mikroPraep

Entwicklung eines breit wirksamen mikrobiologischen Präparates zur Bekämpfung pilzlicher Pflanzenkrankheiten

Y. Rondot[1], A. Linkies[2], S. Weißhaupt[3], C. Drenker[2], S. Kunz[3], A. Reineke[1]

[1]Hochschule Geisenheim University, Institut für Phytomedizin, Von-Lade-Str. 1, 65366 Geisenheim
[2]Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstr. 243, 64287 Darmstadt
[3]Bio-Protect GmbH, Lohnerhofstr. 7, 78467 Konstanz

PROJEKTZIEL

Im Rahmen des Verbundprojektes ‚mikroPraep' (Laufzeit 01.11. 2018 - 31.10. 2021) soll ein auf dem Bakterium *Lysobacter enzymogenes* basierendes, marktfähiges Produkt für den integrierten und biologischen Pflanzenschutz entwickelt werden. Das Präparat soll gegen Oomyceten und andere pilzliche Schaderreger an unterschiedlichen Kulturpflanzen eingesetzt werden. Durch die Entwicklung des mikrobiologischen Präparates soll dem Markt eine effektive und nachhaltige Pflanzenschutzstrategie angeboten werden, mit dem Potenzial, den synthetisch-chemischen Wirkstoffeinsatz in landwirtschaftlichen Kulturen zu reduzieren.

PROJEKTINHALTE

Ermittlung des **Wirkungsspektrums** von *L. enzymogenes* mittels Versuchen in Labor, Klimakammer, Gewächshaus sowie im Freiland

Biotechnologische Arbeiten: Entwicklung und Etablierung geeigneter Fermentations- u. Formulierungsverfahren sowie Optimierung der Prozesse

Identifikation relevanter Metabolite mittels **Genomsequenzierung** sowie Analyse der gebildeten Wirkstoffe durch **Fraktionierung** von Kulturfiltraten

Aufklärung der **Wirkmechanismen** durch Untersuchung der endophytischen Etablierung sowie einer möglichen induzierten Resistenz in der Pflanze

Abb. 1: Gesunde Weinrebentriebe durch biologischen Pflanzenschutz

Mikrobielle Pflanzenschutzverfahren

Die Applikation eines formulierten Präparates auf Basis von *L. enzymogenes* stellt eine effektive und nachhaltige Pflanzenschutzstrategie dar, mit dem Potenzial, den Einsatz von chemisch-synthetischen Pflanzenschutzmittel-Wirkstoffen im Pflanzenbau zu reduzieren.

Im Rahmen einer nachhaltigen Produktion landwirtschaftlicher und gartenbaulicher Produkte und zur Eingrenzung der gesundheitlichen Risiken für Mensch, Tier und Umwelt nehmen alternative Methoden für die Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten eine wichtige Stellung ein. Dabei kommen neben Naturstoffen auch mikrobielle Antagonisten zum Einsatz und gewinnen zunehmend an Bedeutung. Durch die Entwicklung eines neuen mikrobiologischen Pflanzenschutzproduktes im Rahmen des Projektes ‚mikroPraep' werden Erkenntnisse aus der Forschung mit Bezug zur unternehmerischen Praxis bei der Herstellung umweltfreundlicher Pflanzenschutzmittel innovativ umgesetzt. Die Entwicklung und Förderung solcher Pflanzenschutzverfahren ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Pflanzenschutz-Rahmenrichtlinie und des Nationalen Aktionsplans zur Minderung der Risiken im Pflanzenschutz und steht im Einklang mit der Forderung nach einem verbesserten Umwelt- und Verbraucherschutz.

Tabelle 1: Hemmung des Wachstums pilzlicher Pathogene bei Dualkultur auf Agarplatten mit zwei *L. enzymogenes* Isolaten (n = 3). Angegeben sind die Durchmesser der Hemmhöfe in mm ± SD.

