

Molekularbiologische Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkung phosphonathaltiger Elicitoren im Pathosystem *Vitis vinifera*/Plasmopara viticola

Beate Berkelmann-Löhnertz¹, Moustafa Selim², Gregor Langen³, Karl-Heinz Kogel³ & Danièle Evers²

¹ Forschungsanstalt Geisenheim, Fachgebiet Phytomedizin, Geisenheim (Germany)

² Centre de Recherche Public – Gabriel Lippmann, Department EVA, Belvaux (Luxembourg)

³ Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie, Gießen (Germany)

berkelmann@fa-gm.de

Einleitung

Im ökologischen Weinbau basiert die Bekämpfung von *Plasmopara viticola*, dem Erreger des Falschen Mehltaus der Rebe, auf kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln. Zurzeit wird Kupfer mit verschiedenen Mischungspartnern regelmäßig im Abstand von etwa zehn Tagen appliziert. Hier gilt: Kupfer ist eines der ältesten Fungizide und wird traditionell im Ökologischen Landbau eingesetzt. In Deutschland liegt der Grenzwert der maximal zulässigen Reinkupfermenge derzeit bei 3 kg pro Hektar und Jahr. Aufgrund der vieldiskutierten Problematik „Ökotoxikologie von Kupfer“ sind dringend Kupferreduzierungsstrategien und Kupfer-Alternativen gefordert (Schwarzbach 2008; Berkelmann-Löhnertz et al. 2008).

Neben Gesteinsmehlen sind hier vor allem phosphonathaltige Agenzien zu nennen. Bisher wurden diese Substanzen von den Zulassungsbehörden als so genannte Pflanzenstärkungsmittel gelistet und als solche in der (ökologischen) Praxis eingesetzt.

Ähnlich wie kupferhaltige Pflanzenschutzmittel standen und stehen auch phosphonathaltige Pflanzenstärkungsmittel immer wieder im Fokus der Debatten: so gab es zum einen Diskussionen über mögliche „direkte“ Wirkungen von Phosphonaten auf die Pathogene. Dies hätte unter Umständen den Wegfall dieser Substanzen aus der Liste der Pflanzenstärkungsmittel zur Folge gehabt. Zum anderen wird sich mit Inkrafttreten des neuen Pflanzenschutzgesetzes der Status phosphonathaltiger Agenzien ändern. Die neue Sachlage ist insofern komplex, da bei den verschiedenen ökologischen Anbauverbänden im Falle einer Zulassung der Phosphonate als Pflanzenschutzmittel-Wirkstoff unterschiedliche Standpunkte hinsichtlich des Einsatzes in der ökologischen Anbaupraxis vorliegen. Leidtragende sind auf jeden Fall die Winzer; denn ein solcher Bekämpfungsengpass kann in starken „Peronospora“-Jahren Existenz bedrohende Ausmaße annehmen.

Um auf wissenschaftlicher Ebene zur Aufklärung der Zusammenhänge beizutragen, erfolgen derzeit im Rahmen eines Promotionsvorhabens molekularbiologische Untersuchungen, die sich mit der Wirkung ausgewählter Pflanzenstärkungsmittel im Pathosystem Rebe/*P. viticola* befassen. Von einigen dieser Substanzen ist bekannt, dass sie wirtseigene Resistenzphänomene gegenüber Pathogenen induzieren können (z. B. KESSMANN et al. 1994; VALLAD & GOODMAN 2004). Diese werden als Elicitoren bezeichnet. Im Zentrum stehen Gewächshausversuche an Topfreben der Sorten Riesling und Müller-Thurgau. Für das Fachgespräch wurde ein Teil der bisher erzielten Ergebnisse ausgewählt und vorgestellt.

Material und Methoden

Topfreben der Sorte Riesling wurden im 6- bis 8-Blatt-Stadium im protektiven (einen Tag vor der Inokulation mit *P. viticola*) und im kurativen Verfahren (einen Tag nach der Inokulation mit *P. viticola*) mit verschiedenen Pflanzenstärkungsmitteln und deren Solosubstanzen behandelt (im Folgenden Prüfsubstanzen genannt). Behandlung, Inokulation und Bonitur erfolgten gemäß Standardprotokoll des Fachgebietes Phytomedizin der Forschungsanstalt Geisenheim.

Dieses Standard-Protokoll lehnt sich an die EPPO-Richtlinien PP 1/261 (1) sowie PP 1/17 (2) an. Ein Versuchsglied umfasste drei Topfreben.
Folgende Prüfglieder wurden in den Versuch integriert:

Tabelle 1: Übersicht der untersuchten Prüfglieder

| Code | Prüfglied | Erläuterungen |
|---------------------|-------------------------------|--|
| K _{Null} | unbehandelt | keinerlei Behandlung |
| K _{Wasser} | Lösungsmittel-Kontrolle | Wasser ohne Prüfmittel und ohne <i>P. viticola</i> |
| 1 | inokulierte Kontrolle | nur mit <i>P. viticola</i> inokuliert |
| 2 | Frutogard® | Pflanzenstärkungsmittel mit Phosphonat |
| 3 | Phosphonat + Phosphat | Bestandteile von Frutogard® |
| 4 | ALGINURE pilzfrei® | Pflanzenstärkungsmittel ohne Phosphonat |
| 5 | Phosphat solo | Bestandteil von ALGINURE pilzfrei® + Frutogard® |
| 6 | β-1,3-Glucan | Bestandteil von ALGINURE pilzfrei® + Frutogard® |
| 7 | Myco-Sin VIN® | Gesteinsmehl |
| 8 | Strobilurin (ohne Zusatz-PSM) | Cabrio® ohne „Top“, d. h. ohne Metiram |

