaft



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Zuwendungsempfänger:	Förderkennzeichen:
DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien e.V. Forckenbeckstr. 50 52074 Aachen	2818OE039
Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen Institut für Biologie III (Pflanzenphysiologie) Worringer Weg 1 52074 Aachen	2818OE002
Julius Kühn-Institut (JKI) Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau Geilweilerhof	2818OE041

Vorhabenbezeichnung:

EcoGuard - Regenfeste Abgabesysteme zum Schutz der Weinrebe vor Rebenperonospora und Kirschessigfliege

Laufzeit des Vorhabens: 05.06.2019 bis 31.05.2023

Kontaktdaten der Projektpartner

RWTH Aachen University/ DWI Leibniz-Institut für Interaktive Materialien e.V., Aachen

1. Univ.-Prof. Dr. U. Conrath*, Co-PI: Dr. Patrick Schwinges
RWTH Aachen University, Institut für Pflanzenphysiologie, Worringer Weg 1, 52074 Aachen;
E-Mails: uwe.conrath@bio3.rwth-aachen.de; patrick.schwinges@rwth-aachen.de
2. Univ.-Prof. Dr. A. Pich**
DWI Leibniz-Institut für Interaktive Materialien e.V.*** & RWTH Aachen, Institut für Technische und Makromolekulare Chemie, Forckenbeckstr. 50, 52074 Aachen; E-Mail: pich@dwil.rwth-aachen.de
3. Univ.-Prof. Dr. U. Schwaneberg**, Co-PI: Dr. Felix Jakob
DWI Leibniz-Institut für Interaktive Materialien e.V.*** & RWTH Aachen, Institut für Biotechnologie, Forckenbeckstraße 50, 52074 Aachen; E-Mails: u.schwaneberg@biotec.rwth-aachen.de; f.jakob@biotec.rwth-aachen.de

Julius-Kühn-Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau, Siebeldingen (OWS)

4. Apl. Prof. Dr. Michael Fischer**, Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau, Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen; E-Mail: michael.fischer@julius-kuehn.de

5. Dr. Christoph Hoffmann**, Labor für Zoologie und integrierten Pflanzenschutz im Weinbau, Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau, Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen; E-Mail: christoph.hoffmann@julius-kuehn.de

* Projektkoordinator

** Projektpartner

*** Zuwendungsempfänger

Kurzfassung

Im integrierten, vor allem aber auch im ökologischen Pflanzenschutz, bestehen seit langem Bedarfe und regulatorische Rahmenbedingungen, die einen reduzierten und effektiveren Einsatz von Pestiziden fordern. In den voraus gegangenen, durch das Bioeconomy Science Center NRW geförderten, Projekten „BiFuProts“, „GreenGel“ und „greenRelease“ wurde der Grundstein für eine neue auf einer Kombination aus Mikrogelen und Ankerpeptiden bestehende Technologie gelegt. Diese Plattform kombiniert Mikrogele und Ankerpeptide, um Pflanzenschutzmittel effektiver und umweltfreundlicher einzusetzen. Die Mikrogele können mit verschiedenen Wirkstoffen beladen werden, insbesondere mit Kupferionen, und durch adhäsive Peptide regenfest an Pflanzenoberflächen gebunden werden. Vorangegangene Projekte haben gezeigt, dass diese Technologie den Kupfereinsatz zum Schutz von Pflanzenkulturen erheblich reduzieren kann, ohne die Schutzwirkung zu beeinträchtigen. Das EcoGuard-Projekt zielt darauf ab, die Wirksamkeit dieser Technologieplattform bei der Bekämpfung von Rebenperonospora im ökologischen Weinbau zu validieren, wobei der Kupfereinsatz reduziert wird. Darüber hinaus sollen die Mikrogele biologisch abbaubar sein und die Technologie für den ökologischen Landbau zugänglich gemacht werden. In einem weiteren Teil des Projekts wird die "GreenGel"-Plattformtechnologie verwendet, um die Wirkung von Spinosad gegen die Kirschessigfliege im ökologischen Weinbau zu verbessern. Das Projekt strebt eine nachhaltige Stärkung des ökologischen Pflanzenschutzes an und befasst sich mit der Validierung der Technologie unter ökologischen Bewirtschaftungsvorschriften. Die Ergebnisse der Labor- und Freilandversuche deuten darauf hin, dass das Mikrogel auf Pektinbasis mit Kupferionen eine vergleichbare Wirksamkeit wie herkömmliche Kupferpräparate gegen Rebenperonospora aufweist. Es gibt jedoch Herausforderungen hinsichtlich der Haltbarkeit des Mikrogels auf den Blättern. Die Effektivität von mit Spinosad beladenen Mikrokapseln wurde ebenfalls untersucht und zeigt vielversprechende Ergebnisse, obwohl einige Verbesserungen erforderlich sind, um sie zur Anwendungsreife zu bringen.

Das EcoGuard-Projekt trägt dazu bei, den Einsatz von Pestiziden im ökologischen Pflanzenschutz zu reduzieren und gleichzeitig die Schutzwirkung zu erhalten, wodurch ökologische Landwirtschaftspraktiken nachhaltiger gestaltet werden können.

Abstract

In integrated, but especially in organic crop protection, there have long been needs and regulatory frameworks that call for a reduced and more effective use of pesticides. In the previous projects "BiFuProts", "GreenGel" and "greenRelease", which were funded by the Bioeconomy Science Center NRW, the foundation was laid for a new technology based on a combination of microgels and anchor peptides. This platform combines microgels and anchor peptides to use crop protection products more effectively and in a more environmentally friendly way. The microgels can be loaded with different active ingredients, especially copper ions, and can be rainfastly bound to plant surfaces by adhesive peptides. Previous projects have shown that this technology can significantly reduce the use of copper to protect plant crops without compromising the protective effect. The EcoGuard project aims to validate the efficacy of this technology platform in controlling grapevine peronospora in organic viticulture, while reducing copper use. In addition, the microgels will be biodegradable and the technology will be made available for organic farming. In another part of the project, the "GreenGel" platform technology will be used to improve the efficacy of spinosad against cherry vinegar fly in organic viticulture. The project aims at a sustainable strengthening of organic crop protection and deals with the validation of the technology under organic management regulations. Results of laboratory and field trials indicate that the pectin-based microgel with copper ions has comparable efficacy to conventional copper preparations against grapevine peronospora. However, there are challenges regarding the durability of the microgel on leaves. The effectiveness of spinosad-loaded microcapsules has also been studied and shows promising results, although some improvements are needed to bring them to application maturity.

The EcoGuard project is helping to reduce the use of pesticides in organic crop protection while maintaining protective efficacy, making organic farming practices more sustainable.

Inhaltsverzeichnis

Kontaktdaten der Projektpartner.....	I
Kurzfassung	II
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
I. Einführung.....	1
Gegenstand des Vorhabens.....	1
Ziele und Aufgabenstellung des Projekts.....	1
Planung und Ablauf des Projekts.....	2
II. Wissenschaftlicher und technischer Stand	3
III. Material und Methoden.....	6
IV. Ausführliche Darstellung und Diskussion der wichtigsten Ergebnisse.....	10
Entwicklung der Einzelkomponenten und Anbindung der Peptide an Mikrogele	10
Synthese von Mikrogelelen und Verkapselung der Wirkstoffe	11
Studien zur Benetzbarkeit und Applikation	13
Zoosporen-Schlupftests mit <i>P. viticola</i>	14
Infektionsversuche mit Blattscheiben und Topfreben mit <i>P. viticola</i>	15
Freilandversuche mit <i>P. viticola</i>	16
Bereitstellung Spinosad für SpinoCaps-Produktion	18
Bestimmung der Wirksamkeit von SpinTor® sowie der SpinTorCaps gegenüber <i>D. suzukii</i>	18
Effektivität unter realen Bedingungen in Halbfreilandversuch mit SpinosadCaps und SpinTor® im Jahr 2021	19
Halbfreilandversuch mit drei Mikrokapsel-Kandidaten und SpinTor® im Jahr 2022	20
V. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und Verwendbarkeit der Ergebnisse	21
VI. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten und tatsächlich erreichten Ziele.....	22
VII. Zusammenfassung.....	23
VIII. Literaturverzeichnis.....	24
IX. Veröffentlichungen.....	26
Präsentationen	26
Poster	26

Abkürzungsverzeichnis

BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CS- Mikrogel	„core-shell“ Mikrogel
Cu-	Kupfer-
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
DZ	Domäne Z; Linkerpeptid aus <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“; grün fluoreszierendes Protein
Fe-	Eisen-
h	Stunde
hDerm	hDermcidin
His6	6-fach Histidin-Markierung
KEF	Kirschessigfliege
kg	Kilogramm
L	Liter
LCI	Liquid Chromatography Peak I; Peptid aus <i>Bacillus subtilis</i>
LWB	Leaf Wash Buffer
M	Molar
m	Milli 10 ⁻³ ; Meter
μ	Mikro 10 ⁻⁶
MacHis	Macaque histatin 1; Peptid aus <i>Macaca fascicularis</i>
MS	Meilenstein
N	Nano 10 ⁻⁹
Piwi	pilzwiderstandsfähig
Sping	Spingerin; Peptid aus <i>Pseudacanthotermes spiniger</i>
OWS	Julius-Kühn-Institut für Pflanzenschutz im Obst- und Weinbau, Siebeldingen
rpm	„rounds per minute“
sog.	Sogenannt
YeCBM32	Peptid aus <i>Yersinia enterocolitica</i> , dass an Polygalacturonsäure bindet

I. Einführung

Gegenstand des Vorhabens

Das Gesamtziel des Projekts ist die Validierung einer neuartigen, innovativen und regenbeständigen Abgabe-Technologieplattform (sog. „GreenGel“) zur effektiven Bekämpfung von Schadorganismen der Weinrebe bei verringertem Pestizideinsatz. Insbesondere der ökologische Weinbau soll durch das Vorhaben gestärkt werden. Als Validierungsbeispiele haben wir uns anfällige (Müller-Thurgau, Spätburgunder) und pilzwiderstandsfähige (Piwi-) Sorten (Regent, Calardis blanc) der Weinrebe ausgesucht. Als zu bekämpfende Schadorganismen wählten wir den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*, Erreger der Rebenperonospora) und die Kirschessigfliege (KEF) (*Drosophila suzukii*). „GreenGel“ besteht aus einem bioabbaubaren Mikrogel-Container (kein Mikroplastik!), der mit Wirkstoffen beladen werden kann und mit natürlich vorkommenden Peptiden (sog. Ankerpeptiden) dekoriert ist. Letztere wirken als Adhäsionsvermittler, die Mikrogele an Blättern und/oder Beeren anbinden. Da ausschließlich natürliche und bioabbaubare Komponenten eingesetzt werden, sehen wir in „GreenGel“ eine Plattform zur nachhaltigen Stärkung des ökologischen Pflanzenschutzes.

Die Alleinstellungsmerkmale der „GreenGel“-Technologie ergeben sich aus ihren Eigenschaften, Wirkstoffe universell in Containern zu verkapseln und auf verschiedene Oberflächen (z.B. auf Pflanzen) aufzubringen. Die Anbindung erfolgt aus wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur durch technisch einfache Verfahren (z.B. Sprühapplikation).

Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Im beantragten Projekt wird angestrebt zwei regenbeständige Mikrogel-Systeme für zwei Anwendungsfelder zu entwickeln:

Kupfer (Cu)-Ionen-abgebende Mikrogele zum Schutz vor der Rebenperonospora.

Im Gegensatz zu derzeitigen Cu-basierten Pflanzenschutzprodukten (v.a. Cu-Hydroxid, Cu-Sulfat) sind Cu-Ionen im Mikrogel durch spezifische Liganden komplexiert, vor äußeren Einflüssen weitgehend geschützt und durch Regen kaum abwaschbar. Weitere Möglichkeiten zur Kupferreduktion bieten Mikrogele, in denen Cu-Ionen bedarfsgerecht (z.B. nach Regen oder Morgentau) freigesetzt werden.

Spinosad-Abgabesysteme mit UV-Schutz zur wirksamen Bekämpfung der KEF.

Dieser Ansatz erfordert die Entwicklung von Mikrogelen, in denen eingeschlossene Wirkstoffe vor Licht geschützt sind. Dazu werden umweltverträgliche UV-Schutzkomponenten (z.B. Sinapatester) in die Mikrogele eingelagert, um die Halbwertszeit des „low risk“-Insektizids Spinosad (derzeit nur ein Tag bei Feuchtigkeit und Sonneneinstrahlung) zu erhöhen. Im Erfolgsfall werden die in Spinosad aktiven, natürlichen Wirkstoffe Spinosyn A und D außerdem im Mikrogel vor dem Abwaschen durch Regen geschützt.

Das Vorhaben zielt bewusst auf die Entwicklung zweier verschiedener Abgabesysteme für unterschiedliche Wirkstoffe (Kupfer und Spinosad) und Anwendungsfelder (Rebenperonospora und KEF) ab, um die Wahrscheinlichkeit eines Anwendungserfolgs im Freiland zu erhöhen. Zudem wird eine erfolgreiche Weiterentwicklung der „GreenGel“-Technologie durch die Implementierung von lichtabschirmenden Substanzen in die Mikrogele die Anwendungsbereiche im Pflanzenschutz erweitern. Für die Herstellung von Cu-Ionen abgebenden Mikrogel-Systemen kann auf die Erfahrung

bei der gelungenen Entwicklung von Abgabesystemen für die Blattdüngung mit Eisen(Fe)-Ionen¹ zurückgegriffen werden. Cu- und Fe-Ionen werden beide über ionische Wechselwirkungen mit Carboxylatgruppen im Mikrogel angebunden, so dass ein rascher Technologietransfer für die Anwendung im Weinbau und eine Validierung der Wirksamkeit im Freiland zu erwarten ist. Die Implementierung von UV-Schutzkomponenten in Mikrogele ist eine anspruchsvolle, technologische Weiterentwicklung. Zur Validierung der Schutzwirkung von Spinosad-Abgabesystemen werden daher zunächst „Halbfreilandversuche“ durchgeführt.

