

Etablierung von Methoden zur Analyse der Resistenz von Schaderregern des Gartenbaus gegen Pflanzenschutzmittel zur Entwicklung eines Resistenzmanagements (RESI-GAB)

Gefördert
durch



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



BTL
Bio-Test Labor GmbH Sagerheide

Etablierung von Methoden zur Analyse der Resistenz von Schaderregern des Gartenbaus gegen Pflanzenschutzmittel zur Entwicklung eines Resistenzmanagements (RESI-GAB)

BTL Bio-Test Labor GmbH Sagerheide, Dr. Thomas Thieme

JKI, Julius-Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen
Institut für Ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz,
Dr. Detlef Schenke

BWVI, Behörde f. Wirtschaft, Verkehr u. Innovation, Pflanzenschutzdienst, Hamburg,
Elisabeth Götte

BDNB, Betreuungsdienst Nützlichseinsatz Baden e.V., Herxheim, Peter Detzel, &

LULG, Sächsisches Landesamt f. Umwelt, Landwirtschaft u. Geologie Referat 74 |
Pflanzenschutz, Dresden, Dr. Gabriele Köhler

LALLF, Landesamt f. Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit u. Fischerei M-V, Abt.
Pflanzenschutzdienst, Rostock, Dr. Robert Schmidt

Gefördert
durch



aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages



BTL
Bio-Test Labor GmbH Sagerheide

Minderwirkung = Resistenz?

Frage:

Ist die in der Praxis beobachtete Minderwirkung von PSM gegen tier. Schaderreger auf Resistenz zurückzuführen?

(Beschränkung auf Gewächshaus-Schaderreger: *Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae*, *Aphis frangulae gossypii*, *Tetranychus urticae*)

Arbeitsschritte zur Beantwortung:

- Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioassays
- Erfassung der Sensitivität ausgewählter Schaderreger
- Stabilität der Resistenz getesteter Schaderreger
- Umsetzung der Erkenntnisse in der Pflanzenschutzberatung



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioessays

Im Gartenbau eingesetzte Produkte zur Bekämpfung von Schaderregern

(T Thripse; WF Weiße Fliege; B Blattläuse; S Spinnmilben; Appl. praxisübliche Applikationsmethode; * Wirkstoff dringt in das Gewebe ein, potentiell ist systemische Wirkung möglich; Quelle: E. Götte, Dr. R. Schmidt, Peter Detzel)

Produkte	Wirkstoff	Wirkstoffgruppe	IRAC-Nr	T	WF	B	S	Appl.
Kanemite SC	Acequinocyl	Acequinocyl	20 B				+	Spritzen/ Sprühen
Vertimec	Abamectin	Avermectin	6	+	+		+	Spritzen
Milbeknock	Milbemectin	Avermectin	6				+	Spritzen
Floramite 240 SC	Bifenazate	Bifenazate	?				+	Spritzen
Mesurol flüssig	Methiocarb	Carbamat	1 A	+				Spritzen
Pirimor Granulat	Pirimicarb	Carbamat	1 A			+		Spritzen
Apollo	Clofentezin	Clofentezin	10 A				+	Spritzen/ Sprühen
Teppeki	Flonicamid	Flonicamid*	9 C		+	+		Spritzen
Ordoval	Hexythiazox	Hexythiazox	10 A				+	Spritzen
Magister 200 SC	Fenazaquin	METI Akarizide	21 A				+	Spritzen
Kiron	Fenpyroximat	METI Akarizide	21 A				+	Spritzen/ Sprühen
Masai	Tebufenpyrad	METI Akarizide	21 A				+	Spritzen/ Sprühen
Mospilan SG	Acetamiprid	Neonicotinoid	4 A		+	+		Spritzen
Dantop	Clothianidin	Neonicotinoid	4 A			+		Spritzen
Confidor WG 70	Imidacloprid	Neonicotinoid	4 A		+	+		Spritzen/ Gießen
Calypso	Thiacloprid	Neonicotinoid	4 A			+		Spritzen
Perfekthion	Dimethoat	Organophosphat	1 B	+		+		Spritzen
Plenum 50 WG	Pymetrozin	Pymetrozin*	9 B		+	+		Spritzen
Fastac SC	α -Cypermethrin	Pyrethroid	3 A			+		Spritzen
Karate Zeon	I-Cyhalothrin	Pyrethroid	3 A	+	+	+		Spritzen
Conserve	Spinosad	Spinosyn	5	+	+			Spritzen
Envidor	Spirodiclofen	Tetronic- & Tetramic-Säurederivate	23				+	Spritzen



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioessays

zusätzliche Mittel auf Wunsch der Projektpartner

Produkte	Wirkstoff	Wirkstoffgruppe	IRAC-Nr	T	WF	B	S	Appl.
Match	Lufenuron		15	+				
Nocturn*	Pyriadalyl	UN		+				
Radiant	Spinetoram		5	+				
Applaud	Buprofezin		16		+			
Movento 150 OD*	Spirotetramat		23	+	+	+	+	



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioassays

1. Applikation auf Glasoberfläche



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioassays

2. Applikation auf Pflanzenmaterial (ganze Pflanze/Blattscheiben)

- Tauchtest mit Blattscheiben/ganzen Pflanzen (Kontakt-/Fraßwirkung)
- Potterturm-Applikation auf Blattscheiben (Kontakt-/Fraßwirkung)
- Gießwasser-Applikation (Fraßwirkung) -> sehr zeitintensiv



