

Wirkung entomopathogener Pilze gegen die Kirschfruchtfliege *Rhagoletis cerasi*.

Claudia Daniel^{1,2}, Siegfried Keller³ & Eric Wyss¹

¹ Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), Schweiz

² Department für Pflanzenwissenschaften, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, TU München

³ Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, Schweiz

Abstract: Susceptibility of different life stages of *Rhagoletis cerasi* to entomopathogenic fungi.

The effects of six fungus strains (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the mortality of different life stages of the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* LOEW (Diptera: Tephritidae), were assessed in a series of laboratory experiments. All fungus strains caused mycoses in larvae and adults of *R. cerasi*. Virulence however varied considerably between the strains. Effects on L₃-larvae were negligible; none of the fungus strains caused mortalities of more than 25% of larvae. Adults by contrast were highly susceptible to fungal infection. *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* caused 90 to 100% mortality and had a strong influence on fecundity. *Metarhizium anisopliae* also showed reliable effects. The pathogenicity of *Paecilomyces farinosus* was low. Higher conidia concentrations lead to higher mortality, whereas *B. bassiana* was most efficient at low concentrations. Young flies showed lower mortality rates than older flies but, sub-lethal effects on eclosion rate of eggs were greater in young than in older flies.

Key words: Diptera, Tephritidae, *Rhagoletis cerasi*, Biocontrol, entomopathogenic fungi, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*.

C. Daniel, Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), Ackerstrasse, 5070 Frick, Schweiz; claudia.daniel@fibl.org

Die Kirschfruchtfliege *Rhagoletis cerasi* Loew (Diptera: Tephritidae) ist der wichtigste Schädling im Süßkirschenanbau in Europa. Bei unbehandelten Bäumen können bis zu 100% der Kirschen Madenbefall aufweisen. Da Handel und Verbraucher nur einen Befall von maximal 2% tolerieren, sind effiziente Bekämpfungsmaßnahmen gefragt. Der bisher verwendete Wirkstoff Dimethoate könnte im Zuge der Re-Evaluation von Pflanzenschutzmitteln in der EU seine Zulassung verlieren. Danach stünde die gesamte Kirschenproduktion in Europa vor der gleichen Situation wie derzeit der biologische Landbau: eine Regulierung der Kirschfruchtfliege wäre nur noch über Leimfallen oder durch den Einsatz von Netzen möglich. Beide Methoden sind sehr arbeitsintensiv und oft nicht ausreichend wirksam. Der Einsatz von Mikroorganismen als Biocontrol-Maßnahme könnte eine Alternative darstellen. Die Verwendung von entomopathogenen Pilzen zur Bekämpfung von Tephritiden wurde in den letzten Jahren von mehreren Autoren beschrieben (ANAGNOU-VERONIKI et al., 2005; EKESI et al., 2005; KONSTANTOPOULOU & MAZOMENOS, 2005; YEE & LACEY, 2005), wobei bisher noch keine Erfahrungen zu *R. cerasi* vorliegen. Ziel dieser Untersuchung war die Beurteilung verschiedener Pilzstämmen (Deuteromycotina: Hyphomycetes) hinsichtlich ihrer Pathogenität und Virulenz gegen die Kirschfruchtfliege.

Material und Methoden

Die verwendeten Pilzstämmen stammten grösstenteils aus Feldsammlungen in der Schweiz (*Paecilomyces fumosoroseus* 531, *P. farinosus* 954, *Metarhizium anisopliae* 714, *M. anisopliae* 786), darüber hinaus wurden auch zwei kommerzielle Pilzstämmen (*Beauveria bassiana* ATCC 74040, Produkt: Naturalis-L, Intrachem Bio Italia S.p.A.; *Paecilomyces fumosoroseus* Apopka 97, Produkt: PreFeRal®WG, Biobest N.V. Belgien) in den Versuchen geprüft. Alle Pilzstämmen wurden auf selektivem Medium nach STRASSER et al. (1996) bei 20-25°C vermehrt. Von den reifen Kolonien wurden Konidien suspensionen mit 0.05% Tween®80 hergestellt. Die Keimfähigkeit der Konidien wurde durch Ausplattieren einer verdünnten Suspension auf Wasseragar erfasst.