Das hauptsächliche Ziel von „EcoGuard“ ist die Validierung der „GreenGel“-Technologie für die Nutzung im Freiland am Beispiel der oben genannten Weinsorten gegen die Rebenperonospora und die KEF. Die dazu nötigen Produktions- und Applikationstechnologien von mit Cu-Ionen oder mit Spinosad beladenen Mikrogele werden im beantragten „EcoGuard“-Projekt entwickelt und auf ihre Wirksamkeit in der Praxis untersucht. Im sehr wahrscheinlichen Erfolgsfall werden wir die „GreenGel“-Technologie für den ökologischen Weinbau zugänglich zu machen. Um Verzögerungen bei der späteren Zulassung zu vermeiden, werden wir bereits im ersten Projektjahr den Kontakt zum Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) suchen. Zur Verwertung der „GreenGel“-Technologie werden zwei Strategien verfolgt: (1) die Gründung eines Hochschul-Start-Ups und (2) Lizensierungen insbesondere für großflächig angebaute Kulturpflanzen (z.B. Weizen, Mais). Außerdem werden wir den kontinuierlichen Austausch und Wissenstransfer mit dem Netzwerk „VitiFit“ und anderen relevanten Akteuren sicherstellen.

Planung und Ablauf des Projekts

Die Planung des Projektes fand in Meilensteinen (MS) statt, welche in den einzelnen Projektjahren erreicht werden sollten. Es kam zu Verzögerungen im Ablauf, da Maßnahmen, welche aufgrund der Covid19-Pandemie getroffen wurden, zu zeitlich begrenzten Schließungen der öffentlichen Einrichtungen führten. So konnte eine ausreichende Menge der Mikrogel-Formulierung für Freilandversuche erst mit Verspätung zur Verfügung gestellt werden. Eine Verlängerung der gesamten Projektlaufzeit wurde daraufhin genehmigt.

Für den Projektteil Rebenperonospora konnte der dritte MS erreicht werden. Die bio-basierte Mikrogel-Formulierung auf Pektin-Basis wurde im Freiland getestet, dabei wurde aufgrund des deutschlandweiten, geringen Infektionsdrucks auf Versuche an einem zweiten Standort verzichtet. Stattdessen wurden weiterführende Versuche an Topfpflanzen und im Labor durchgeführt und die Schutzwirkung des Mikrogele validiert. Da die verlängerte Haltbarkeit der Gelformulierung auf den Rebblättern nicht nachgewiesen werden konnte, fällt die Erstellung eines Merkblattes zu Handlungsempfehlungen und auch die Rückstandsanalytik weg.

II. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Cu-Fungizide zur Bekämpfung der Rebenperonospora

Die Rebenperonospora kann in Deutschland Ernteauffälle von bis zu 50 % verursachen (EcoVin, persönliche Mitteilung). Um dies zu verhindern, werden im ökologischen Weinbau meist mehr als 10 Cu-Behandlungen/Jahr durchgeführt². Cu-Ionen bekämpfen *P. viticola* effektiv und haben den Vorteil, dass sich keine Resistenzen beim Krankheitserreger ausbilden. Außerdem verleiht derzeit kein anderer Wirkstoff einen ähnlich breiten Schutz³. Grundsätzlich bestehen keinerlei Bedenken gegenüber Rückständen von Kupfer im Endprodukt Wein. Dies beruht auf der Cu-adsorbierenden Wirkung der bei der Weinerzeugung eingesetzten Hefen; frisch gepresste Moste haben einen Cu-Gehalt von 0,5 - 5 mg/L Cu, die in Jungweinen weniger als 0,1 mg/L betragen⁴. Mehrjährige Cu-Anwendungen können aber zur Akkumulation von Cu-Ionen im Boden und in Gewässern führen und die Biodiversität bedrohen^{3,5}. Deshalb werden Cu-basierte Pflanzenschutzmittel derzeit nur in einer vom Gesetzgeber auferlegten Höchstmenge von 3-4 kg/ha/a (abhängig von der Kultur) eingesetzt⁶, die kaum einzuhalten ist (z.B. im Jahr 2016 aufgrund einer kritischen Befalls-Situation). Ein Verzicht auf Cu-haltige Präparate würde zum sofortigen Rückgang des ökologischen Landbaus in Deutschland führen, da es trotz intensiver Bemühungen bislang keinen hinreichend wirksamen Ersatz für Cu-Präparate gibt². Durch verbesserte Prognosemodelle zur Früherkennung möglicher Infektionen, kulturtechnische Maßnahmen, mikrobielle Antagonisten und Pflanzenstärkungsmittel, Züchtung von PiWis, etc. konnte der Einsatz von Cu zwar leicht verringert werden⁷⁻⁹; letztlich wäre aber insbesondere der Ökolandbau beim Verzicht auf Cu-Präparate in Deutschland nicht mehr wirtschaftlich^{2,6,10}. Aufgrund fehlender Alternativen ist es nötig, neue Technologien zu entwickeln, die eine verbesserte Wirkung der applizierten Cu-Mengen ermöglichen. Durch die Optimierung von Cu-Präparaten wurden diesbezüglich bereits Erfolge erzielt². Allerdings ist der Erfolg der äußerlichen Cu-Anwendung im Pflanzenschutz aufgrund des kurzen Verbleibs von Cu-Verbindungen auf der Pflanzenoberfläche limitiert, vor allem aufgrund der geringen Regenbeständigkeit¹¹. Eine verlängerte Verweilzeit von Cu-Ionen auf der Pflanze und eine Abgabekinetik an Cu-Ionen aus Mikrogelen, die gerade noch einen effizienten Schutz ermöglicht, würde den Cu-Einsatz signifikant reduzieren, ohne den Pflanzenschutz zu beeinträchtigen.

Das Insektizid Spinosad zur Bekämpfung der KEF im Weinbau

Der deutsche Weinbau war bis zur Einschleppung der KEF überwiegend frei von Insektizid-Behandlungen. Im Jahr 2014 traten erstmals Schäden auf, die mit *D. suzukii* assoziiert wurden. Seitdem besteht Bekämpfungsbedarf (v.a. bei Trollinger, Dornfelder, Acolon, Roter Elbling). Das einzige hinreichend wirksame Insektizid mit einer Zulassung im ökologischen Weinbau ist Spinosad, das folglich seit 2014 zur Kontrolle der KEF verwendet wird. Spinosad zeichnet sich durch eine geringe Warmblüter-Toxizität aus und wird deshalb auch oft als „low risk insecticide“ betrachtet. Weil Spinosad aus zwei Wirkstoffen besteht ist das Risiko der Resistenzbildung gering¹². KEF-Befall tritt vor allem nach Regen auf, z.B. wenn die Weinbeeren platzen oder rissig werden. Unter diesen Bedingungen zeigt Spinosad allerdings eine besonders geringe Wirkung, weil Nässe den photolytischen Abbau der Wirkstoffe beschleunigt¹². Vor Sonnenlicht abgeschirmtes Spinosad ist wesentlich wirksamer als der lichtexponierte Wirkstoff. Eine weitere grundsätzliche Herausforderung bei der Behandlung von Weinbeeren mit Pflanzenschutzmitteln ist, dass eine Anhaftung der Spritzflüssigkeit aufgrund der Wachsbeläge oft unterbleibt¹³. Außerdem büßen Insektizide ihre Wirksamkeit gegen *D. suzukii* auch bei zunehmendem Regenmengen ein¹⁴. Sowohl die Dauer der Wirksamkeit von Spinosad

(Lichtstabilität und Regenfestigkeit), als auch die Benetzung von Weinbeeren können mit der „EcoGuard“-Technologie signifikant verbessert werden.

Mikrogele

Wässrige Mikrogele (1-20 µm) sind quervernetzte, in Wasser gequollene Polymer-Kolloide¹⁵ und daher weiche Partikel, die durch einfache Sprühanwendungen aufgetragen werden können. Ihre Synthese kann mit verschiedenen Methoden (v.a. radikalische Fällungs- und Emulsionspolymerisation) erfolgen. Wasserlösliche Monomere werden z.B. mit einem bi- oder multi-funktionellen Vernetzer zu Mikrogelen co-polymerisiert, wobei das verwendete Monomer die Funktionalität der Mikrogele vorgibt. Auch Nachmodifizierungen von Mikrogelen sind möglich. Durch die Wahl des Vernetzers (z.B. Ester, Disulfid) sind biologisch abbaubare Mikrogele herstellbar, deren Abbaugeschwindigkeit gezielt eingestellt werden kann. Zu den Eigenschaften der Mikrogele gehören die Schaltbarkeit durch bestimmte Umgebungsbedingungen (z.B. Feuchte), biologische Abbaubarkeit, und die Fähigkeit, Wirkstoffe oder Metall-Ionen aufzunehmen, zu transportieren und wieder abzugeben, sowie z.B. auf Pflanzenoberflächen monomolekulare Schichten auszubilden. Mikrogele schützen die eingeschlossenen Wirkstoffe vor äußeren Einflüssen und erlauben einstellbare Abgabe-Kinetiken. Die Verwendung von Mikrogelen zur kontrollierten Abgabe von Metallionen wurde von den AGs Pich und Schwaneberg am Beispiel von Fe-Ionen bereits verifiziert.

Derzeit können Mikrogele zu einem Preis von etwa 8-10 € pro kg im Labormaßstab hergestellt werden. Sprüh- oder Gefriertrocknungsexperimente wurden erfolgreich durchgeführt¹⁶. Getrocknete Mikrogele können durch die Zugabe von Wasser gequollen werden.

Mit Cu-Ionen beladene, biologische Polymergele wurden im Zusammenhang mit einer gezielten Cu-Freisetzung bereits diskutiert³. Aufgrund der fehlenden Verankerung an der Pflanzenoberfläche sind diese Polymergele aber wenig berieselungs- und regenbeständig und würden den Cu-Einsatz daher nicht wesentlich reduzieren. Unsere mit Ankerpeptiden an der Pflanze anhaftenden Mikrogele gewährleisten, dass die darin eingeschlossenen Cu-Ionen bis zu ihrer gezielten Freisetzung kaum ausgewaschen werden und länger an der Pflanzenoberfläche verbleiben. Letzteres ist zum Beispiel nach Niederschlägen und feuchten Nächten der Fall; also genau dann, wenn der Wirkstoff benötigt wird.

Im konventionellen Landbau werden Kombinationen aus Kapselformulierungen und UV-Schutzkomponenten zur Kontrolle von Schadinsekten bereits erfolgreich eingesetzt (Karate-Zeon; Syngenta; <https://www.syngenta.de/kultur/getreide-karate-zeon>). Jedoch unterscheiden sich die Eigenschaften von Kapseln und Mikrogelen deutlich. Die bisher eingesetzten Kapseln sind starr und nicht regenfest. Sie kollabieren auf der Pflanzenoberfläche oder platzen auf ihr auf und entlassen den Wirkstoff und eventuell beigemischte UV-Schutzkomponenten unkontrolliert. Im Gegensatz dazu wird der Wirkstoff in den von uns verwendeten, mit adhäsionsvermittelnden Ankerpeptiden und natürlichen UV-Schutzkomponenten funktionalisierten Mikrogelen auf der Pflanzenoberfläche verankert und bis zu seiner Freisetzung vor äußeren Einflüssen (Regen, Sonnenlicht) geschützt. Aufgrund ihrer Flexibilität (weiche Partikel) passen sich Mikrogele der Pflanzenoberfläche an, so dass eine gute Oberflächenverteilung des Wirkstoffs nach seiner Abgabe aus dem Gel möglich wird. Die Abgabekinetik kann so eingestellt werden, dass stets eine wirksame Konzentration vorhanden ist. Kapsel- oder Mikrogel-Formulierungen für Spinosad wurden nach unserem Wissen noch nicht entwickelt.

Ankerpeptide

Die Anbindung der Mikrogele an Pflanzenoberflächen erfolgt über natürliche Ankerpeptide als Adhäsionsvermittler. Sie binden an die Wachsschicht von Blättern und Früchten. Ankerpeptide sind natürliche, amphiphile Moleküle aus 20-100 Aminosäuren, die hauptsächlich von Mikroorganismen oder Insekten abgegeben werden¹⁷. Zur Verankerung an hydrophobe Oberflächen sind besonders die fassbildenden Ankerpeptide geeignet, weil sie sich nach der Anbindung zusammenfinden und ihre Anbindungsstärke dadurch weiter verstärken. In vorausgegangenen Projekten an der RWTH Aachen wurden acht unterschiedliche Ankerpeptide identifiziert, die eine feste Bindung an die epikutikuläre Wachsschicht verschiedener Pflanzenarten (u.a. Sojabohne, Mais, Gerste, Gurke) ermöglichen und durch simulierte Regenbehandlung kaum abgewaschen werden. Im Gegensatz zu derzeit gebräuchlichen Formulierungen zur Verbesserung der Regenfestigkeit müssen die Ankerpeptide nicht erst auf der Oberfläche antrocknen. Weitere Experimente zeigten, dass die ausgewählten Ankerpeptide (z.B. LCI) auch bei hohen Konzentrationen (10-100 μM) pflanzenverträglich sind. Mit 250 mg Ankerpeptid kann eine Fläche von mehr als 50 qm benetzt werden. Die Kosten für die zur Funktionalisierung von Mikrogelen benötigten Ankerpeptide liegen bei weniger als 1 €/kg Mikrogel. Die Verwendung von Ankerpeptiden und ihr Einsatz zur Anbindung von Mikrogelen an Pflanzenoberflächen wurde von anderen Arbeitsgruppen noch nicht beschrieben. Die Antragsteller Conrath, Pich und Schwaneberg haben ein gemeinsames Grundlagenpatent (WO2016134806) zur Verwendung der Technologie im Bereich der Pflanzengesundheit eingereicht. Das Patent schützt die Technologieplattform und bildet die Grundlage für weitere Anwendungspatente (z.B. im Weinbau). Mit dieser Patentstrategie können Lizenzen und Patente in Anwendungsfelder an Dritte vergeben bzw. an diese übertragen und weitere Patente in neuen Anwendungsfeldern (z.B. in der Medizin-technik) erarbeitet werden. Patente Dritter, die einer Nutzung der Technologieplattform im Ökolandbau entgegenstehen, sind uns nicht bekannt.