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioessays

3. Applikation auf Tiere

- direkte Spritzapplikation durch Potterturm (Kontaktwirkung)
- Eier (WFLI), verschiedene Larvenstadien aller Schaderreger
- adulte, ungeflügelte Blattläuse, Spinnmilben und geflügelte Thripse, Weiße Fliegen, Blattläuse
- Topikalapplikation auf Tiere mit Mikro-Applikator (Kontaktwirkung)



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioassays

Rückstandsanalyse

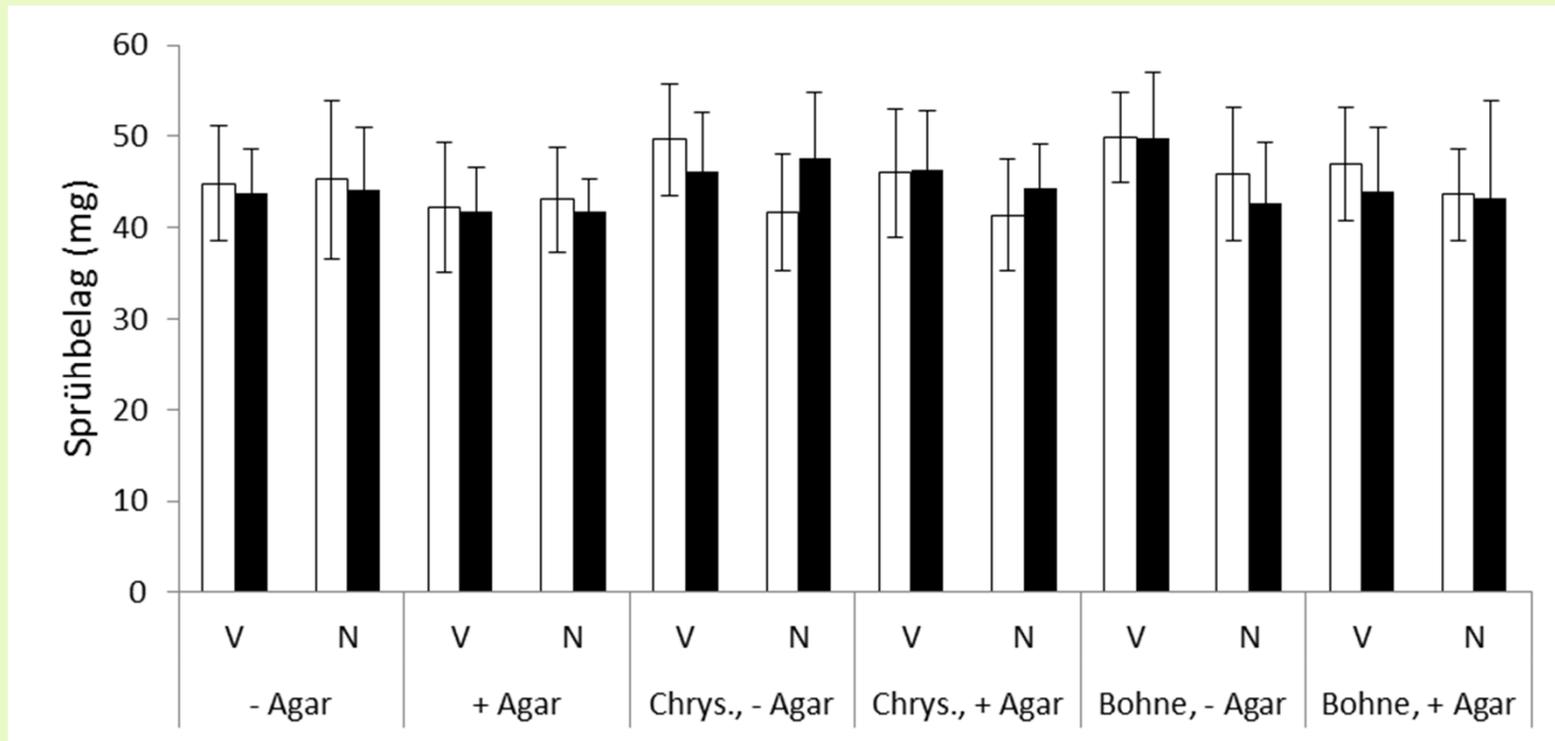
- ausgewählter Wirkstoffe bzw. Formulierungen unter verschiedenen Bedingungen (Applikationstechnik, -zeit, Lagerung und Temperatur)
- Analyse der Wirkstoffe für die Validierung der Bioassays und Vergleichbarkeit mit Praxisapplikationen (Wasseraufwand, systemischer Transport in der Pflanze)

Ziel: Bestimmung der Variabilität der Applikationen



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioessays

Applikationszeitpunkt (Rückstandsanalyse)