Die Versuchsinsekten stammten aus Feldsammlungen in der Nordwestschweiz: madige Kirschen wurden gesammelt, die Verpuppung der Larven erfolgte in feuchtem Quarzsand, anschließend wurden die Puppen mindestens 160 Tage bei 2-4°C gelagert, um die Diapause zu brechen. Der Schlupf der Fliegen, wie auch die nachfolgenden Versuche fanden im Klimschrank bei einer Photoperiode von 16 Stunden, einer Temperatur von 23°C (Tag) bzw. 17°C (Nacht) und einer relativen Luftfeuchte von 65% statt. Die Fliegen wurden in zylindrischen Plastikkäfigen (Durchmesser 10cm, Höhe 25cm) gehalten und hatten Zugang zu Wasser und Futterstreifen nach BOLLER (1989). Da bei den Versuchen im Winter keine Kirschen für die Eiablage zur Verfügung standen, wurden einem Vorschlag von GEIPEL (2001) folgend Weintrauben angeboten.

Für die Versuche wurden die Fliegen nach Geschlecht und Alter homogen auf die Verfahren und Wiederholungen aufgeteilt. Die Behandlung erfolgte durch direktes Besprühen der Fliegen mit der Konidiensuspension. Die Kontrollgruppe wurde mit Wasser (+0.05% Tween®80) behandelt. Die Anzahl Konidien pro Fliege wurde nach der Methode von DIMBI et al. (2003) für den Pilzstamm *M. anisopliae* 714 bestimmt. Die Mortalität und Eiablage der Fliegen wurde während 32 Tagen täglich überwacht. Tote Fliegen wurden auf feuchtem Torf ausgelegt, um Pilzinfektionen nachzuweisen.

In einem ersten Versuch wurden 1-5 Tage alte Fliegen (5 Wiederholungen mit je 5♀ und 7♂) mit Konidiensuspensionen (10^7 Konidien/ml; Keimfähigkeit der Konidien nach 48h: >65%) behandelt. Im zweiten Versuch wurden der Einfluss der Konidienkonzentration erfasst: 1-5 Tage alte Fliegen (5 Wiederholungen mit je 9♀ und 5♂) wurden mit drei verschiedenen Konzentrationsstufen (1×10^7 , 5×10^5 , 2.5×10^4 Konidien/ml; Keimfähigkeit der Konidien nach 48h: >90%, außer *P. fumosoroseus* 97: 20%) der Pilzstämme behandelt. In einem dritten Versuch wurden verschiedene Altersstufen von Fliegen (0-1 Tag alt; 3-4 Tage; 6-7 Tage; jeweils 5 Wiederholungen mit je 8♀ und 8♂) mit Konidiensuspensionen (10^7 Konidien/ml; Keimfähigkeit der Konidien nach 48h: >79% außer *B. bassiana* 74040: 27%) behandelt. In diesem Versuch wurde die Fertilität der Eier mit erfasst.

Im Weiteren wurde die Wirkung der Pilze auf verpuppungsbereite Larven erfasst: in einer Obstananlage wurden große Tücher unter den Bäumen aufgespannt, um die herabfallenden Maden aufzufangen. Die Maden wurden aufgesammelt und innerhalb von 5 Minuten nach dem Herabfallen für 5 Sekunden in eine Konidiensuspension (10^7 Konidien/ml; Keimfähigkeit der Konidien nach 48h: >75%) getaucht (4 Wiederholungen mit je 6L₃ Larven). Die Verpuppung der Larven erfolgte in feuchtem Quarzsand, die Brechung der Diapause und der Schlupf der Fliegen unter oben beschriebenen Bedingungen. Verpuppungsrate der Larven, Pilzinfektion der Puppen, Schlupfrate und Mortalität der adulten Fliegen wurden erfasst.

Resultate

Die Anzahl Konidien pro Fliege schwankte zwischen $2.2 - 8.8 \times 10^4$ Konidien pro Individuum, wobei an weiblichen Fliegen etwas mehr Konidien anhafteten ($5.1 \pm 0.68 \times 10^4$) als an männlichen Fliegen ($3.9 \pm 0.27 \times 10^4$). Diese Geschlechtsunterschiede waren jedoch nicht signifikant (Daten transformiert [$\log_{10}(x+1)$]; one-way-ANOVA: $F_{1,19} = 1.8387$, $p = 0.1910$).