III. Material und Methoden

Methoden zur Herstellung der Ankerpeptide und kupferbeladenen Mikrogelen

Die synthetischen Gene wurden von Genscript bezogen. Zur Herstellung der rekombinanten Proteine wurde der Expressionsstamm *E. coli* BL21 DE3 Gold (Agilent) verwendet. Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte mittels ÄKTA GO und HisTrap FF columns (Cytiva). Die Fluoreszenzbestimmung erfolgte mittel FLUOstar Omega (BMG Labtech) und folgenden Parametern (Anregung: 485 nm; Emission: 510 nm; Gain: 1000). Zur immunologischen Detektion der bi-adhäsiven Peptide wurde das Penta-His HRP Conjugate Kit, Qiagen in Kombination mit dem TMB-ELISA Substrat (1-StepTM Ultra, Thermo Scientific) eingesetzt und die Absorption bei 450 nm gemessen (Sunrise, TECAN). Zur fluoreszenzmikroskopischen Visualisierung wurde der Alexa488-konjugierter Anti-His-Antikörper (HIS.H8, Invitrogen) eingesetzt zusammen mit einem BX51-Mikroskop, das mit einer XC30-Kamera, einem U-RFL-T-Brenner und einer BX-UCB-Kontrolleinheit (alle Komponenten von Olympus) ausgestattet ist. Die Bindung an Blattscheiben wurde mit einem Axioplan Mikroskop mit den Lichtquellen HAL100 und XBO75 (Zeiss; Fluoreszenzfilter: eGFP-Langpass; Hellfeldfilter: polarisiert) untersucht. Das genutzte Pektin 901 wurde von der Firma Herbstreith & Fox zur Verfügung gestellt. 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)carbodiimid (EDC), Adipinsäuredihydrazid (ADH), n-Heptan, Span80 und Tween80 wurden von Sigma-Aldrich bezogen. MES-Puffer zur Synthese wurde von Carl-Roth bezogen. Die Pektin-Mikrogele wurden mit einem Büchi Encapsulator B-390 synthetisiert. Es wurden folgende Parameter verwendet: 3 ml/min Zufluss, 20 mL/min Stickstoff, 1400 Hz, 1000 V, 25 °C. Die Kupferanalysen wurden mit einem Plasma Quant PQ 9000 Elite der Fa. Analytik Jena durchgeführt.

Bindungsanalysen der Ankerpeptide auf Rebblättern

Es wurden Versuche mit zwei Ankerpeptiden an vier Rebsorten (*Vitis vinifera* L.), Regent, Müller-Thurgau, Spätburgunder und Calardis Blanc durchgeführt. Die zwei Ankerpeptide, eGFP-LCI und eGFP-hDerm, sowie die Negativkontrolle eGFP wurden in fünf verschiedenen Verdünnungen auf die Blattober- und -unterseite aufgetragen. Die Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000 wurden mit ddH₂O angesetzt. Es wurden je 3 µl mittig auf Blattscheiben auf getropft und antrocknen gelassen. Drei Stunden nach der Applikation fand die Detektion mittels Fluoreszenz-Foto-Dokumentation (Scanalyzer FluoPL, LemnaTec, Aachen) statt. Die Verdünnungen eGFP-LCI 1:10 und eGFP-hDerm 1:50 wurden zusätzlich als Sprühapplikation getestet. Dabei wurde eine Airbrush-Pistole mit Kompressor (0,3 mm Düsendurchmesser, Luftdruck 3,1 bar, Abgabeleistung 13 l/min) verwendet um ca. 0,75 ml der Verdünnung auf die Blattober- bzw. -unterseite aufzubringen. Nach dem Trocknen wurden Blattscheiben ausgestanzt und die Detektion fand mittels Fluoreszenz-Foto-Dokumentation (Scanalyzer FluoPL, LemnaTec, Aachen) statt. Die Verdünnungen eGFP-LCI 1:10 und eGFP-hDerm 1:50 wurden auch für einen Abwaschversuch mit den vier beschriebenen Rebsorten verwendet. Pro Blatt wurden dafür 1,5 ml der jeweiligen Verdünnung ‚until runoff‘ aufgesprüht. Für den Abwasch kamen pro Blatt 50 ml ddH₂O aus einer Handsprühflasche zum Einsatz und die Detektion fand mittels Fluoreszenz-Foto-Dokumentation (Scanalyzer FluoPL, LemnaTec, Aachen) statt.

Zoosporen-Toxizitäts-Schlupftests

Für die Zoosporen-Schlupftests wurden 100 µl Sporangien-Suspension zu 100 µl Testsubstanz gegeben und der Schlüpfvorgang beobachtet. Nach 24 h wurden 50 Sporangien unter dem Mikroskop ausgezählt und in „geschlüpft“ und „nicht geschlüpft“ eingeteilt. Die *P. viticola*-Sporangien stammten

zu 50 % aus gefrorenen Proben, die nicht älter als 4 Monate waren und zu 50 % aus frischen Proben aus dem Freiland.

Infektionsassays mit P. viticola

Für Blattscheibenassays wurden die Blattscheiben mit einem Durchmesser von 17 mm auf mit Methylenblau gefärbtem Wasser-Agar 0,9 % mit der Blattunterseite nach oben ausgelegt.

Gefrorene *P. viticola*-Sporen wurden in entsalztem Wasser re-suspendiert, die Sporendichte auf 30 000 Sporen/ml eingestellt und je 100 µl der Suspension auf die Blattscheiben pipettiert. Nach einer Stunde wurde der Schlupf und die Agilität der Zoosporen in der Suspension überprüft. Die Blattscheiben wurden in einer Klimakammer mit Tag/Nacht-Rhythmus bei 23 °C und 70 % Luftfeuchte inkubiert und nach 24 Stunden wurde die überschüssige Flüssigkeit von den Blattscheiben abgenommen. Der Verlauf der Infektion wurde beobachtet und auf dem Höhepunkt der Sporulation wurde die Infektion dokumentiert.

Versuche an Topfpflanzen wurden mit mehreren Pflanzen von zwei Rebsorten, Spätburgunder und Müller-Thurgau, in einer Applikationskammer (Laborapplikationsanlage „SprayLab Epilogic“ von Schachtner Gerätetechnik, Ludwigsburg; Düsentyp IDKS 80-02 mit vorgeschaltetem Schlitzfilter 25M, Lechler GmbH, Metzingen) drei verschiedenen Behandlungen durchgeführt. Appliziert wurden Funguran®progress, Pektin-Mikrogel und Leitungswasser als Kontrolle. Die Ausbringmenge der verschiedenen Flüssigkeiten pro Applikation wurde zuvor überprüft und betrug jeweils 56 ml. Appliziert wurden 150 g/ha Reinkupfer. Das entspricht einer Kupferkonzentration von 378 mg/L. Die Einstellung der Applikationsanlage waren 408 l/ha bei einem Druck von fünf bar. Das entspricht einer Fahrgeschwindigkeit von 1,75 km/h. Die Düsen waren in einem Abstand von 55 cm zueinander in 180° vor und hinter den Topfpflanzen positioniert, um eine möglichst großflächige Benetzung der Blätter auf Ober- und Unterseite zu gewährleisten.

Die behandelten Topfpflanzen wurden für 48 Stunden im Freiland den Umweltbedingungen ausgesetzt und anschließend wurden von jeder Pflanze zwei Blätter für weitere Untersuchungen genommen.

Diese Blätter wurden nach der Freilandmethode mit LWB abgewaschen und der Kupfergehalt im Blattabwasch bestimmt (Spectroquant® Kupfer-Test von Merck, Darmstadt). Vor dem Waschen wurden aus diesen Blättern Blattscheiben mit einem Durchmesser von 17 mm für Infektionsversuche ausgestanzt.

Durchführung der Feldversuche mit kupferbeladenen Pektin-Mikrogelen

Im Versuchsjahr 2021 wurde ein Vorversuch im Freiland in einer Riesling-Parzelle durchgeführt. Es wurden am 19.07.2021 die vorherigen Spritzungen mit Funguran®progress und Netzschwefel ersetzt durch acht verschiedene Behandlungen. Davon fanden in einem Abstand von je einer Woche vier Wiederholungen statt. In diesem Jahr waren maximal vier Spritzungen von je 12 Rebstöcken möglich. Im Laufe der Versuchsspritzungen fanden, im Abstand von je zwei Wochen, an drei Terminen Bonituren nach der EPPO-Richtlinie „PP1/031(3) - *Plasmopara viticola*“ in der Versuchsparzelle statt. Es wurden 50 Gescheine und keine Blätter bonitiert. Die Blätter waren zum Beginn der Spritzungen bereits alle befallen und es fand kein großer Blattzuwachs mehr statt. Bei den Gescheinen wurde außerdem bereits auch Echter Mehltau festgestellt. Während der Bonitur wurde dabei nicht unterschieden, sondern die Läsionen allgemein an den Trauben bonitiert.

Ein umfangreicherer Freilandversuch fand im Versuchsjahr 2022 in einer Riesling-Parzelle statt. Die Reben wurden vier verschiedenen Behandlungen unterzogen und es fanden zwischen dem 01.06.2022

und dem 27.07.2022 insgesamt neun Spritzungen statt. Die Kupfer- und Schwefelmenge pro Spritzung wurde entsprechend der Arbeitshinweise für den ökologischen Weinbau des Dienstleistungszentrums Ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück des Landes Rheinland-Pfalz (www.dlr.rlp.de)¹⁸ gewählt. Vor und nach jeder Spritzung wurden Blattproben genommen, welche in Probentüten mit 200 ml Leaf-Wash-Buffer (LWB; 0,01 % Tween80) zweimal 30 min mit zwischenzeitlichem Wenden auf einem horizontalen Rüttler bei 130 rpm gewaschen wurden. Von dem Blattabwasch wurden 100 ml bei -20 °C für spätere Analysen eingefroren und die Blattfläche wurde bestimmt. Die Bestimmung des Kupfergehalts im Blattabwasch erfolgte photometrisch mittels des Spectroquant® Kupfer-Test (Merck, Darmstadt). Zusätzlich wurde an fünf Terminen jeweils ein Langzeitversuch gespritzt, welcher über einen Zeitraum von drei Wochen beprobt wurde, um einen zeitlichen Verlauf des Kupfergehalts, in Abhängigkeit des Niederschlags, auf den Blättern zu ermitteln.

Identifizierung geeigneter Komponenten zur Verkapselung von Spinosad

Ab dem Frühjahr 2022 wurden die vier Mikrokapselvarianten Sonne100, Sonne90Cande10, Sonne90Roti10 und WarePalm100 paarweise mittels der Beerentest-Methodik und der Erstellung von Dosis-Wirkungsbeziehungen, die zur Berechnung der LR50 dienen, auf ihre Effektivität gegen *D. suzukii* untersucht. Unter Verwendung des horizontalen Spritzverfahrens wurde nach Kalibrierung der Applikationskammer eine Spritzbrühenrate von 25 ml/m² ausgebracht (Druck: 4 bar; Düse: IDK 120-02, ohne Vorfilter, Fahrgeschwindigkeit: 3,5 km/h, Tisch ganz oben). Pro Replikat wurden eine männliche und eine weibliche *D. suzukii* eingesetzt. Es wurde immer eine Kontrolle, die mit Leitungswasser und eine Kontrolle, die mit einer 25 %-igen Zuckerlösung bespritzt wurde, mitgeführt. Im ersten Testset wurde Sonne100 und Sonne90Cande10 appliziert. Da durch einen menschlichen Fehler eine 3 %-ige anstatt der geplanten 0,3 %-igen Zuckerlösung für die Tränken angesetzt wurde, wurde dieser Test mit einer 0,3 %-igen Zuckerlösung für die Tränken wiederholt und ein Test mit Sonne90Roti10 und WarePalm100 wie geplant durchgeführt. Da bei diesen beiden Tests die Mortalität der Wasserkontrolle bereits 24 h nach Teststart bei 50 % beziehungsweise bei 40 % lag, wurde der Test mit Sonne90Roti10 und WarePalm100 mit einer 3 %-igen Zuckerlösung wiederholt, um die Vergleichbarkeit mit dem ersten der vier Tests zu gewährleisten. Daher wurden für alle weiteren Tests Tränken-Lösungen mit 3 % Zucker verwendet. Im zweiten Testset wurden alle vier Kandidaten in einem einzelnen Test mit je einer Wirkstoffrate von 10 mg/m² und 1 mg/m² ausgebracht. Auf den Petrischalen-Deckel wurde vor Applikation eine Beere der Tafeltraubensorte ‚Crimson seedless‘ mit Heißkleber befestigt. Im dritten Testset wurde die Paarung aus dem ersten Testset beibehalten und die Abstände der Wirkstoffraten vom Faktor vier auf zwei verringert. Bei der Paarung Sonne100/Sonne90Cande10 wurden vor Applikation Beeren der Tafeltraubensorte ‚Ralli seedless‘ und bei der Paarung Sonne90Roti10/WarePalm100 von der Sorte ‚Black beauty‘ auf die Petrischalendeckel geklebt. Im vierten Testset sollte geklärt werden, ob es einen Unterschied zwischen der Verwendung von Beeren und Weinblattscheiben gibt. Die Verwendung von Weinblattscheiben könnte die Möglichkeit bieten eine von der Reifezeit unabhängige Standardisierung zu erreichen, da die Sorte der Tafeltrauben, die vor dem Weichwerden der Weinbeeren verwendet werden, vom Sortiment der Supermärkte abhängt. Hierzu wurden die Petrischalen-Deckel von je fünf Replikate mit Blattscheiben oder Beeren der Sorte ‚Regent‘ beklebt und die im dritten Testset ausgebrachten Wirkstoffraten appliziert. Die Kandidatenpaarung war Sonne90Cande10/SpinTor®. Im fünften Testset wurden die vorherigen Raten beibehalten und drei Tests mit den Paarungen Sonne100/Sonne90Roti10,

Sonne90Cande10/Sonne90Roti10 und Sonne90Cande10/SpinTor® durchgeführt. Als Beere wurde die Weintraubensorte ‚Regent‘ genommen.