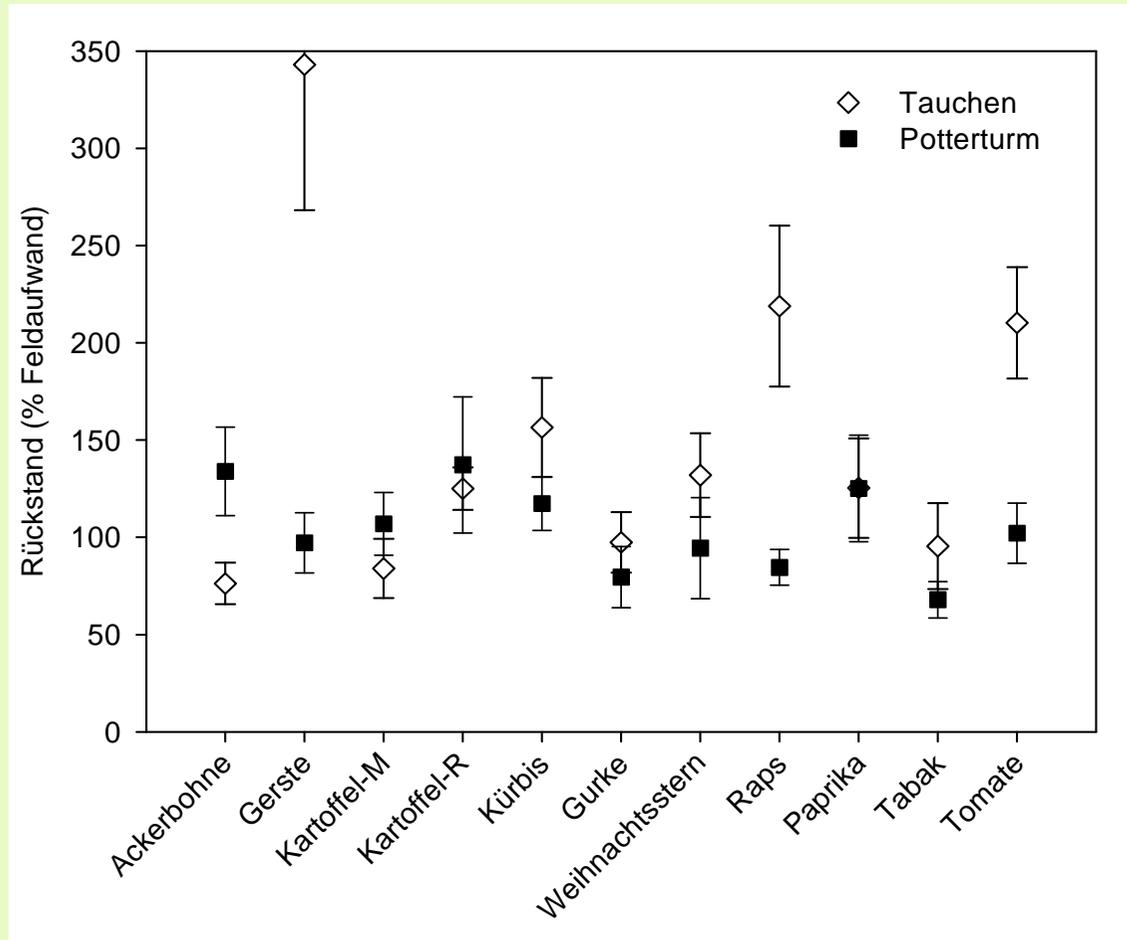


Einfluss der Applikationszeit auf den Sprühbelag (MW \pm SD) von Petrischalen im Potterturm (□ Petrischale links auf dem Applikationsteller, ■ Petrischale rechts auf dem Applikationsteller; V Applikation vormittags, N Applikation nachmittags, Chrys. Chrysantheme, alle nicht signifikant)



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioassays

I-Cyhalothrin - Variabilität in Laborversuchen (Rückstandsanalyse)



Anlagerung von I-Cyhalothrin an Blattscheiben nach Applikation von Karate Zeon durch Tauchen bzw. Besprühen im Potterturm

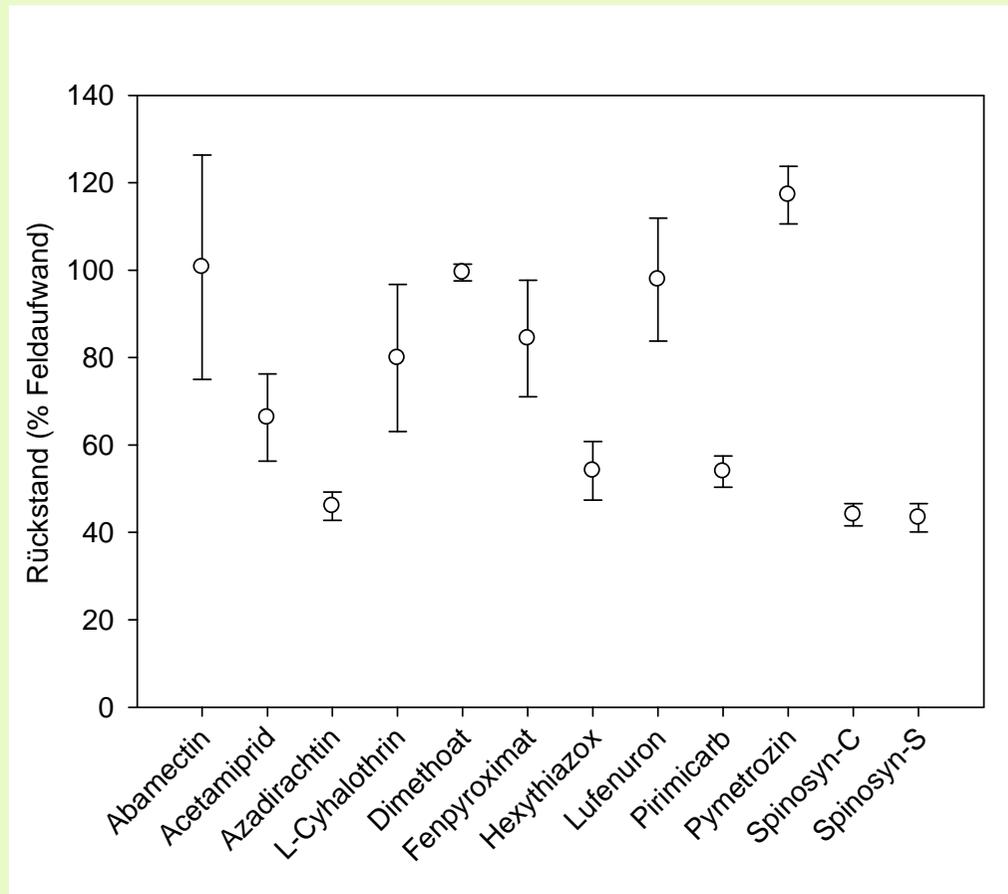


Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioessays

Variabilität bei Gläschentests in Laborversuchen (Rückstandsanalyse)