Pathogene	Hemmhöfe d ± SD [mm]	
	JKI-BI-6432 `creme´	JKI-BI-6432 `gelb´
Ascochyta fabae	43 ± 1	11 ± 0
Alternaria solani	31 ± 7	13 ± 2
Botrytis cinerea	42 ± 1	17 ± 5
Drechslera sorokiniana	16 ± 1	11 ± 1
Fusarium culmorum	32 ± 2	10 ± 0
Phoma lingam	40 ± 3	20 ± 4
Rhizoctonia solani	37 ± 2	15 ± 0
Phytophthora infestans	47 ± 5	36 ± 3
Pythium ultimum	12 ± 1	10 ± 1

Grundsätzlich zeigen beide Isolate eine Hemmung gegen das gleiche Spektrum an Pathogenen, allerdings war die Effektivität von JKI-BI-6432 `creme´ in allen Fällen deutlich höher als von JKI-BI-6432 `gelb´. Mittels *in vivo* - Versuchen in Klimakammer und Gewächshaus konnte die Wirksamkeit formulierter Testpräparate (JKI-BI-6432 `creme´) bestätigt werden. Es zeigte sich eine hohe Wirksamkeit gegen:

- Falschen Mehltau (*Pseudoperonospora cubensis*) an Gurke
- Krautfäule (*Phytophtora infestans*) an Kartoffel
- Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) an Reben.

Abb. 2: *L. enzymogenes* JKI-BI-6432 `creme´ auf Agar

WIRKSAMKEITSVERSUCHE

Die Wirksamkeit von *L. enzymogenes* (Isolate JKI-BI-6432 `creme´ und JKI-BI-6432 `gelb´) wurde *in vitro* durch Dualkulturen der Pathogene und in Bakteriensuspension getränkte Filterscheiben gegen pflanzenpathogener Pilze und Oomyceten getestet. Beide Isolate verfügen über ein breites antagonistisches Potential und hemmen verschiedene Erreger (Tabelle 1) im Wachstum. Eine unterdrückende Wirkung auf Sporenkeimung von *Venturia inaequalis, Phytophthora infestans* und *Uromyces appendiculatus* sowie Sporenschlupf von *Pseudoperonospora cubensis* konnte ebenfalls *in vitro* gezeigt werden.

BIOTECHNOLOGISCHE ARBEITEN

Für den Stamm JKI-BI-6432 `creme´ (Abb. 2) wurden nach einer Medienoptimierung ein Produktionsverfahren und erste Formulierungen entwickelt, die eine Produktion von wirksamen Testpräparaten ermöglichen. Weitere Optimierungen des Produktionsverfahrens sind nach der chemischen Identifikation der gebildeten Wirkstoffe geplant. Die formulierten Testpräparate werden zurzeit sowohl hinsichtlich technischer Eigenschaften wie Lagerbarkeit, Stabilität und Applizierbarkeit als auch in Bezug auf ihre biologische Aktivität charakterisiert.

WIRKSTOFFANALYSE

Im Verlaufe des Projekts soll geklärt werden, ob Zellen, Stoffwechselprodukte oder eine Kombination aus beiden für die Wirksamkeit gegen Pflanzenpathogene erforderlich sind. Derzeit deutet einiges darauf hin, dass die Aktivität auf Metaboliten beruht, die an die Zellwände des Antagonisten gebunden sind. Folgende Arbeitsschritte zur Analyse gebildeter Wirkstoffe sind in Zusammenarbeit mit dem Partner TU Berlin geplant:

- Fraktionierung von Kulturfiltraten mittels Extraktion und Flash Chromatographie
- Untersuchung der Fraktionen auf bekannte Metaboliten
- Genomsequenzierung des ausgewählten Stammes und Genome-Mining auf Sekundärmetabolit-Biosynthesegencluster
- Zuordnung von Metaboliten zu Genclustern.

WIRKMECHANISMEN

Es wird untersucht, ob sich *L. enzymogenes* endophytisch in der Pflanze ausbreitet und so ggf. Resistenzmechanismen der Pflanze aktiviert. Zum Nachweis einer möglichen Resistenzinduktion durch *L. enzymogenes* in Pflanzen werden Marker-Gene verwendet, deren Expression innerhalb der Pflanze während der tritrophen Interaktion zwischen Pflanze, Bakterium und Schaderreger mit Hilfe von quantitativer real-time PCR (qPCR) untersucht werden. Dieses Wissen ist nötig, um die Dauer und Bandbreite der Wirkung aller Anwendungsformen besser zu verstehen und so eine gezielte Terminierung der Anwendung zu erreichen.

UNTERAUFTRAGNEHMER:

Technische Universität Berlin

Die Förderung des Vorhabens erfolgt aus Mitteln der Landwirtschaftlichen Rentenbank, **Förderkennzeichen: 28RF4048**

rentenbank
Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
ptble Projektträger Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung

KONTAKT:
Dr. Yvonne Rondot
Hochschule Geisenheim University
Von-Lade-Str. 1 | D-65366 Geisenheim
T. +49 6722 502 414 | F. +49 6722 502 410
Yvonne.rondot@hs-gm.de