Halbfreilandversuch mit Spinosad-Mikrokapseln und SpinTor®

Im Jahr 2021 wurden die SpinosadCaps und SpinTor® in einem Feldversuch auf die Auswirkungen von abiotischen Faktoren untersucht. Hierzu wurden Weintrauben der Sorte Reberger sowie Deko-Trauben aus Plastik, die auf ihre mögliche Verwendung als Ersatz für echte Trauben untersucht und vor Applikation in die Zeilen gehängt wurden, appliziert. Falls sie als verwendbar eingestuft würden, könnten sie in aged residual-Tests, bei denen die Applikation in der Applikationskammer durchgeführt wird, eingesetzt werden, da echte Trauben, die nicht mehr am Stock hängen, schnell zu Problemen wie Beerenverlust oder Aussaften bei der Testdurchführung führen, sodass die Mortalität nicht nur auf die Testmittel zurückzuführen ist. Es war geplant ein Teil der im Feld applizierten Trauben als Referenzgruppe direkt nach dem Antrocknen der Spritzbrühe und der andere Teil nach zwei Tagen einem Trauben-Labortest zu unterziehen. Es wurde je eine hohe (12 mg/m² behandelte Fläche) und eine niedrige (6 mg/m² behandelte Fläche) Wirkstoffrate in der Traubenzone von 60 cm sowie Leitungswasser als Kontrolle appliziert. Hierbei verstopften die Düsen bei der hoch dosierten SpinosadCaps-Spritzbrühe, sodass die tatsächlich ausgebrachte Wirkstoffrate nicht mehr zu bestimmen war. Weiter gab es kurz vor dem Einholen der Referenzgruppe ein Sommergewitter mit einem Niederschlag von 9 L/m². Daher konnte die ursprüngliche Effektivität ohne das Einwirken von abiotischen Effekten nicht getestet werden. Da im Testdesign immer zwölf Gruppen untersucht werden können, der Feldversuch aber nur aus zehn (2 Mittel x 2 Raten x 2 Traubensorten und je eine Wasserkontrolle pro Traubensorte) Gruppen bestand, wurden am nächsten Tag noch zwei Gruppen an Deko-Trauben, jeweils mit 11 mg/m² behandelte Fläche mit SpinTor® beziehungsweise mit den SpinosadCaps in der Applikationskammer appliziert, um die Eignung der Deko-Trauben in einem reinen Labortest zu untersuchen. Pro Replikat wurden 20 Fliegen eingesetzt und die Methodik des Traubentests angewandt. Im Jahr 2022 wurden die drei Kandidaten Sonne90Cande10, Sonne90Roti10 und Sonne100 sowie das Referenzmittel SpinTor® mit einer geplanten Wirkstoffrate von 6,4 mg Spinosad/m² (76,8 g Spinosad/ha Grundfläche bei einer Applikationshöhe von 1,2 m) in einer Reberger-Parzelle im randomisierten Blockverfahren ausgebracht und die frisch applizierten Trauben, die vor Applikation anhand des Kriteriums eines minimalen Spritzschatten durch Blätter und Trauben und einer angemessenen Hänghöhe ausgewählt und mit Nummern markiert wurden, noch am selben Tag nach antrocknen des Spritzbelags im Labor einem Trauben-Test unterzogen. Hierbei wurde versucht bei der Ernte und dem Transport ins Labor den Spritzbelag so wenig wie möglich zu verletzen, sodass die Trauben bereits im Feld an ein vorbereitetes Gitter gehängt wurden. Vier Tage später wurden erneut ganze Trauben geerntet und mittels eines Traubentests die Effektivität der Kandidaten bestimmt. Zwei Wochen nach Applikation wurden aus jeder Behandlung je zehn weitere, vor Applikation ausgewählte Trauben entnommen, davon je fünf Beeren zufällig ausgewählt und die abgelegten Eier gezählt.

IV. Ausführliche Darstellung und Diskussion der wichtigsten Ergebnisse

Projektteil Rebenperonospora

Entwicklung der Einzelkomponenten und Anbindung der Peptide an Mikrogele

Die gruppeninterne Ankerpeptidbibliothek (umfasst mehr 100 Ankerpeptide fusioniert an das grün fluoreszierende Reporterprotein eGFP) wurde zur Identifizierung von Blattbindepeptiden durchmustert. Die Bindung der Ankerpeptide an die Blätter wurde initial über die grüne Fluoreszenz des Reporterproteins fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Dadurch wurden drei vielversprechende Ankerpeptide (#18 hDerm, #21 LCI, #40 Sping) identifiziert, die an die Blätter der Rebsorten Müller-Thurgau, Regent und Spätburgunder binden. Es wurde sowohl die Bindung an die Blattunterseite als auch an die Blattoberseite getestet und keine Bindungsunterschiede festgestellt. Um weitere vielversprechende Ankerpeptide zu identifizieren und um saisonal unabhängig Bindungsstudien durchführen zu können, wurde die Wachsschicht von Weinblättern und Weintrauben (Riesling, vom Projektpartner JKI zu Verfügung gestellt) extrahiert und ein Multititer-Platten-Durchmusterungssystem mit extrahiertem Wachs etabliert¹⁹. Dadurch wurde zusätzlich das Ankerpeptid #22 MacHis als vielversprechender Adhäsionsvermittler für Pflanzenblätter identifiziert, der sowohl an die Wachsschicht von Weinblättern als auch an die Wachsschicht von Weintrauben bindet. Das Ankerpeptide #22 MacHis wurde bereits als vielversprechender Kandidat für die Anbindung an Pflanzenblätter identifiziert¹⁹. Neben dem Vorteil der Saisonunabhängigkeit bietet das Pflanzenblattwachs-basierte Multititer-Platten-Durchmusterungsverfahren eine einfache, quantifizierbare und vergleichende Bewertung der fluoreszenzmarkierten Ankerpeptide. Nach Applikation der fluoreszenz-normalisierten Ankerpeptide auf Wachs-beschichtete Multititer-Platten kann die Fluoreszenz über mehrere Waschschriffe (simulierter Regen) verfolgt und die Effizienz der Bindung analysiert werden. Final wurden die beiden Ankerpeptide #21 LCI und #22 MacHis aus der gruppeninternen Bibliothek als die vielversprechendsten Kandidaten für die Blattbindung identifiziert und für weitere Arbeiten ausgewählt.

In der späteren Anwendung sollen die bioabbaubaren und biokompatiblen Pektin-Mikrogelcontainer regenfest an Weinblättern gebunden werden. Dazu soll das Konzept der bi-adhäsive Peptide als Haftvermittler zum Einsatz kommen und entsprechend adaptiert werden²⁰. Für die im Projekt anvisierte Anwendung bestehen diese zum einen aus den bereits identifizierten Blattbindepeptiden und aus einem Pektin-Bindepeptid. Zur Identifizierung solcher Pektin-Bindepeptide wurde ebenfalls die gruppeninterne Ankerpeptidbibliothek durchmustert und zusätzlich in der Literatur nach natürlich vorkommenden Proteinen „carbohydrate-binding modules (CBM)“ gesucht, die spezifisch an Pektin binden. YeCBM32 aus *Yersinia enterocolitica* bindet spezifisch an Polygalacturonsäure (Hauptbestandteil von Zitrus-Pektin) und ist als nicht katalytisches Protein in den Pektin-Transport involviert²¹. Als Protein mit prokaryotischem Ursprung (*Yersinia enterocolitica*) ist es zudem für eine skalierbare Produktion in *E. coli* geeignet. YeCBM32 wurde zur Untersuchung der Pektin-Bindung analog zu den Ankerpeptiden als fluoreszenzmarkiertes Protein in *E. coli* produziert. Zur Bewertung der Pektin-Bindung wurde ein Multititer-Platten Verfahren entwickelt. Eine flüssige Pektin-Lösung wurde in die Wells vorgelegt und vorsichtig mit einer Calciumchlorid-Lösung überschichtet. Dadurch kommt es zur Gelierung des Pektins (klassisches egg-box Modell²²) und zur Ausbildung eines festen Films, der zur Bewertung der Pektin-Bindung der fluoreszenzmarkierten Peptide verwendet werden kann. Analog zu dem bereits oben beschriebenen Verfahren zur Identifizierung der Blattbindepeptide konnte über die Fluoreszenzwertbestimmung die Bindung vergleichend bewertet und die Effizienz der Bindung analysiert werden. YeCBM32 wurde als vielversprechendster Kandidat für die Pektin-Bindung identifiziert.

Nach erfolgreicher Identifizierung der einzelnen Haftvermittler für Weinblätter (Ankerpeptide #21 LCI und #22 MacHis) und Pektin (YeCBM32) wurden die bi-adhäsiven Peptide erstellt. Die bi-adhäsive Peptide bestehen aus einem pflanzenspezifischen Ankerpeptid und einem Pektin-Bindeprotein, welche durch einen Linker räumlich getrennt werden. Als Linker wird eine Domäne aus Protein A aus *Staphylococcus aureus* (Domain Z) ausgewählt, da diese nicht nur die beiden Proteine bestmöglich räumlich voneinander trennt, sondern zudem als prokaryotisches Protein hervorragend produziert werden kann und die Löslichkeit des bi-adhäsiven Peptides erhöht. Zur Herstellung der bi-adhäsiven Peptide wird im weiteren Verlauf auf eine genetische Fusion mit dem fluoreszierenden Reporterprotein eGFP verzichtet und daher zur Reinigung und insbesondere zur Detektion/Visualisierung ein His6-Tag eingefügt. Die beiden bi-adhäsiven Peptide (#1 His-YeCBM32-DZ-LCI und #2 His-YeCBM32-DZ-MacHis) wurden als synthetische Gene codon-optimiert für den Expressionsorganismus *E. coli* bestellt und zur Transformation in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 DE3 Gold eingesetzt. Beginnend mit dem bi-adhäsiven Peptid #1 His-YeCBM32-DZ-LCI wurde ein skalierbarer biotechnologischer Herstellungsprozess (Fermentation, Zellaufschluss, Affinitätschromatographie inklusive Puffertausch) etabliert und das bi-adhäsive Peptide #1 His-YeCBM32-DZ-LCI zur Funktionalisierung von kupfer-beladenen Pektin-Mikrogelen für die Freilandversuche im Projektjahr 2021 eingesetzt. Basierend auf dem entwickelten Herstellungsprozess wurde das zweite bi-adhäsive Peptide #2 His-YeCBM32-DZ-MacHis mit einer finalen Ausbeute von ca. 1 g reinem Peptid produziert. Neben der Produktion der beiden bi-adhäsiven Peptide wurde an der Entwicklung von immunologischen Nachweisverfahren zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften gearbeitet. Die Bindung der beiden bi-adhäsiven Peptide (#1 His-YeCBM32-DZ-LCI und #2 His-YeCBM32-DZ-MacHis) an Pektin-Mikrogele (freundlicherweise vom Projektpartner AG Pich zur Verfügung gestellt) konnte über einen Alexa488-Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper, der spezifisch den His6-Tag detektiert, visualisiert werden. Nach Adaption der oben aufgeführten Multititer-Platten-Durchmusterungsverfahren zur Charakterisierung der Wachs- bzw. Pektin-Bindung, genauer gesagt Umstellung von Fluoreszenz auf einen immunologischen (Antikörper-basierten) Nachweis der Bindung, konnte gezeigt werden, dass beide bi-adhäsive Peptide sowohl an Blattwachs also auch an Pektin binden. Das bi-adhäsive Peptid #2 His-YeCBM32-DZ-MacHis wurde hierbei als der vielversprechendere Kandidat identifiziert. In Laboruntersuchungen an Blattscheiben von Weinblättern konnte zudem gezeigt werden, dass Pektin-Mikrogele nach Funktionalisierung mit dem Haftvermittler #2 His-YeCBM32-DZ-MacHis nach mehrmaligem Waschen im Vergleich zur Kontrolle (nichtfunktionalisierte Pektin-Mikrogele) eindeutig auf den Blattscheiben mikroskopisch nachgewiesen werden konnten. Für den Feldversuch im Jahr 2022 wurde daher das bi-adhäsive Peptid #2 His-YeCBM32-DZ-MacHis ausgewählt und in Zusammenarbeit mit AG Pich zur Funktionalisierung der Kupfer(II)-beladenen Pektin-Mikrogele eingesetzt. Es wurde 6,9 L eines 20-fach Konzentrats (138 L finale Spritzbrühe) hergestellt. Der Anteil des bi-adhäsiven Peptides betrug 2 % (w/w) bezogen auf den Pektin-Feststoffanteil.