(Innenfläche: 31,4 cm²)

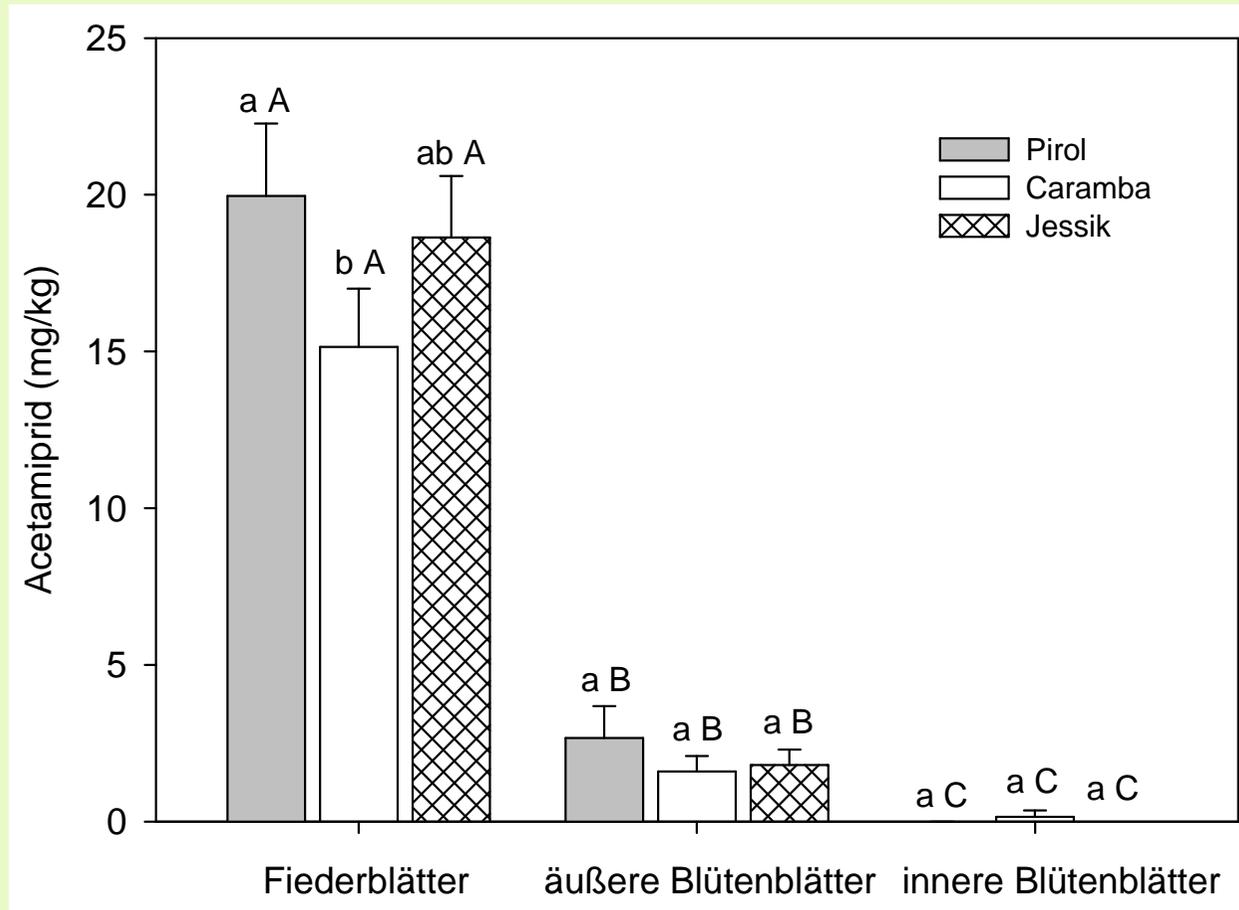


Anlagerungen von PSM nach Applikation (1 ml) in Gläschen



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioessays

Variabilität der Verteilung in der Pflanze in Praxisversuchen (Rückstandsanalyse)