Alle geprüften Pilzstämme waren pathogen für adulte Kirschfruchtfliegen, wobei die Virulenz der Pilzstämme sehr unterschiedlich war (Abb. 1). Während der ersten zehn Tage nach Versuchsbeginn konnte bei allen toten Fliegen (außer in der Kontrolle) eine Pilzinfektion nachgewiesen werden. Mit zunehmender Versuchsdauer nahm die Verpilzungsrate ab bzw. die natürliche, nicht pilzbedingte Mortalität zu. Dreißig Tage nach Versuchsbeginn lag die Verpilzungsrate bei *B. bassiana* 74040, *P. fumosoroseus* 531, *M. anisopliae* 786 immer noch bei über 90%, während bei *M. anisopliae* 714 und *P. farinosus* 954 nur 41 - 44% der toten Tiere eine Pilzinfektion aufwiesen. Die Anzahl abgelegter Eier ist ebenfalls in Abbildung 1 dargestellt: *B. bassiana* 74040 und *P. fumosoroseus* 531 erreichten bezüglich der Anzahl abgelegter Eier einen Wirkungsgrad (ABBOTT) von über 90%.

In Abbildung 2 sind die Ergebnisse des zweiten Versuches dargestellt: wie zu erwarten stieg die Mortalität mit zunehmender Konzentration. Die höchste Konzentration (1×10^7 Konidien/ml) unterschied bezüglich der Mortalität nach 5 Tagen, nach 30 Tagen, wie auch bezogen auf die Eiablage signifikant von der niedrigsten Konzentration (2.5×10^4 Konidien/ml), wie auch von der Kontrolle. Bei mittlerer Konzentration (5×10^5 Konidien/ml) unterschieden sich die Mortalitätsraten 30 Tage nach der Behandlung bei allen Pilzstämmen signifikant von der Kontrolle, jedoch nur *B. bassiana* 74040 konnte auch die Eiablage im

Vergleich zur Kontrolle reduzieren. Beim Vergleich der niedrigsten Konzentration (2.5×10^4 Konidien/ml) mit der Kontrolle ergaben sich nur hinsichtlich der Mortalität nach 30 Tagen signifikante Unterschiede bei *B. bassiana* 74040.

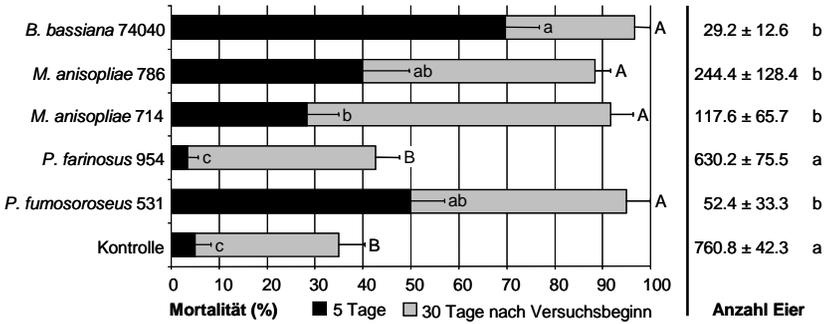


Abb. 1: Prozentuale Mortalität der Fliegen (\pm se) 5 und 30 Tage nach der Behandlung, sowie Anzahl Eier pro Wiederholung (\pm se). (Statistik: Mortalität: Daten transformiert $[\arcsine\sqrt{x}]$, One-way ANOVA, Tukey Test $\alpha=0.05$, Tag 5: $F_{5,24}=17.28$, $p<0.0001$, Tag 30: $F_{5,24}=21.38$, $p<0.0001$; Eier: One-way ANOVA, Tukey Test $\alpha=0.05$, $F_{5,24}=19.19$, $p<0.0001$).

Der Einfluss des Fliegenalters bei der Pilzbehandlung auf Mortalität und Eiablage wurde in einem weiteren Versuch untersucht. Bei allen Pilzstämmen wurde dabei derselbe Trend beobachtet: ältere Fliegen (3-7 Tage alt) starben schneller und zeigten höhere Mortalitätsraten als junge Fliegen (0-1 Tag alt). Die Fekundität der älteren Fliegen war ebenfalls etwas stärker reduziert als bei den jüngeren Fliegen. In diesem Experiment