Synthese von Mikrogelen und Verkapselung der Wirkstoffe

Verkapselung von Kupfer in polysacchariden Mikrogelen

Mittels bioabbaubaren und biokompatiblen Container soll die Verkapselung von Kupfer(II)salzen erreicht werden. Zu diesem Zweck wird ein auf Pektin basierendes Mikrogelsystem entwickelt. Auf Grund seiner Struktur ist es möglich mit Pektin Kupfer(II)salze direkt über die Carbonsäuregruppen zu komplexieren. So ist keine weitere Funktionalisierung des Pektins nötig. Zunächst war geplant das Pektin mit Hilfe von Trinatrium-Trimetaphosphat zu vernetzen. Dies erwies sich nicht als geeignet, da bei der Skalierung der Reaktion Probleme auftraten. Daher wurde ein neuartiges System mittels eines

Mikrofluidik-Ansatzes entwickelt. Die mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) vermittelte Kondensation des Pektins mit Adipinsäuredihydrazid verlief erfolgreich. Die Kinetik der Reaktion konnte via Rheologie charakterisiert werden, sodass das System hinsichtlich seiner Performance und des geringstmöglichen Vernetzer-Einsatzes optimiert werden konnte. Hierbei zeigte sich eine gute Kontrolle der Reaktion über den pH-Wert, sowie die Temperatur, der bei der die Reaktion ausgeführt wird. Dieses System wurde zunächst im kleinen Maßstab mittels Mikrofluidik validiert. Die Skalierung wurde durch ein Emulsionssystem umgesetzt, bei dem die verträglichen Tenside Span80 und Tween80 verwendet wurden. Als Lösungsmittel musste hierbei auf n-Heptan zurückgegriffen werden. Die hergestellten Mikrogele wurden erfolgreich mittels dynamischer Lichtstreuung analysiert, wobei ein hydrodynamischer Radius von etwa 230 nm ermittelt werden konnte. Da auch die Beladung mittels Kupfer(II)sulfat erfolgreich bei einem pH-Wert von 8 durchgeführt werden konnte, konnten dem JKI 20 Liter zur Pflanzenapplikation zur Verfügung gestellt werden. Diese Charge war bereits mit einem bi-adhäsiven Protein der AG Schwaneberg versehen.

Für die Feldversuche 2021 und 2022 war es jedoch nötig den Prozess weiter zu skalieren, da hierfür bis zu 120 L veranschlagt wurden. In Rücksprache mit dem JKI wurde festgehalten, dass Mikrogele mit einer maximalen Größe von 300 µm hergestellt werden müssen, da ansonsten Filter oder Düsen verstopfen könnten. Daher wurde für die Skalierung der Synthese die Herstellung mittels eines Büchi Encapsulators B- 390 durchgeführt. Hierbei kann eine maximale Ansatzgröße von 100 mL gewählt werden. Durch das spezielle Düsensystem des Büchi Encapsulator B 390 ist es möglich homogene Größenverteilungen zwischen 200 und 300 µm zu synthetisieren.

Da für die Feldversuche größere Mengen Mikrogel und somit auch Kupfer(II)salz benötigt werden, wurde im Laufe des Projektes der Aufnahme Mechanismus des Pektin Mikrogels charakterisiert. Hierfür wurde mittels ICP-OES der Kupfergehalt in den Mikrogelen, sowie in den Waschüberständen bestimmt. Hingegen der Erwartung, dass die Beladung des Kupfers im basischen stattfinden muss, hat konnte titrimetrisch belegt werden, dass die Carbonsäure-Gruppen des Pektin Mikrogels bereits ab einem pH-Wert von 5,8 vollständig deprotoniert sind. Bei Versuchen mit höherem pH-Wert wurde festgestellt, dass bei der Justierung des pH-Wertes einer Kupfer(II)sulfat-haltigen Lösung ein feiner, hellblauer Niederschlag entsteht, bei dem es sich um Kupfer(II)hydroxid handelt. Um dies zu vermeiden wurden erneut Beladungsexperimente mit Kupfer(II)acetat durchgeführt, da dieses weniger sauer mit der wässrigen Mikrogel-Lösung reagiert und so der pH-Wert weniger stark angepasst werden muss, um eine optimale Beladung des Mikrogels zu gewährleisten. Hierbei zeigte sich, dass mit einer 40 mM Kupfer(II)acetat Lösung bei pH 6 eine maximale Beladung von 138 µg Kupfer(II) pro Milligramm Pektin Mikrogel erzielt werden konnte. Dies entspricht einer Beladung von ca. 14-gew%.

Durch die optimierte Synthese und Beladung konnte dann im Mai 2022 ein 20-fach Konzentrat dem JKI übergeben werden, was einem Volumen von 138 L fertiger Spritzbrühe mit einer Kupferkonzentration von 160 µg/L entspricht. Parallel zu den Feldversuchen wurde die Freigabe des Kupfers aus den Mikrogelen untersucht. Hierfür wurde die Freisetzung in Essigsäurepuffer mit pH5, Phosphatpuffer mit pH6, Reinstwasser und Leitungswasser über den Zeitraum von 2 Wochen analysiert. Hierbei zeigte sich, dass vor allem in den beiden Pufferlösungen sehr schnell Kupfer freigegeben werden kann, sodass sich bereits nach 10 Tagen bei pH 5 ein Gleichgewicht einstellte, bei dem etwa 40 % der zuvor beladenen Masse Kupfer freigesetzt wurden. Für Reinstwasser und Leitungswasser konnte ebenso eine Freisetzung detektiert werden, jedoch war diese deutlich langsamer, sodass im Zeitraum von 2 Wochen kein maximaler Freisetzungsgrad bestimmt werden konnte.

Abschließen konnte die biologische Abbaubarkeit des Systems mittels Pektinase nachgewiesen werden. Hierbei zeigt sich, dass mit steigender Pektinase-Konzentration auch die Zersetzung des Mikrogels beschleunigt wurde. Die Zersetzung konnte sowohl mikroskopisch wie auch mit einer selbstentwickelten Methode mit Hilfe eines LUM Lumisizer bestätigt werden.

Verkapselung von Spinosad in polysacchariden Mikrogelen

Zu Beginn des Projektes wurde zunächst das zu verkapselnde Spinosad näher analysiert. Hierbei stellte sich raus, dass vor allem Spinosyn-A und Spinosyn-D als aktive Substanzen für den Schutz verantwortlich sind. Nachdem das Spinosad ausführlich mittels thermogravimetrischer Analyse (TGA), nuklearmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR), sowie Infrarot- und Ramanspektroskopie analysiert wurde, wurde außerdem ein Protokoll zur Analyse und Quantifizierung von Spinosad mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) etabliert. Da die Kirchessigfliege (*Drosophila suzukii*) stark von Ethanol angezogen wird, welcher entsteht, wenn reife Trauben noch an der Rebe aufplatzen und der austretende Saft von Hefekulturen fermentiert wird, soll ein System entwickelt werden, welches Ethanol als Auslöser für die Freigabe des Spinosads nutzt. Bei ersten Tests zeigte sich, dass Spinosad in Ethanol löslich ist. Das freigesetzte Ethanol stört die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Spinosad und dem Mikrogelsystem, sodass eine Freisetzung des Wirkstoffes erfolgt. Die Wechselwirkungen von Mikrogel und Spinosad sind durch die hydrophobe Natur von Spinosad deutlich komplexer als die Wechselwirkung von Kupfer und Pektin. Durch die niedrige Löslichkeit von Spinosad in Wasser ist die Beladung ebenso erschwert. Während das Pektin-Mikrogelsystem mit hohem Methylierungsgrad entwickelt wird, wird ein Beladungs-Protokoll etabliert. Außerdem wurde eine Postmodifikation des bereits für die Kupferbeladung hergestellten Pektinmikrogels mit Glycidylmethacrylat durchgeführt. Zur Entwicklung des Beladungsprozesses wurden im DWI etablierte Mikrogele verwendet, die mittels einer radikalischen Fällungspolymerisation aus N-Vinylcaprolactam und Glycidylmethacryl (GMA), alkyl funktionalisiertem Vinylimidazol (VIM+C12) oder Tert-Butylcyclohexylacrylate (TBCHA) synthetisiert wurden.

Um die Mikrogele mit Spinosad zu beladen, wurde eine Lösungsmittel Austausch Methode verwendet. Dazu wurde zunächst das Spinosad in Ethanol gelöst und anschließend zusammen mit den Mikrogelen gegen Wasser dialysiert. Da das Spinosad nicht wasserlöslich ist, wird es sofern möglich in den Mikrogelcontainer gedrückt. Andernfalls fällt es aus und kann durch Filtration abgetrennt werden.

Hierbei zeigt sich, dass für TBCHA oder VIM+C12 Mikrogele keine Aufnahme von Spinosad detektiert werden konnte. Auch mit den GMA funktionalisierten Mikrogelen konnten keine reproduzierbaren Aufnahmen erzielt werden, da das Spinosad bei der Dialyse gegen Wasser sofort ausfällt. Trotz des sehr hydrophoben Charakters sämtlicher Mikrogelsysteme war es nicht möglich signifikante Mengen Spinosad im Mikrogel nachzuweisen.

Nach Rücksprache im Projekt wurden für das Spinosad beladene System auf extern Entwickelte Spinocaps zurückgegriffen.

Studien zur Benetzbarkeit und Applikation

Zu Beginn des Projekts mussten geeignete Ankerpeptide identifiziert werden, die eine regenfesteste Anbindung von Mikrogelen an die Blätter und Früchte der Weinrebe gewährleisten. Um die Anbindung der Peptide mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisen zu können, wurden die Ankerpeptide mit einem grün fluoreszierenden Protein fusioniert (eGFP) und auf die Blattober- und -unterseite appliziert. Die Blattproben wurden anschließend gewaschen und auf eine verbleibende Fluoreszenz hin untersucht. Hierbei wurde die Anbindung des #21 LCI-Peptids (Liquid chromatography peak I; ein

natürliches Peptid aus *Bacillus subtilis*) an die Blätter der Weinrebe bestätigt. Die Anbindung von LCI an Pflanzenblätter wurde bereits zuvor für zahlreiche andere Kulturen (z.B. Gerste, Mais, Soja, Blaubeere, etc.) gezeigt. Zusätzlich wurde darüber hinaus die Bindungsaffinität der Peptide #18 hDermcidin, #40 Spingerin und #22 MacHis überprüft. Dabei zeigte sich, dass auch #22 MacHis (Macaque histatin 1; ein natürliches Peptid aus *Macaca fascicularis*) eine starke Bindungsaffinität zu der Blattoberfläche aufweist. Im nächsten Schritt wurden die eGFP-Ankerpeptide mit Mikrogelen kombiniert. Auch hier zeigte sich, dass die vorab identifizierten Peptide #21 LCI und #22 MacHis für eine Anbindung von Mikrogelen an die Blätter der Weinrebe geeignet sind. Zusätzlich sollte die Anbindung der Ankerpeptid-Mikrogele an die Beeren der Weinrebe getestet werden. Aufgrund der äußerst hydrophoben Eigenschaften der Beerenhaut war eine Benetzung nur sehr schlecht oder gar nicht möglich. Um dieses Problem zu umgehen, wurden geeignete Netzmittel identifiziert. Die Zugabe von 0,2 % WETCIT (Produkt der Firma BioFA; enthält: 8,1 % Fettalkoholethoxylat) oder 2 % CropCover CC-1000 (Produkt der Firma amynova polymers GmbH; enthält: modifizierte Stärke) führte zu einer homogenen Benetzung der Beerenhaut und lieferte daher zufriedenstellende Ergebnisse.

Im nächsten Schritt der Bindungsanalysen wurde das Trocknungsverhalten und die Regenfestigkeit der Ankerpeptide unter simulierten Bedingungen getestet. Die Tropfenapplikation von Ankerpeptiden auf Rebblättern ergab keine signifikanten Unterschiede in der Antrocknung auf den Blattoberseiten und -unterseiten. Bei der Sorte Müller-Thurgau zeigte sich jedoch eine verstärkte Fluoreszenz am äußeren Rand der Proben im Vergleich zu anderen Sorten. Die Detektion der Ankerpeptide mittels Fluoreszenz-Foto-Dokumentation war aufgrund von Bildqualitätsproblemen und schlechten Lichtverhältnissen begrenzt. Dennoch war das Ankerpeptid eGFP-hDerm besser nachweisbar als eGFP-LCI, wobei letzteres oft schlechter detektiert wurde als die Negativkontrolle eGFP selbst. Die Sprühapplikation mit einer Airbrush-Pistole führte nicht zu einer guten Detektierbarkeit auf ganzen Blattscheiben unter dem Mikroskop. Eine bessere Detektierbarkeit wurde auf der Blattunterseite beobachtet. Nach der Runoff-Applikation wurden nur vereinzelte Stellen mit bindenden Ankerpeptiden unter dem Mikroskop erkannt. Die Spritzbrühe war insgesamt auf der Blattunterseite besser nachweisbar. Das Fluoreszenzprotein eGFP und die Ankerpeptide eGFP-LCI und eGFP-hDerm hielten dem Abwaschvorgang nach einem Regenereignis von 50 ml nicht stand. Nur auf der Blattoberseite der Sorte Regent waren leichte Rückstände von eGFP-hDerm sichtbar.