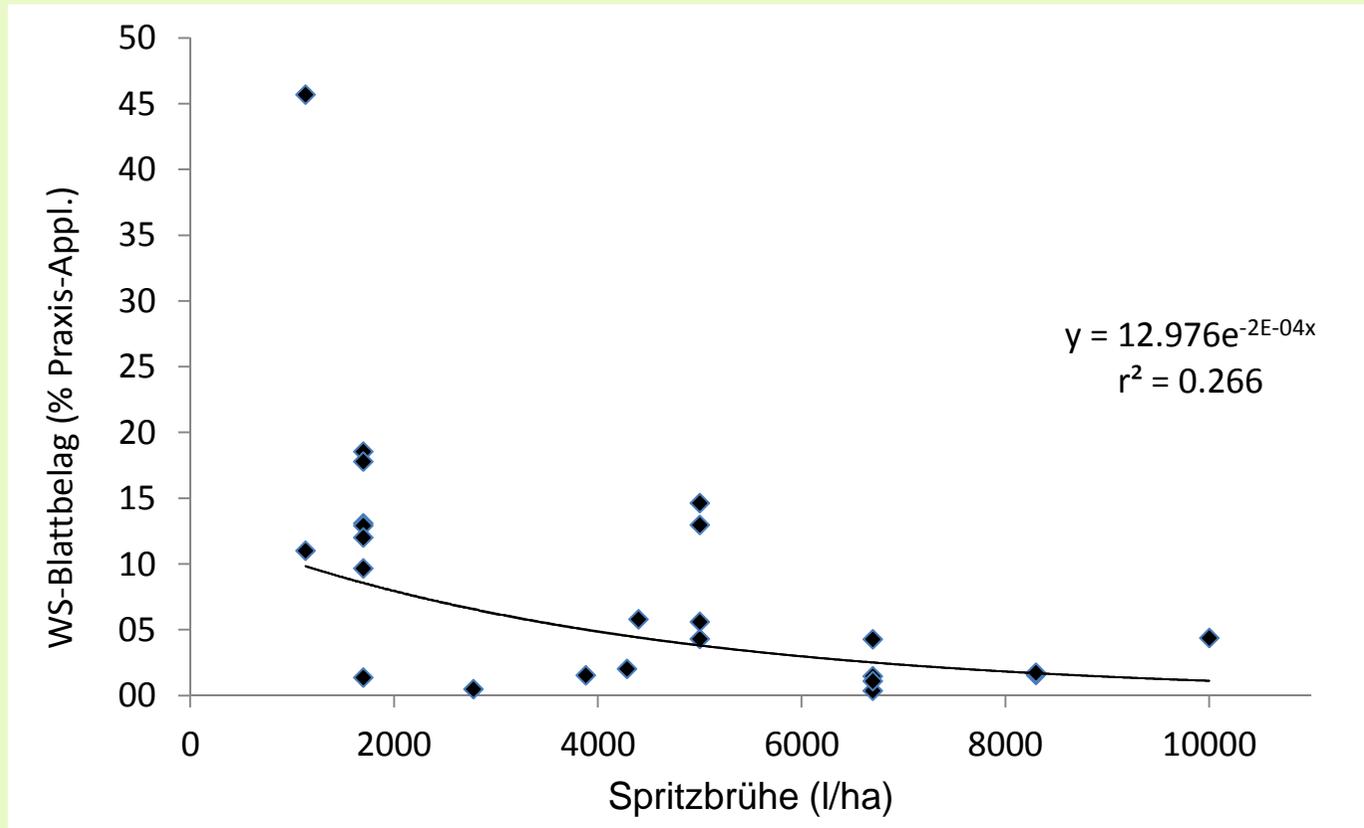


Verteilung von Acetamiprid in Rosen (Knospen eingetütet) nach Applikation mit Mospilan SG (450 g/ha; n=4)



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioessays

Variabilität bei Spritzbrühe-Mengen in Praxisversuchen (Rückstandsanalyse)



Anlagerung von Wirkstoffen an Rosenblättern durch Spritzapplikation der Praxis mit unterschiedlichem Wasseraufwand



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioessays

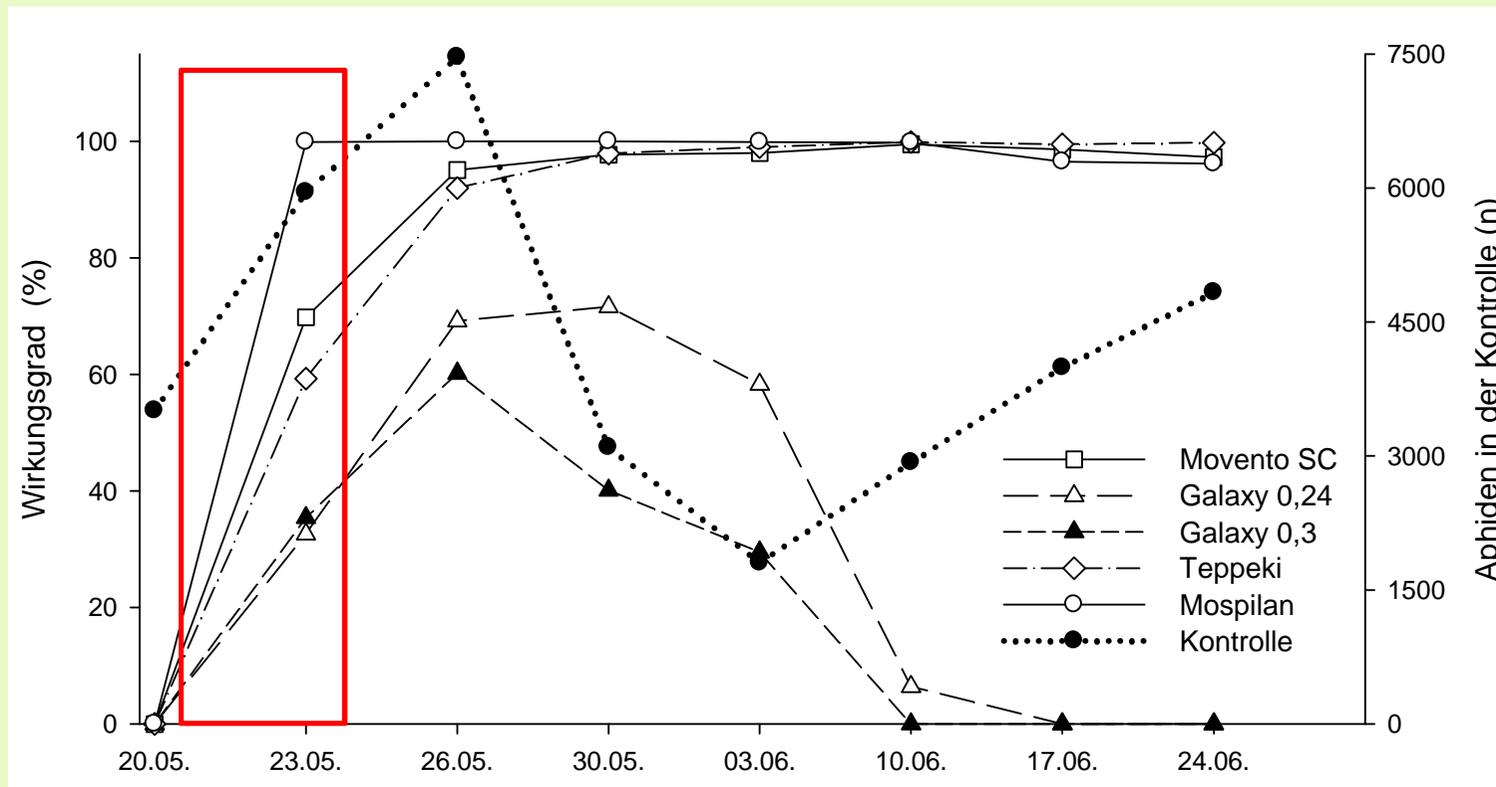
Auswahl der genutzten Testmethoden für die Identifizierung der Sensitivität