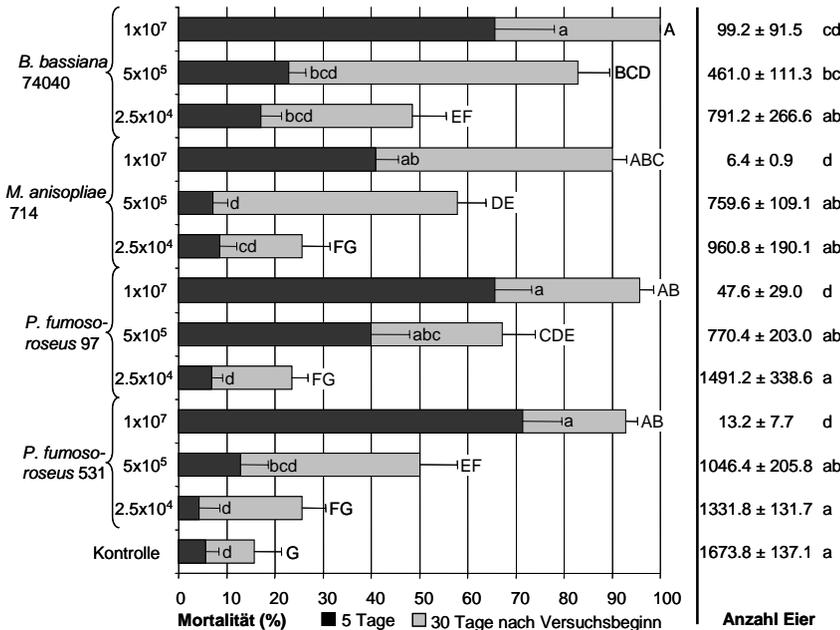


Abb. 2: Prozentuale Mortalität der Fliegen (\pm se) 5 und 30 Tage nach der Behandlung mit Konidien suspension in drei Konzentrationsstufen, sowie Anzahl Eier pro Wiederholung (\pm se). (Statistik: Mortalität: Daten transformiert $[\arcsine\sqrt{x}]$, One-way ANOVA, Tukey Test $\alpha=0.05$, Tag 5: $F_{12,52}=14.49$, $p<0.0001$, Tag 30: $F_{12,52}=32.97$, $p<0.0001$; Eier: Daten transformiert $[\sqrt{x+1}]$, One-way ANOVA, Tukey Test $\alpha=0.05$, $F_{12,52}=21.06$, $p<0.0001$).

wurde zusätzlich die Fertilität der Eier erfasst: Im Vergleich zur Kontrolle reduzierten *P. fumosoroseus* 531 und 97, sowie *B. bassiana* 74040 die Fertilität signifikant (Kruskal-Wallis: $\chi^2=25.425$, $df=4$, $p<0.0001$; Man-Whitney-U-test, Bonferroni correction $\alpha=0.05$), während *M. anisopliae* 714 keinen Einfluss hatte. Tendenziell war die Reduktion der Fertilität bei den jüngeren Fliegen stärker ausgeprägt als bei den älteren Fliegen.

Die Wirkung der Pilze auf L_3 -Larven war gering. Alle Larven verpuppten sich normal, erst während der Puppenruhe zeigten sich Anzeichen von Pilzbefall. Zwar waren alle Pilzstämmen in der Lage Infektionen auszulösen, die Infektionsraten lagen jedoch nur bei 4.2 - 20.8%. Die Unterschiede zwischen den Pilzstämmen und der Kontrolle waren nicht signifikant (Daten transformiert [$\arcsine(\sqrt{x})$]; one-way-ANOVA: $F_{8,27}=1.73$, $p=0.2337$). Die Schlupfrate der adulten Fliegen wurde durch die Pilzbehandlung ebenfalls nicht verringert (Daten transformiert [$\arcsine(\sqrt{x})$]; one-way-ANOVA: $F_{8,27}=1.13$, $p=0.3739$). Signifikante Unterschiede wurden jedoch bezüglich der Mortalitätsrate der adulten Fliegen gefunden (Kruskal-Wallis-Chi-Squared-test: $\chi^2=27.42$, $df=8$, $p=0.001$), wobei die Mortalität in der Kontrollgruppe am höchsten war. Bei keiner der toten adulten Fliegen konnte Pilzbefall nachgewiesen werden.