Zoosporen-Schlupftests mit *P. viticola*

Die zuvor erwähnten Pilotprojekte haben gezeigt, dass in Mikrogel eingebundene Kupferionen dazu geeignet sind pilzliche Krankheiten der Zuckerrübe bzw. Apfelmulturen zu schützen (*Cercospora*-Blattflecken verursacht durch *Cercospora beticola* sowie die Apfelschorfkrankheit verursacht durch *Venturia inaequalis*). Vor Beginn des EcoGuard-Projektes wurde noch nicht untersucht, ob sich die Kupfer-beladenen Mikrogele auch für die Kontrolle von Oomyceten eignen. Kupfer wird im ökologischen Landbau hauptsächlich zur Kontrolle des falschen Mehltaus (*Plasmopara viticola*) eingesetzt. Um zeigen zu können, dass die „GreenGel“-Technologie für die Kontrolle von *Plasmopara* geeignet ist, wurden die Pilotexperimente ab April 2020 zunächst mit einer Mikrogel-Variante aus den Vorgängerprojekten durchgeführt. In Zoosporen-Schlupftests zeigte sich, dass das in Mikrogele eingebundene Kupfer eine vollständige Unterdrückung des Schlupfvorgangs herbeiführt. Dies auch bei geringen Kupferkonzentrationen (getestet: 800 mg Cu²⁺/L, 160 mg Cu²⁺/L und 20 mg Cu²⁺/L). In den Kontrollen, in denen das Standard-Marktprodukt Funguran® progress eingesetzt wurde, konnte das gleiche Ergebnis erzielt werden.

Im Weiteren wurden die Schlupftests zudem mit den Ankerpeptiden und den neuen Pektin-Mikrogelen durchgeführt. Im Zoosporen-Schlupftest zeigen die Ankerpeptide eGFP-hDerm und eGFP-LCI genauso wie eGFP keinen Effekt auf das Schlupfverhalten der Zoosporen im Vergleich mit der Wasserkontrolle. Die Varianten Mikrogel + LCI Anker + Cu 800 mg/L und Pektin-Mikrogel pH3 konnten nicht ausgezählt werden, da es zu einem starken Niederschlag bzw. einer Trübung der Probe kam, wodurch die Sporangien nur sehr schlecht beobachtet werden konnten. Die wenigen Sporangien, die zu sehen waren, waren nicht geschlüpft. Auch von der Variante CS-Mikrogel + Fluorescein konnten nur ca. 25 % der Wiederholungen, aufgrund von schlechten Sichtverhältnissen, ausgezählt werden. Das gleiche gilt für CS-Mikrogel 160 mg/L Reinkupfer.

Bei allen Funguran®progress-Behandlungen und bei allen kupferbeladenen CS-Mikrogel-Behandlungen konnten nur vereinzelte geschlüpften Sporangien beobachtet werden, was auf eine gute Wirkung der Testsubstanzen schließen lässt.

Infektionsversuche mit Blattscheiben und Topfreben mit *P. viticola*

Im Anschluss an die Abwaschversuche wurden Infektionsversuche auf Blattscheiben mit *P. viticola* durchgeführt. Die Versuche zeigen, dass die Piwi-Sorten Regent und Calardis Blanc über alle Behandlungen hinweg einen geringeren Befall als die Sorten Müller-Thurgau und Spätburgunder. Betrachtet man also nur die Rebsorten Müller-Thurgau und Spätburgunder, so scheint die Leerformulierung von dem CS-Mikrogel mit Fluorescein auch nach dem Abwasch eine Schutzwirkung gegenüber der Rebenperonospora zu haben. Dagegen zeigt das, mit Kupfer beladene CS-Mikrogel mit dem LCI-Ankerpeptid keine Schutzwirkung und scheint komplett abgewaschen worden zu sein. Vergleichend lässt sich sagen, dass die Rebsorte Müller-Thurgau weniger anfällig gegenüber der Infektion zu sein scheint als Spätburgunder. Bei den Versuchen mit Kupfer sich ein geringerer Befall der Blattscheiben nach der Behandlung mit 160 mg/L Kupfer unabhängig davon, ob das Kupfer in Form von Funguran®progress oder in Form von CS-Mikrogel aufgetragen wurde. Auffällig ist, dass auch die Kupferkonzentration von 20 mg/L in Form von CS-Mikrogel eine Schutzwirkung zeigt, welche bei Funguran®progress in der gleichen Konzentration nicht zu sehen ist. Auch scheint die Kombination aus der CS-Mikrogel Leerformulierung und Fluorescein auf den Blättern von Müller-Thurgau eine Schutzwirkung zu haben, die mit der von 20 mg/L Kupfer in CS-Mikrogel vergleichbar ist. Auf den Blättern von Spätburgunder zeigt sich diese Wirkung nicht. In der statistischen Auswertung der Versuche sind keine Signifikanzen feststellbar.

Auch die kupferbeladenen Pektin-Mikrogele wurden zunächst in Blattscheiben-Assays getestet. Die Behandlungen wurden mit Funguran®progress und Pektin-Mikrogel in vier Konzentrationen durchgeführt (0 mg/L, 20 mg/L, 80 mg/L und 160 mg/L Kupfer). Es war sowohl bei Funguran®progress als auch bei dem Pektin-Mikrogel allgemein eine Dose-Response zu erkennen. Insgesamt kann das Pektin-Mikrogel in seiner Schutzwirkung mit dem Standard Funguran®progress mithalten. Bei beiden Rebsorten zeigt sich eine etwas bessere Schutzwirkung des Mikrogels in der Konzentration von 20 mg/L im Vergleich zu Funguran®progress in der gleichen Konzentration ($p = 0,013278$). Diese Beobachtung kann auch in höheren Konzentrationen gemacht werden. Hier ist der Unterschied jedoch kleiner und nicht mehr signifikant. Die Leerformulierung des Mikrogels scheint keinen Einfluss auf das Wachstum von *P. viticola* zu haben. Im Test von vier Komponenten der Ankerpeptide (DZ, DZ-MacHis, DZ-LCI, YeCBM32) hat keines davon einen Einfluss auf den Infektionserfolg mit Pero.

Freilandversuche mit *P. viticola*

Insgesamt wurde die Performance der Kupfer-beladenen Mikrogele in unterschiedlichen Jahren in Feldversuchen bewertet. Im Versuchsjahr 2021 wurde kupferbeladenes Pektin-Mikrogel hergestellt. Die Menge war ausreichend für einen klein angelegten Freilandversuch, in dem das Pektin-Mikrogel in verschiedenen Kupferkonzentrationen mit Funguran®progress und Chitosan verglichen werden sollte. Da es sich in dem Jahr 2021 um einen sehr nassen Sommer mit vielen Regenereignissen handelte, waren die Bedingungen für Peronospora an den Reben sehr gut und der Befall schon zu Beginn des Versuchs entsprechend hoch. Trotz der regelmäßigen Spritzungen entsprechend der Arbeitshinweise für den ökologischen Weinbau¹⁸ wiesen schon vor dem Start des Versuchs 60 % - 70 % der Gescheine Läsionen auf. Auch wenn Cabús et al. nachgewiesen haben, dass der Einsatz von Kupfer auch eine gewisse Zeit nach der Infektion noch wirksam sein kann²³, so wirkt Kupfer hauptsächlich präventiv²³. Diese Eigenschaft erklärt, aufgrund der vorherrschenden Witterungsbedingungen und dem hohen Infektionsdruck, die fehlende Wirkung aller Präparate in diesem Versuch.

In dem umfangreichen Freilandversuch im Versuchsjahr 2022 wurden Funguran®progress und Pektin-Mikrogel vergleichend eingesetzt. Die Bonituren zeigen keinen Unterschied zwischen den Behandlungen. Aufgrund des sehr trockenen und warmen Sommers war der Infektionsdruck durch Rebenperonospora verhältnismäßig gering²⁴. Es kam flächendeckend nur zu wenigen Infektionen, dies erklärt die fehlenden Unterschiede zwischen den Behandlungen, auch im Vergleich zur Kontrolle.

In den Analysen des Blattabwaschs ist kein Unterschied in der Kupferkonzentration zwischen der Funguran®progress- und der Mikrogel-Behandlung, der gleichen Kupferkonzentration messbar. Unabhängig davon, ob es zwischen den zwei Probennahmen zu Regenereignissen kam oder nicht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Ankerpeptid, welches an das Pektin-Mikrogel gekoppelt ist und die Adhäsion an die Rebblätter vermitteln soll, nicht in dem Maße wirkt, wie es Ziel des Projektes war. Es ist unklar, ob die Ursache dafür eine fehlende Wirksamkeit der Ankerpeptide ist, oder ob die Konzentration der Peptide im Präparat nicht ausreichend war. Diese Frage kann in weiterführenden Untersuchungen beantwortet werden.

Aufgrund der trockenen und warmen Wetterbedingungen im Sommer des Versuchsjahres 2022 kam es nur zu vereinzelt Infektionen der Reben mit *P. viticola*²⁴. Auch die Ergebnisse der qPCR-Analysen spiegeln dies wider. Es konnte in allen Behandlungen nur sehr wenig DNA von *P. viticola* im Abwasch der Blattproben nachgewiesen werden. Aufgrund der geringen Mengen und der geringen Mengenvariationen zwischen den Behandlungen, lässt sich keine Aussage über etwaigen Einfluss der Behandlungen auf die Quantität der *P. viticola*-DNA treffen. Unabhängig von diesen Ergebnissen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Behandlung der Reben mit höher dosiertem Kupfer (Funguran®progress 100 %) einen Rückgang der pilzlichen DNA zur Folge hat.

Um dennoch weitere Erkenntnisse zur Wirksamkeit der kupferbeladenen Pektin-Mikrogele gegenüber Rebenperonospora zu erzielen, wurde mit den Projektpartnern abgestimmt zusätzlich zu den Freilandversuchen einen Halbfreiland-Versuch mit Topfpflanzen durchzuführen. An den Ergebnissen der Halbfreilandversuche mit Topfpflanzen fällt die geringe Kupferkonzentration auf den Blättern auf, welche mit dem Pektin-Mikrogel behandelt wurden. Da diese Beobachtung unabhängig von Regenereignissen, über alle Wiederholungen hinweg, in unterschiedlicher Ausprägung gemacht werden konnte, scheint die Ursache nicht in der Haftung des Mikrogeles auf den Blättern zu liegen. Während der Versuche mit dem Pektin-Mikrogel ist aufgefallen, dass dieses in Wasser eine sehr hohe Sedimentationsgeschwindigkeit aufweist. Dies führt dazu, dass sich das Mikrogel schon innerhalb

weniger Sekunden in der Kartusche der Applikationskammer abzusetzen beginnt. Diese Eigenschaft ist wahrscheinlich mit ursächlich für die großen Unterschiede in der Kupferkonzentration auf den Blättern.

In drei Wiederholungen des Versuchs sind kleine Mengen Kupfer in der Negativkontrolle nachweisbar. Da es während dieser Versuchswiederholungen zu Regenereignissen kam und die Topfpflanzen in geringer Entfernung zueinander aufgestellt waren, liegt die Vermutung nahe, dass das Kupfer durch Spritzwasser übertragen wurde. In diesem Versuch zeigt sich, wie auch schon in ähnlichen vorangegangenen Versuchen, ein höherer Infektionserfolg auf den Blattscheiben der Sorte Spätburgunder. Diese Konstanz ist ein weiteres Indiz für wirksamere natürliche Schutzmechanismen von Müller-Thurgau gegen Rebenperonospora im Vergleich zu Spätburgunder. Im Unterschied zu vorangegangenen, ähnlichen Versuchen zeigt das Pektin-Mikrogel hier, im direkten Vergleich mit Funguran®progress, eine signifikant schlechtere Schutzwirkung auf beiden untersuchten Rebsorten. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass die Blattscheiben aus dem vorherigen Versuch mit Topfpflanzen stammen und die Auswertung dieses Versuchs eine sehr viel geringere Kupferkonzentration auf den Blättern ergab, welche mit Mikrogel behandelt wurden. Die Wirkung, welche das Mikrogel im Infektionsversuch auf den Blattscheiben zeigt, ist also das Resultat von einer Kupferkonzentration, die im Mittel 51,9 % der Kupferkonzentration, der mit Funguran®progress behandelten Pflanzen, entspricht.

Die Ergebnisse der Abwaschversuche legen nahe, dass das Pektin-Mikrogel mit der genutzten Waschmethode besser von den Rebblättern abgewaschen werden kann als die Vergleichsprodukte. Wenn diese Erkenntnis auf die bisher beschriebenen Versuche angewandt wird, ergeben sich durch Anwendung der berechneten Faktoren, neue Ergebnisse. Diese würden, im Vergleich mit Funguran®progress, eine geringere Kupferkonzentration der Gelformulierung auf den Rebblättern im Freiland bedeuten. Eine mögliche Ursache für Konzentrationsunterschiede ist ein Filter, der den Düsen bei der Spritzung vorgeschaltet war und Gelpartikel abgefangen haben könnte. Es würde sich ebenfalls eine proportional abnehmende Schutzwirkung der niedrigeren Kupferkonzentrationen, gegen *P. viticola* auf Spätburgunder zeigen. Auf Müller-Thurgau scheint die Schutzwirkung, trotz der geringeren Kupferkonzentration, ähnlich hoch zu sein, wie die von Funguran®progress. Dies würde die Beobachtungen der Infektionsversuche aus dem Versuchsjahr 2021 unterstützen, dass das Pektin-Mikrogel in geringen Konzentrationen besseren Schutz gegen Rebenperonospora bietet als Funguran®progress.