Testorganismus	Entwicklungsstadium	
Spinnmilbe	Juvenil/Ei	Adult
Methode	Potterturm	Gläschen
Testpflanze	Ackerbohne	ohne
Mittel zur Ersttestung	Kanemite, Masai, Ordoval, Apollo	
Blattlaus	Juvenil	Adult
Methode	Potterturm	Potterturm
Testpflanze	Kartoffel	Kartoffel
Mittel zur Ersttestung	Mospilan, Dantop, Confidor, Calypso	
Thrips	Juvenil	Adult
Methode	Potterturm	Potterturm
Testpflanze	Ackerbohne	Ackerbohne
Mittel zur Ersttestung	Mesurool, Perfektion, Conserve	
Weißer Fliege		Adult
Methode		Potterturm
Testpflanze		Tomate
Mittel zur Ersttestung	Mospilan, Karate Zeon, Conserve	



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioessays

Widerspiegelt ein Bioessay die Situation in der Praxis?



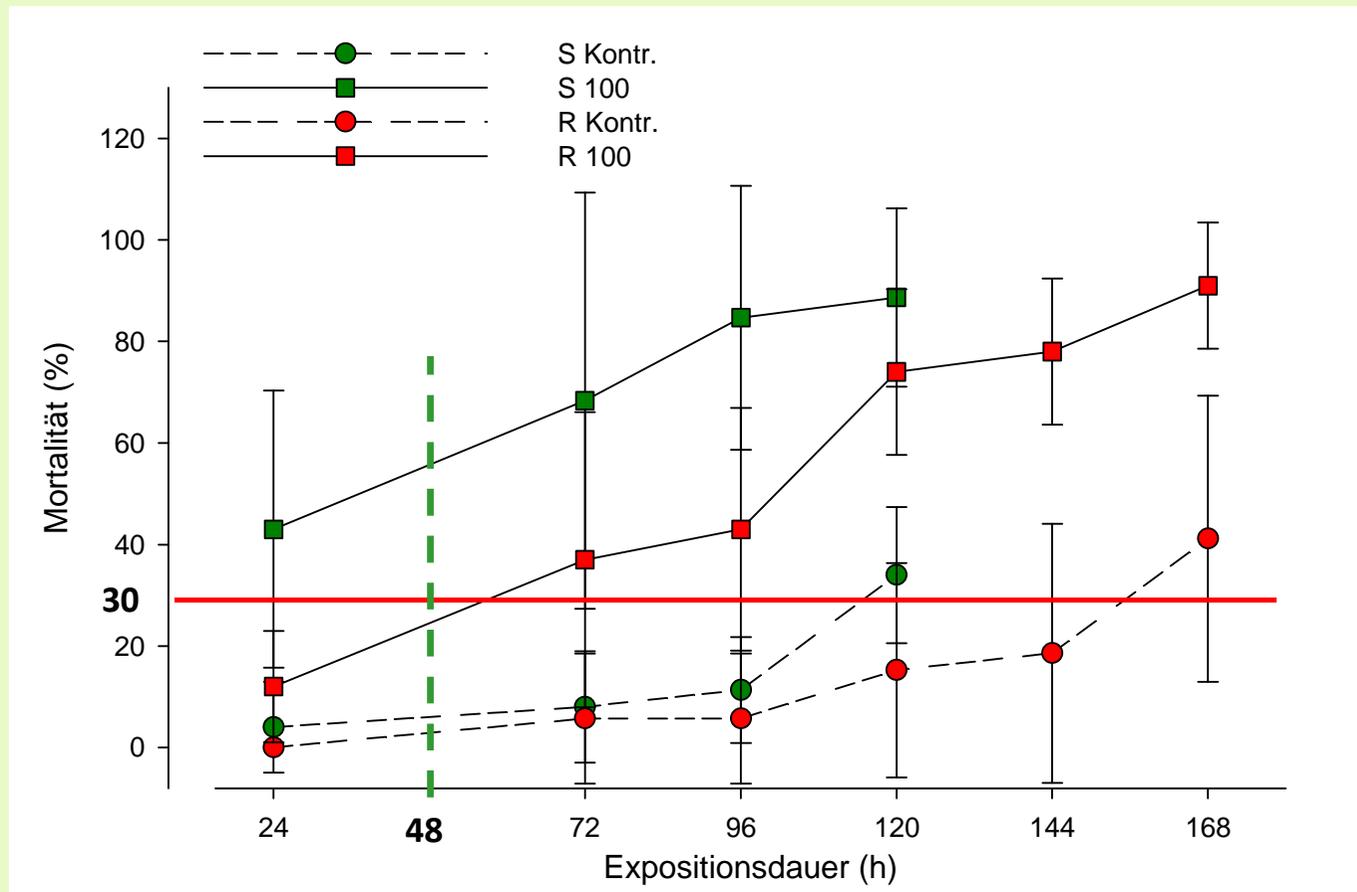
Wirkungsgrade (nach Henderson-Tilton, 1948) verschiedener Insektizide auf die Blattlaus *Aphis f. gossypii* auf Chrysantheme (n=40)