Diskussion

Alle Pilzstämmen waren pathogen für L_3 -Larven und adulte Fliegen, wobei beträchtliche Unterschiede hinsichtlich der Virulenz bestanden. Larven wurden nur sehr selten befallen. Da bei den Larvenversuchen eine hohe Sporenkonzentration und eine sehr intensive Expositionsmethode gewählt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass L_3 -Larven unter Feldbedingungen nicht anfällig auf Pilze sind. Bei den adulten Fliegen konnte *Paecilomyces farinosus* 954 innerhalb von fünf Tagen nach der Behandlung nur 4-9% der Individuen abtöten, während die anderen Pilzstämmen in dieser Zeit Mortalitätsraten von 17-70% erreichten. Die mittlere Überlebensdauer der Fliegen nach einer Behandlung mit den Pilzstämmen *Paecilomyces fumosoroseus* 531, *P. fumosoroseus* 97, *Metarhizium anisopliae* 714 und 786, sowie *Beauveria bassiana* 74040 lag zwischen vier und sieben Tagen. Eine biologische Bekämpfung der Kirschfruchtfliege während der zehntägigen Präovipositionsperiode ist daher möglich. Bei der Anwendung von niedrigen Konzentrationen brachte *Beauveria bassiana* 74040 die besten Resultate. Pilzbehandelte Fliegen zeigten keine Verhaltensänderungen: Kopulation und Eiablage fanden bis zum Tod statt. Die reduzierte Eiablage ist hauptsächlich auf die verkürzte Lebensdauer der Weibchen zurückzuführen. Darüber hinaus war die Fertilität der Eier von pilzbehandelten Fliegen reduziert. Es wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Mortalität von Weibchen und Männchen gefunden. In einigen Versuchen hatten die Weibchen leicht höhere Mortalitätsraten, was wahrscheinlich auf die etwas höhere Konidienichte pro Individuum zurückzuführen ist. Eine Übertragung der Konidien von Fliege zu Fliege war nicht möglich. Da die Fliegen für die einzelnen Versuche an verschiedenen Standorten in der Nordwest-Schweiz gesammelt wurden, können die Resultate wahrscheinlich auf die gesamte Kirschfruchtfliegenpopulation in der Nordwest-Schweiz übertragen werden. Mit Wirkungsgraden von bis zu 99.6% können entomopathogene Pilze eine neue Strategie zur Bekämpfung der Kirschfruchtfliege darstellen, die jedoch noch im Freiland überprüft werden muss.

Danksagung: Für die finanzielle Unterstützung der Arbeit danken wir dem Landwirtschaftlichen Zentrum Ebenrain (LZE, Sissach, Schweiz). Weiterer Dank geht an Prof. Dr. D. TREUTTER (Technische Universität München) für die Betreuung der Doktorarbeit, Intrachem Bio Italia S.p.A. und Andermatt Biocontrol AG für die Bereitstellung der Produkte Naturalis-L und PreFeRal®WG.

Literatur

- ANAGNOU-VERONIKI, M., KONTODIMAS, D. C., ADAMOPOULOS, A. D., TSIMBOUKIS, N. D. & VOULGAROPOULOU, A. (2005): Effects of two fungal based biopesticides on *Bactrocera (Dacus) oleae* (GMELIN) (Diptera: Tephritidae). — IOBC wprs Bulletin **28**: 49-51.
- BOLLER, E. F. (1989): Rearing - *Rhagoletis* spp. — In: ROBINSON, A. S. & HOOPER, G.: Fruit flies their biology, natural enemies and control. Elsevier, Amsterdam, p. 119-127.
- DIMBI, S., MANIANIA, N. K., LUX, S. A., EKESI, S. & MUEKE, J. K. (2003): Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (METSCH.) Sorokin and *Beauveria bassiana* (BALSAMO) Vuillemin, to three adult fruit fly species: *Ceratitidis capitata* (WEIDEMANN), *C. rosa* var. fasciventris KARSCH and *C. cosyra* (WALKER) (Diptera: Tephritidae). — Mycopathologia **156**: 375-382.

- EKESI, S., MANIANA, N. K., MOHAMED, S. A. & LUX, S. A. (2005): Effect of soil application of different formulations of *Metarhizium anisopliae* on African tephritid fruit flies and their associated endoparasitoids. — *Biol. Control* **35**: 83-91.
- GEIPEL, K. (2001): Bekämpfung der Kirschfruchtfliege *Rhagoletis cerasi* L. — Bayerische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau: Internal Report. 32 pp.
- KONSTANTOPOULOU, M. A. & MAZOMENOS, B. E. (2005): Evaluation of *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii* strains and four wild-type fungal species against adults of *Bactrocera oleae* and *Ceratitis capitata*. — *Biocontrol* **50**: 293-305.
- STRASSER, H., FORER, A. & SCHINER, F. (1996): Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*. — Proceedings 3rd international Workshop Microbial control of soil dwelling pests.
- YEE, W. L. & LACEY, L. A. (2005): Mortality of different life stages of *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae) exposed to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. — *J. Entomol. Sci.* **40**: 167-177.