Projektteil Kirschessigfliege

Bereitstellung Spinosad für SpinoCaps-Produktion

Abweichend vom Projektantrag wurden keine Spinosad-haltigen Pektin-Mikrogele, sondern verschiedene Mikrokapselformulierungen auf ihre Eignung zur Bekämpfung und Eindämmung von *D. suzukii* untersucht. Diese wurden bei der Firma Agrolytix in Auftrag gegeben. Als Referenzprodukt wurde SpinTor® verwendet. Eine Übersicht der mit SpinTor®- oder Spinosad beladenen Mikrokapselprototypen, sowie die Kandidaten-Mikrokapseln kann **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** entnommen werden. Auf eine Konjugation von Ankerpeptiden sowie eine Inkorporation eines UV-Schutzes wurde aus technischen und zeitlichen Gründen verzichtet.

Tabelle 1: Bezeichnung und Inhaltsstoffe der Mikrokapsel-Prototypen und Kandidaten (*SpinTorCaps enthalten 4 % (w/w) SpinTor®).

Verwendete Bezeichnung	Emulgator und Anteil	Spinosad-anteil (w/w)	Komponente A und Anteil an der Trägersubstanz	Komponente B und Anteil an der Trägersubstanz
SpinTorCaps	Brij (20 %) Aerosil (1 %)	1,76 %*	Gehärtetes Sonnenblumenöl 100%	-
SpinosadCaps	Brij (20 %) Aerosil (1 %)	5 %	Gehärtetes Sonnenblumenöl 100%	-
Sonne100	Tween 20 %	5 %	Gehärtetes Sonnenblumenöl 100%	-
Sonne90Cande10	Tween 20 %	5 %	Gehärtetes Sonnenblumenöl 90%	Candelilawachs 10 %
Sonne90Roti10	Tween 20 %	5 %	Gehärtetes Sonnenblumenöl 90%	ROTIplast 10 %
WarePalm100	Tween 20 %	5 %	Waretta-Palmöl 100%	-

Im Laufe der Untersuchungen wurde eine zweite Charge von Sonne100, Sonne90Cande10 und Sonne90Roti10 produziert, die vor allem für die Tests mit Weinbeeren und im Freilandversuch 2022 verwendet wurden. Diese, sowie WarePalm100 wurden ebenfalls als Leerkapseln ohne Wirkstoff zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden vier weitere Leerformulierungen, die als Fluoreszenzfarbstoff 1 ‰ Nilrot und als Emulgator 20 % Tween enthielten, hergestellt. Hierbei bestanden die Trägersubstanzen aus 100% Sonnenblumenöl, 100 % Rapsöl, Sonnenblumenöl und Paraffinwachs im Verhältnis 70:30 beziehungsweise 90:10.

Bestimmung der Wirksamkeit von SpinTor® sowie der SpinTorCaps gegenüber *D. suzukii*

Zunächst wurde die generelle Wirkung der beiden für die Versuche genutzten Insektizid-Formulierungen SpinTor® und SpinTorCaps getestet. Beide zeigten in mehreren Durchläufen eine vergleichbare Effektivität gegen *D. suzukii* für den Grenzwert von 90 % Mortalität. Allerdings sind die LR₉₀-Werte grundsätzlich mit einem größeren Vertrauensintervall angegeben. Somit wurde ebenfalls der LR₅₀-Wert berechnet, der einen Unterschied zwischen den beiden Substanzen und somit eine Überlegenheit der SpinTorCaps gegenüber SpinTor® zeigt. Dies könnte daran liegen, dass die SpinTorCaps zu einer höheren Exposition des Wirkstoffs durch ein Anhaften der Kapsel an der Fliege selbst führen oder als auch Futtermittel interessant sein könnte, wodurch die Fliegen eine erhöhte Menge des Wirkstoffes aufnehmen.

Anhand der Dosis-Wirkungskurven und der daraus erhaltenen LR₅₀-Werte konnte der Kandidat WarePalm100 klar ausgeschlossen werden. Auch im direkten Vergleich aller Kandidaten in einer hohen und niedrigen Rate schnitt WarePalm100 am schlechtesten ab. Dieser führte auch beim Ansetzen der Suspensionen zu einem Verklumpen und zeigte ein schlechtes Einwiege-Verhalten und führte zu einem Verstopfen der Düsen. Die höheren LR₅₀ Werte, die mit Weintaubenbeeren der Sorte Regent erzielt wurden, sind wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass es sich bei den Kandidaten um eine zweite Charge handelte, die neu hergestellt wurde. Der tatsächlich aktive Spinosad-Gehalt wurde nicht ermittelt, aber es wird vermutet, dass dieser im Vergleich zur ersten Charge verringert war. Auch bei der Untersuchung zur Eignung von Blattscheiben wurde die zweite Charge des Kandidaten Sonne90Cande10 verwendet, was zur Erklärung der geringen Mortalität von 10 % bei 0,8 mg/m² oder 30 % bei 2 mg/m² gegenüber der LR₅₀ von 1 mg/m² der ersten Charge auf Tafeltraubenbeeren beiträgt. Die Betrachtung der Ergebnisse, die anhand der zweiten Charge von Sonne90Cande10 und den Weinbeeren der Sorte Regent generiert wurden, lässt vermuten, dass die Effektivität auch vom Reifestatus beeinflusst wird.

Generell ist festzuhalten, dass die Mortalität, die durch einen Kandidaten hervorgerufen wird, zwischen den einzelnen Durchläufen stark schwankt. Dies kann mit den nicht standardisierbaren Beeren (Tafeltraubensorte und Reife der Weintrauben) erklärt werden. Daher wurden nur Werte, die innerhalb eines Tests gewonnen wurden, miteinander verglichen. Es wird empfohlen mehrere Durchläufe pro Kandidaten und Testmethodik durchzuführen und diese dann mit dafür geeignete Dosis-Wirkungskurven-Modellen zu analysieren. Aufgrund der fortgeschrittenen Projektlaufzeit konnte dies nicht mehr durchgeführt werden und es musste auf eine Validierung der Ergebnisse verzichtet werden.

Effektivität unter realen Bedingungen in Halbfreilandversuch mit SpinosadCaps und SpinTor® im Jahr 2021

Im Parzellenspritzgerät gibt es aus technischen Gründen kein Rührwerk. Durch die hohe Sedimentationsgeschwindigkeit der SpinosadCaps kam es zum Verstopfen der Vorfilter und auch der Düsen. Daher ist die Zielrate von 12 mg Spinosad/m² nicht erreicht worden. Weiter konnte die Effektivität durch Witterungsbedingten nur im direkten Vergleich zwischen SpinTor® und SpinosadCaps nach einem Regenschauer von 9 L/m² erfolgen und nicht wie geplant zwischen einem frischen und einem gealterten Spritzbelag der beiden Mittel.

Die im Traubentest anhand von Weintrauben der Sorte ‚Reberger‘ erzielten Mortalitäten lagen weit unterhalb des angestrebten Grenzwertes von 90 %. Nach nur 24h unter Freilandbedingungen war auch für das Mittel SpinTor® kein ausreichender Pflanzenschutz gegeben, obwohl 12 mg/m² über der Rate liegt, die normalerweise, wenn man die ganze Laubwand spritzt, ausgebracht wird. Da die behandelte Fläche aber nicht der gesamten Laubwandhöhe entsprach, war die Rate für die Grundfläche nicht überschritten.

Plastiktrauben sind aufgrund der Ergebnisse nicht für Freilandversuche geeignet. Es wird vermutet, dass entweder die Mittel gänzlich abgewaschen wurden oder die Trauben generell nicht als Ersatz für echte Trauben verwendet werden können. Zusätzlich führt das Spritzen im Freiland zu einer weitaus höheren Variabilität der Mortalität als es im Labor der Fall ist. Dies liegt zum einen an technischen und menschlichen Faktoren aber auch an der Möglichkeit, dass eine Traube durch Blattwerk oder andere Trauben zumindest zum Teil im Spritzschatten liegt.

Die unter Laborbedingung mit SpinTor® applizierten Deko-Trauben führten zu einer 0 %-igen Mortalität. Bei 100 Fliegen, die insgesamt für diese Behandlung eingesetzt wurden, wurde keine tote Fliege gezählt, obwohl beobachtet wurde, dass die Fliegen auf den Deko-Trauben saßen. Bei den mit SpinosadCaps und einer Wirkstoffrate von 11 mg/m² behandelten Plastiktrauben wurde eine Mortalität von 55 % erzielt. Diese liegt ebenfalls weit unter der Zielgröße von 90 %, aber dieses Ergebnis lässt ebenfalls vermuten, dass die Trägersubstanz eventuell als Futter attraktiv sein könnte oder dass die SpinTorCaps durch das Abstreifen und Anlagern an der Fliege zu einer verlängerten Wirkstoffexposition und demnach eher zum Tod führen. Daher wurde der vorher beschriebene Versuch zur Untersuchung zur Attraktivität von unbeladenen Mikrokapseln durchgeführt.

Anhand des Tests konnte gezeigt werden, dass die Substanzen als Futter wahrscheinlich unattraktiv sind. Da die Männchen auch in der Zucht generell häufiger an den Tränken zu finden sind, wird davon ausgegangen, dass dies auch hier der Grund ist, warum weniger Männchen als Weibchen an den applizierten Flächen gezählt wurden. Daher wird nicht von einer repellenten Wirkung ausgegangen.

Allerdings ist die Trennschärfe des Tests durch generell wenige Fliegen an der mit Zuckerlösung behandelten und somit attraktiven Fläche sehr gering. Auf eine weitere Methodenentwicklung wurde zugunsten der im Antrag aufgeführten Fragen und den im Frühjahr 2022 erhaltenen verschiedenen Mikrokapselkandidaten verzichtet.

Halbfreilandversuch mit drei Mikrokapsel-Kandidaten und SpinTor® im Jahr 2022

Die unzureichende Mortalität von unter 90 %, die anhand der frisch applizierten Trauben erzielt wurde, kann durch die gegenüber der empfohlenen Rate (7,68 mg Spinosad/m² Grundfläche) verringerte ausgebrachte Rate (6,4 mg Spinosad/m² behandelte Fläche bei einer Höhe von 1,2 m) erklärt werden. Der neue Rebschutz Leitfaden 2023 der Bayerischen Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau empfiehlt eine Rate von 90 ml/ha behandelte Fläche zur Bekämpfung der Kirschessigfliege. Dies entspricht einer Wirkstoffrate von 4,32 mg/m², die noch unterhalb der hier untersuchten Rate liegt. Ein weiterer Grund könnte die Applikationstechnik als solches sein, da der Wirkstoff in Verbindung mit Wasser, mit dem das Mittel verdünnt und ausgebracht wird, und UV-Licht einer schnellen Degradation unterliegt. Am Tag der Applikation war es sonnig. Die Effektivität der Mikrokapselkandidaten ist mit der von SpinTor® zunächst vergleichbar. Diese nimmt aber im gealterten Zustand massiv ab. Es ist jedoch zu bedenken, dass bei den hier untersuchten Mikrokapseln weder Ankerpeptide noch ein UV-Schutz involviert sind. Dies zeigt, dass die Kandidaten ohne weitere Entwicklungs- und Forschungsarbeit keine Alternative zu SpinTor® darstellen.

V. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und Verwendbarkeit der Ergebnisse

Projektteil Rebenperonospora

Die Ergebnisse zeigen eine gute bis sehr gute Wirksamkeit von kupferbeladenen Pektin-Mikrogelen gegen *Plasmopara viticola* an Weinreben. Die Wirkung ist bei gleicher Kupferkonzentration ebenso wirksam, wie die des im Projekt verwendeten Referenzprodukts Funguran®progress. Der ursprünglich erwartete Vorteil der mit Ankerpeptiden verknüpften Kupfer-Mikrogele, die erhöhte Regenfestigkeit, konnte leider nicht gezeigt werden. Die verlängerte Haltbarkeit der Gelformulierung auf der Pflanze im Freiland konnte nicht bestätigt werden. Diese gute Wirksamkeit der Mikrogele ist somit für die Praxis aktuell noch irrelevant, da sie keinen Vorteil gegenüber herkömmlichen Kupfer-Präparaten beinhaltet. Die gewonnenen Erkenntnisse bieten jedoch Potenzial für weitere Forschung und die Weiterentwicklung der „GreenGel“-Technologie mit anderen, wirksameren Adhäsionsproteinen.

Projektteil Kirschessigfliege

Die unter Laborbedingung erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Effektivität der mit Spinosad beladenen Mikrokapseln generell mit der Effektivität von SpinTor® vergleichbar ist. Abweichungen von dieser Aussage beinhalten die nicht überprüfte Vermutung eines bei Einmischung bereits degradierten Wirkstoffes. Unter realen Bedingungen ist ihre Effektivität gegenüber SpinTor® vermindert. Allerdings waren die im Projektantrag aufgeführten eigenschaftsverbessernden chemisch-physikalischen Anpassungen wie Ankerpeptide oder ein UV-Schutz, aufgrund der Gegebenheiten nicht realisierbar. Um die Mikrokapseln zur Anwendungsreife zu bringen, bedarf es weiterer Forschungs- und Entwicklungsarbeit.

VI. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten und tatsächlich erreichten Ziele

Das Gesamtziel des Projekts war die Validierung einer neuartigen, innovativen und regenbeständigen Abgabe-Technologieplattform (sog. „GreenGel“) zur effektiven Bekämpfung von Schadorganismen der Weinrebe bei verringertem Pestizideinsatz. Insbesondere der ökologische Weinbau sollte durch das Vorhaben gestärkt werden. Im beantragten Projekt wurde angestrebt zwei regenbeständige Mikrogel-Systeme für zwei Anwendungsfelder zu entwickeln.