(Dr. R. Schmidt, LALLF-MV, kennzeichnet den zeitlichen Bereich der Bioessays)



Schaffung methodischer Sicherheit für die Bioessays

Anpassung der Bioessays an langsam wirkende PSM



Mortalität (MW \pm SD) von *Frankliniella occidentalis* mit Sensitivität (S) bzw. Resistenz (R) nach Exposition gegen Vertimec appliziert im Pottertower mit 100% FAW



Erfassung der Sensitivität ausgewählter Schaderreger

Schaderreger-Herkünfte (N) und Nachweise von Minderwirkung (n) der getesteten PSM bei Verwendung valider Testungen (Kontrollmortal. \leq 20%)

getestete Tiere		Anthranildiamide	Acequinocyl	Avermectin	Carbamate	Bifenazate	Flonicamid	Clofentezin	Hexythiazox	METI Akarizide	Azadirachtin	Neonicotinoid	Pyridalyl	Organophosphat	Pymetrozin	Pyrethroid	Spinosyne	Tetronsäure	Pyrethrine+R.öl	Kaliseife	Quassin
Blattläuse	n	1			0		3				0	0	1	6	2	6		3	1	1	
	N	1			14		5				2	41	2	16	5	23		4	1	1	
Spinnmilben	n		3	7		6		7	9	7			1					4			2
	N		17	24		8		12	12	21			3					11			2
Thripse	n	6		19	0						6		0	3		17	23				2
	N	7		27	49						9		1	43		22	43				8
Weiße Fliegen	n			3			3					4			5	8	3	4			0
	N			3			3					10			5	9	9	4			2



Erfassung der Sensitivität ausgewählter Schaderreger

Schaderreger-Herkünfte (H), durchgeführte Bioassays (T),
Nachweise von Minderwirkung (MW) bzw. multipler Minderwirkung (MM)
der getesteten PSM bei Verwendung valider Testungen (Kontrollmortal. $\leq 20\%$)

Schaderreger	H (n)	T (n)	MW (n)	MM (n)	MM (%)
Blattläuse	19	115	15	9	47
Spinnmilben	13	110	12	11	85
Thripse	37	209	33	22	59
Weißer Fliegen	10	45	10	8	80
Gesamt	79	479	70	50	63



Verschiedene Definitionen der Resistenz

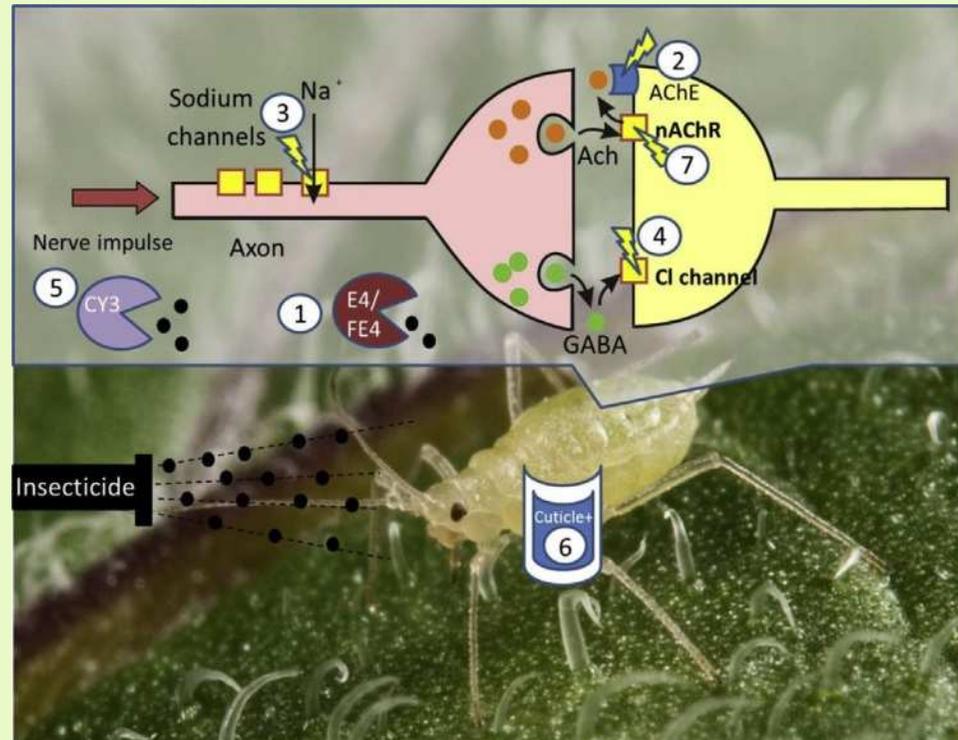
Bezug:

- reduzierter Bekämpfungserfolg bei ordnungsgemäßer Anwendung
(kann zu spät sein)
- Verschiebung der Sensitivität nach Registrierung
(Daten können fehlen)
- reduzierte Sensitivität im Vergleich zu Pop. ohne Behandlung
(sensitive Pop. können fehlen)
- ein Individuum überlebt Anwendung eines Wirkstoffs



Resistenzmechanismen (*Myzus persicae*)

1. Verstärkte Expression von E4/ FE4 Esterasen: OPs, Carb. & P. (Maskierung und Metabolisierung dieser Insektizide vor Erreichen des Nervensystems).
2. Mutation (S431F) des Enzyms Acetylcholinesterase (MACE): Carb.
3. Mutation (L1014F, M918T, M918L) des spannungsabhängigen Na-Kanals (kdr): P.
4. Mutation (A302G) des GABA abhängigen Chlorid-Kanals: Cyclodiene.
5. Verstärkte Expression des Cytochrom-Gens P450 : Nikotine & Neo's.
6. Reduzierte Penetration durch die Kutikula: Neo's.
7. Mutation (R81T) des Nikotin Acetylcholin-Rezeptors (nAChR): Neo's.
8. Verhaltensresistenz



modifiziert nach Bass *et al.* (2014)



Resistenzmechanismen

Aphiden (<i>Myzus persicae</i>)	Thripse
1. Verstärkte Expression von E4/ FE4 Esterasen: OPs, Carb. & P.	= Carb. & P. (wahrscheinlich)
2. Mutation (S431F) der Acetylcholinesterase (MACE): Carb.	= OP's (gesichert), Carb. (wahrscheinlich)
3. Mutation (L1014F, M918T, M918L) des spannungsabhängigen Na-Kanals (kdr): P.	L1014F, M918T, T929I*; M918L, V1010A** P. (möglich)
4. Mutation (A302G) des GABA abhängigen Chlorid-Kanals: Cyclodiene.	Verstärkte Expression von Glutathion S-Transferase: Carb. & P. (wahrscheinlich)
5. Verstärkte Expression des Cytochrom-Gens P450 : Nikotine & Neo's.	= OP's, Carb., P. (gesichert)
6. Reduzierte Penetration durch die Kutikula: Neo's.	= P. (gesichert)
7. Mutation (R81T) des Nikotin Acetylcholin-Rezeptors (nAChR): Neo's.	(G275E): Spinosad (gesichert)
8. Verhaltensresistenz	=

* *Thrips tabaci* (Toda & Morishita, 2009)

** *Thrips tabaci* (Wu et al., 2014)

modifiziert nach Bass *et al.* (2014)

modifiziert nach Bielza (2008) & Puinean et al. (2013)



Stabilität der Resistenz getesteter Schaderreger

Blattläuse (*M. persicae*), Thripse (*F. occidentalis*) und Spinnmilben (*T. urticae*) nach Haltung über 60 Tage (Blattläuse) bzw. 6 Monate (Thripse, Spinnmilben) ohne PSM-Einfluss

Schaderreger	Mortalität (MW ± SD) nach Exposition gegen 100 % FAW		
	1. Testung	2. Testung	
<i>M. persicae</i> 1 (sensitiv) ¹	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	ns
<i>M. persicae</i> 2	9,0 ± 12,5	10,0 ± 11,6	ns
<i>M. persicae</i> 3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	ns
<i>M. persicae</i> 4	37,0 ± 12,9	58,0 ± 9,1	*
<i>M. persicae</i> 5	45,8 ± 11,7	68,4 ± 8,6	*
<i>F. occidentalis</i> 1 (sensitiv) ²	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	ns
<i>F. occidentalis</i> 2	60,8 ± 33,8	59,7 ± 18,5	ns
<i>F. occidentalis</i> 3	76,3 ± 12,4	78,2 ± 16,3	ns
<i>F. occidentalis</i> 4	64,6 ± 21,6	65,3 ± 16,7	ns
<i>T. urticae</i> 1 (sensitiv) ³	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	ns
<i>T. urticae</i> 2	29,7 ± 17,6	31,4 ± 15,8	ns
<i>T. urticae</i> 3	33,9 ± 16,6	30,2 ± 19,4	ns

Bioessay: ¹ Adulte, 24 h Exposition gegen Karate Zeon, ² Adulte, 48 h Exposition gegen Perfekthion, ³ Juvenile, 7 d Exposition gegen Hexythiazox, ns nicht signifikant unterschiedlich, * p<0,5 (metabol. R.)



Stabilität der Resistenz getesteter Schaderreger

Anteile der Phänotypen mit unterschiedlicher E4-Esterase-Expression in den Stämmen von *M. persicae* 4 bzw. 5 nach Haltung über 58 bzw. 56 Tage ohne PSM-Einfluss

Stamm	Analyse nach Haltungsdauer	Tiere getestet (n)	Phänotyp			
			S	R ₁	R ₂	R ₃
<i>M. persicae</i> 4	0 d	20		3	14	3
	58 d	20	1	16	3	
<i>M. persicae</i> 5	0 d	10		6	4	
	56 d	20		20		



Zusammenfassung

- Durch Kombination von Bioessay und Rückstandanalyse wurden Methoden zur Identifizierung von Minderwirkungen/Resistenzen an wichtigen Gewächshaus-Schädlingen etabliert
- Auch für verzögert wirkende Aktivsubstanzen konnte der Bioessay methodisch angepasst werden
- Parallel laufende Wirksamkeitsversuche in Pflanzenschutzämtern zeigten gute Übereinstimmungen mit den Bioessays
- Mehr als der Hälfte der analysierten Schaderreger-Herkünfte zeigten bei mindestens zwei Wirkstoffgruppen Minderwirkung
- Resistenzen scheinen bei den analysierten Schaderregern stabil zu sein

Zukünftige Arbeiten:

- Analyse der Überlebende aus Bioessays auf Resistenzmechanismus/en
- Enge Zusammenarbeit mit Ämtern und Beratern



**Vielen Dank für die
Aufmerksamkeit**