Es ist im Laufe der Projektlaufzeit gelungen ein Pektin-Mikrogel zu entwickeln, welches mit Cu^{2+} -Ionen beladen und durch Sprühapplikation ausgebracht werden kann. In Labor- und Halbfreilandversuchen konnte eine gute Wirkung des Mikrogels gegen Rebenperonospora nachgewiesen werden. Die Wirksamkeit variierte zwischen verschiedenen Rebsorten. Trotz des Einsatzes vielversprechender Adhäsionsproteine, konnte keine Regenbeständigkeit des Mikrogels auf Reblättern erreicht werden. Dies bietet eine Grundlage für weitere Forschung zur Verbesserung des Systems. Auch die hohe Sedimentationsgeschwindigkeit des Mikrogels in Flüssigkeit bietet einen Ansatz zur Optimierung.

Zu Beginn des Projektes wurden unterschiedliche Versuche unternommen, um die insektiziden Bestandteile des Produktes Spintor® in Pektin-Mikrogelen zu verpacken. Die Spinosyne A und D ließen sich dabei nicht erfolgreich formulieren. Nach regem Austausch mit dem Partnerprogramm Vitifit unter der Leitung von Frau Prof. Berkelmann-Loehnertz konnte der Kontakt zu Dr. Stefan Schwab hergestellt werden, welcher ebenfalls im Vitifit-Projekt beteiligt ist. Dieser hat eine Verkapselungstechnologie entwickelt, mit der bereits vor einigen Jahren erfolgreich Spinosad verkapselt werden konnte. Für den Ansatz des EcoGuard-Projekts wurden in Kooperation mit Herrn Schwab Fettkapseln entwickelt, welche den Wirkstoff Spinosad enthielten. Die Versuche zeigten vielversprechend auf, dass das verkapselte Spinosad in der Lage ist, die KEF zu bekämpfen. Für eine tatsächliche Anwendung in der Praxis befindet sich diese Darreichungsform jedoch noch in einem zu frühen Stadium, sodass weitere Entwicklungsarbeiten von Nöten wären.

VII. Zusammenfassung

Ziel des EcoGuard-Projektes war die Entwicklung und Anwendung von bioabbaubaren und biokompatiblen Mikrogelen für den Schutz von Weinreben vor Pilzinfektionen, sowie der Kirschessigfliege. In einem ersten Schritt wurden Ankerpeptiden identifiziert, die an Weinblätter und -trauben binden können. Dabei wurden drei vielversprechende Anker identifiziert, z.B. die natürlich vorkommenden Peptide LCI und MacHis. Diese Ankerpeptide sollten im Weiteren dazu verwendet werden, die Mikrogel-Container regenfest an Weinblättern zu befestigen. Ein neuer Ansatz zur Verkapselung von Kupfer(II)-Salzen boten Mikrogele auf Pektin-Basis. Im Rahmen des Vorhabens wurden hierbei verschiedene Beladungsmethoden und Skalierungsverfahren untersucht. Zusätzlich wurden sowohl mit den Ankerpeptiden allein als auch mit den Mikrogel gekoppelten Versionen, Tests zur Benetzbarkeit und Applikation der neuartigen Formulierung auf Weinblättern und -beeren durchgeführt. Gerade um die stark hydrophobe Beerenhaut der Trauben benetzen zu können, haben sich hierbei Produkte wie z.B. WETCIT bewährt. In Schlupftests mit *P. viticola*-Zoosporen, dem Erreger des Falschem Mehltaus auf Weinreben, zeigte sich, dass abgesehen von den Referenzprodukten nur die Kupfer-beladenen Mikrogele eine deutliche Reduktion der Schlupfrate zur Folge haben. Die Einzelkomponenten der Formulierung beeinträchtigen diese demnach nicht. Weiterführende Infektionsversuche mit Blattscheiben aus Weinblättern und Halbfreiland-Versuche mit Topfreben konnten diese vermittelte Schutzwirkung von Kupfer-beladenen Mikrogelen gegenüber Weinrebenperonospora reproduzierbar bestätigen. Leider zeigte sich jedoch in den durchgeführten Freilandversuchen mit *P. viticola*, dass die Leistung der Kupfer-beladenen Mikrogel in realen Anbausituationen meist nicht für einen ausreichenden Schutz sorgen kann. Höchstwahrscheinlich liegt dies an der raschen Degradation der Mikrogele an sich bzw. der nur mäßigen Anbindung der Mikrogele an die Blattoberfläche. Abwaschversuche von Weinblättern, die zuvor mit dem Referenzprodukt bzw. den kupferbeladenen Mikrogelen behandelt wurden, zeigten, dass deutlich mehr Kupfer durch eine artifizielle Beregnung abgewaschen wird, wenn es in Pektin-Mikrogelen verpackt war. Um die „GreenGel“-Technologie für die Bekämpfung des Rebenperonosporas nutzbar zu machen sind somit weitere Forschungsarbeiten notwendig, um die entscheidende Regenfestigkeit weiter zu optimieren.

Zeitgleich wurden im EcoGuard-Projekt neuartige Insektizid-Formulierungen mit verkapseltem Spinosad entwickelt, deren Einsatz gegen die Kirschessigfliege (*Drosophila suzukii*) untersucht wurde. Dazu wurden Mikrokapseln mit Kombinationen verschiedener Komponenten hergestellt und deren Eignung für eine Anwendung getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass die sogenannten SpinoCaps eine vergleichbare Effektivität gegen *D. suzukii* aufwiesen wie das Referenzprodukt SpinTor®, wobei SpinoCaps einen möglichen Vorteil aufgrund einer erhöhten Exposition des Wirkstoffs zeigten, da diese höchstwahrscheinlich an den exponierten Fliegen kleben bleiben. In einem Halbfreilandversuch im Jahr 2022 zeigte sich allerdings, dass die Wirksamkeit der Mikrokapsel-Kandidaten im Vergleich zu SpinTor® stark abweicht, insbesondere je länger der Zeitraum zwischen Applikation und der eigentlichen Exposition der Fliegen gegenüber den behandelten Trauben. Dies deutet stark darauf hin, dass die Mikrokapseln ohne weitere intensive Forschungsarbeit wahrscheinlich keine Alternative zum Referenzprodukt SpinTor® darstellen können. Die niedrige Mortalität der Fliegen und die Herausforderungen bei der Anwendung und exakten Dosierung betonen die Komplexität der Bekämpfung der Kirschessigfliege und die Notwendigkeit weiterer Forschung und Entwicklung in diesem Bereich.

VIII. Literaturverzeichnis

1. Meurer, R. A. et al. Biofunctional microgel-based fertilizers for controlled foliar delivery of nutrients to plants. *Angew. Chemie Int. Ed.* 56, 7380–7386 (2017).
2. Kühne, S., Strassemeyer, J. & Roßberg, D. Anwendung kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel in Deutschland. *J. für Kulturpflanzen.* 61, 126–130 (2009).
3. Diesner, M.-O. et al. Kupfer im Bio-Landbau: Hintergrund, Herausforderungen und Handlungsempfehlungen. (2014).
4. Schneider, V. Kupfer gegen Böckser. *Der Winzer* (2013).
5. Kula, C. Guske, S. in Alternativen zur Anwendung von Kupfer als Pflanzenschutzmittel 11–16 (2002).
6. Kühne, S. et al. Status Quo der Anwendung kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel in der deutschen Landwirtschaft und dem Gartenbau. *J. für Kulturpflanzen* 68, 9–196 (2016).
7. Kast, W. Untersuchungen zur Dauerhaftigkeit der Resistenz neuer Rebsorten. (2015). <https://www.landwirtschaft-bw.info/pb/,Lde/670090>.
8. Ellis, M. A. & Mizuho, N. Organic small fruit disease management guidelines. (2004).
9. Perazzolli, M., Dagostin, S., Ferrari, A., Elad, Y. & Pertot, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biol. Control* 47, 228–234 (2008).
10. EC-CORDIS European Council-Community Research and Development Information Service. (2011).
11. Hunsche, M., Alexeenko, A., Damerow, L. & Noga, G. Rain-induced removal of copper from apple leaves: Influence of rain properties and tank-mix adjuvants on deposit characteristics at the micro scale. *Crop Prot.* 30, 495–501 (2011).
12. Schmutterer, H. & Huber, J. Natürliche Schädlingsbekämpfungsmittel (2005).
13. Koch, H., Hill, G. & Knewitz, H. Untersuchungen zur differentiellen Belagsbildung an Blättern, Stielgerüst und Beeren bei der Ausbringung von Pflanzenschutzmitteln im Weinbau und deren potenzielle epidemiologische Relevanz. *Mitteilungen aus der Biol. Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 400, 168 (2006).
14. Gautam, B. K. et al. Effect of simulated rainfall on the effectiveness of insecticides against spotted wing drosophila in blueberries. *Crop Prot.* 81, 122–128 (2016).
15. Mellati, A., Dai, S., Bi, J., Jin, B. & Zhang, H. A biodegradable thermosensitive hydrogel with tuneable properties for mimicking three-dimensional microenvironments of stem cells. *RSC Adv.* 4, 63951–63961 (2014).
16. Schachschal, S. et al. Encapsulation of enzymes in microgels by polymerization/cross-linking in aqueous droplets. *Colloid Polym. Sci.* 289, 693–698 (2011).
17. Rahnamaeian, M. Antimicrobial peptides: Modes of mechanism, modulation of defense responses. *Plant Signal. Behav.* 6, 1325–1332 (2011).
18. Fader, B., Heller, F. Info Ökologischer Weinbau. Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum Rheinhessen-Nahe-Hunsrück. Land Rheinland-Pfalz (2022)
19. Dittrich, J., Brethauer, C., Goncharenko, L., Bührmann, J., Zeisler-Diehl, V., Pariyar, S., Jakob, F., Kurkina, T., Schreiber, L., Schwaneberg, U., and Gohlke, H. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2022 14 (25), 28412-28426.
20. Apitius, L., Buschmann, S., Bergs, C., Schönauer, D., Jakob, F., Pich, A., Schwaneberg, U., Biadhesive Peptides for Assembling Stainless Steel and Compound Loaded Micro-Containers. *Macromol. Biosci.* 2019, 19, 1900125.
21. Abbott DW, Hrynuik S, Boraston AB. Identification and characterization of a novel periplasmic polygalacturonic acid binding protein from *Yersinia enterocolitica*. *J Mol Biol.* 2007 Apr 6;367(4):1023-33.
22. Lianqi Cao, Wei Lu, Analucia Mata, Katsuyoshi Nishinari, Yapeng Fang, Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review, *Carbohydrate Polymers*, Volume 242, 2020.

23. Cabús, A.; Pellini, M.; Zanzotti, R.; Devigili, L.; Maines, R.; Giovannini, O.; Mattedi, L.; Mescalchin, Efficacy of reduced copper dosages against *Plasmopara viticola* in organic agriculture. *Crop Protection*. Vol. 96, 103-108 (2017).
24. Gessler, C.; Pertot, I.; Perazzolli, M.: *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*, 50 (1), 3-44 (2011).

IX. Veröffentlichungen

Unsere vorläufigen Ergebnisse haben wir sowohl auf der 4. und 5. Europäischen Kupfertagung als auch auf der Deutschen Pflanzenschutztagung im Jahr 2021 im Rahmen von wissenschaftlichen Vorträgen präsentiert. Wir haben dort durchweg positives Feedback erhalten, sowohl von Kollegen aus der Wissenschaft als auch Vertretern der Industrie. Unsere Kollegin Carolin Rauch vom JKI Siebeldingen gewann mit ihrer Präsentation der kupferbeladenen Pektin-Mikrogele den Posterpreis der Deutschen Pflanzenschutztagung 2021. Daraufhin wurden wir erneut eingeladen die „GreenGel“-Technologie auf der 6. Europäischen Kupfertagung im November 2021 zu präsentieren.

Auch im Jahr 2022 haben wir Teile der Projektergebnisse auf wissenschaftlichen Tagungen vorgestellt, so zum Beispiel auf der ersten Tagung des Bund ökologische Lebensmittelwirtschaft (BOELW) ‚Way forward in organic plant health care strategies‘.

Präsentationen

Schwinges, P., Leiser, R., Pirchner, J., Sassmann, T., Boes, A., Rauch, C., Schwab, S., Hoffmann, C., Pich, A., Schwaneberg, U., Conrath, U. (2022) Strategies for Copper Reduction (and others to reduce pesticide-use in general). Way forward in organic plant health care strategies, BOELW, Online-Format.

Schwinges, P., Sassmann, T., Boes, A., Bauer, L., Pariyar, S., Schwab, S., Hoffmann, C., Pich, A., Schwaneberg, U., Conrath, U. (2022) Microgels and other containers that support reduced pesticide use. Plant BioProTech congress, Reims, France.

Rauch, C.; Fischer, M. (2021) Application of „GreenRelease“-technology in organic viticulture for regulation of downy mildew. 6th European Conference on Copper, Online-Format.

Schwinges, P., Jakob, F., Töpel, A., Pariyar, S., Noga, G., Zierul, J., Knief, C., Wustmans, M., Bröring, S., Pich, A., Schwaneberg, U., Langenbach, C., Conrath, U. (2021) Regenfeste Abgabesysteme für einen effizienteren Kupfer-basierten Pflanzenschutz. 62. Deutsche Pflanzenschutztagung, Online-Format.

Poster

Rauch, C.; Fischer, M. (2021) Anwendbarkeit der „GreenRelease“-Technologie im ökologischen Weinbau zur Bekämpfung des Falschen Mehltaus. 62. Deutsche Pflanzenschutztagung, Online-Format.