Die Entnahme der Blattproben für die molekularbiologischen Untersuchungen orientierte sich an den Zeitpunkten der Applikation der Prüfsubstanzen sowie der Inokulation des Pilzes (d. h. Tage nach Applikation = dat (days after treatment); Tage nach Inokulation = dai (days after inoculation) und erfolgte stets zur gleichen Tageszeit. Die Proben wurden in flüssigen Stickstoff überführt und für die molekularbiologischen Untersuchungen vorbereitet. Methodische Basis für die nachfolgende Aufarbeitung und die real-time RT-PCR waren die Arbeiten von Aziz et al. (2003) und Trouvelot et al. (2008). Genexpressionsanalysen wurden für folgende Enzyme, die im Rahmen der pflanzeigenen Pathogenabwehr eine Rolle spielen, durchgeführt: Lipoxygenase, Chitinase sowie Stilben-Synthase. Die Auswertung der Genexpressionsanalysen erfolgte mittels hierarchischer Clusteranalyse.

Um die biologische Wirksamkeit der Prüfsubstanzen gegenüber *P. viticola* zu erfassen, wurden die behandelten Pflanzen am Ende der Inkubationszeit in eine feuchte Kammer überführt, um die Sporulation auf der Blattunterseite zu induzieren. Die Befallsstärke wurde auf der Basis eines 9er-Schemas an den mittleren fünf Blättern der Topfreben bonitiert.

Ergebnisse und Diskussion

Biologische Wirksamkeit unter Gewächshausbedingungen

Im Versuchsglied „Kontrolle inokuliert“ (1) lag die Befallsstärke im Falle einer protektiven Anwendung bei 25 %. Beim Einsatz von Frutogard® (2), dessen phosphonat- und phosphathaltigen Bestandteilen (3) sowie von ALGINURE pilzfrei® (4) zeigte sich eine mittelstarke biologische Wirksamkeit gegenüber *P. viticola*. Eine vergleichbare Wirkung konnte mit Myco-Sin VIN® (7) erzielt werden. Erwartungsgemäß war die Wirksamkeit des Strobilurins (8) im protektiven Ansatz sehr gut, während bei kurativer Applikation keine Wirkung zu erkennen war. Am besten hat in beiden Ansätzen die Prüfsubstanz „Phosphat solo“ (5) abgeschnitten (jeweils < 1 % Befallsstärke). Untersuchungen im Weinberg haben allerdings gezeigt, dass sich diese Ergebnisse nicht reproduzieren lassen. Vermutlich wird die Wirkung der Phosphate aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit durch die im Freiland einwirkenden Faktoren Tau und Niederschlag negativ beeinflusst. Im Falle der Prüfsubstanz β-1,3-Glucan (6) war keine biolo-

gische Wirksamkeit gegenüber *P. viticola* zu erkennen: der Befallswert war mit dem des Versuchsglieds Kontrolle gleichauf.

Demgegenüber präsentierte sich ein anderes Befallsbild im Falle des kurativen Einsatzes. Erwähnenswert ist der starke Pilzbefall (75 %) im Versuchsglied „Kontrolle“ (1). Da dieser Teilversuch später im Jahr (Mai/Juni) stattfand, wurden im Vergleich zum protektiven Ansatz deutlich höhere Befallswerte erzielt. Das entspricht den Erfahrungen der letzten Jahre bzgl. der Durchführung von Inokulationen an Topfreben im Gewächshaus.

Ergebnisse aus der Praxis bestätigend zeigte Frutogard® (2) unter diesen Versuchsbedingungen ein sehr hohes Eindämmungspotential gegenüber *P. viticola*. Im vorliegenden Versuch waren beim kurativen Einsatz ca. 15 % der bereits begonnenen Inkubationszeit abgelaufen. Von allen anderen Prüfsubstanzen gingen deutlich geringere Kurativ-Wirkungen aus – das Prüfmittel „Phosphat solo“ (5) ausgenommen, was unter Gewächshausbedingungen auch im Kurativ-Versuch überzeugte.

Genexpression im protektiven und kurativen Ansatz

Da die Darstellung aller Genexpressionsanalysen den Rahmen sprengen würde, wurde beispielhaft das Enzym Lipoxygenase, welches bei der Biosynthese der so genannten Oxylipine eine Rolle spielt, ausgewählt. In der folgenden Abbildung (Abb. 1) sind Zeitpunkte und Prüfglieder mit hohen Genexpressionswerten durch ein intensiv rot gefärbtes Quadrat gekennzeichnet. Entsprechend geringer präsentierte sich diese Rate im Falle dunkelroter Ergebnis-Quadrate. Ein schwarzes Ergebnis-Feld wiederum zeigt an, dass hier kein erhöhtes Genexpressionssignal vorlag. Anhand dieser Farbcodierung können Zeitpunkte und Elicitoren bestimmt werden, die ein hohes Eindämmungspotential gegenüber *P. viticola* erwarten lassen. Dargestellt sind die Ergebnisse des protektiven (Abb. 1 links) sowie des kurativen (Abb. 1 rechts) Einsatzes der Prüfsubstanzen.

Anhand dieser vielfältigen und exakten Genexpressionsdaten ist es im Pathosystem Rebe/*P. viticola* erstmals möglich, für verschiedene Substanzen, die als Elicitoren wirken können, optimale Applikationszeitpunkte zu benennen. Dieser Zusammenhang war bisher für holzige Pflanzen nur ansatzweise untersucht (PERCIVAL 2001).

Um den Einsatz Resistenz induzierender Substanzen exakt an die Entwicklungszyklen der polyzyklischen „Alge“ *P. viticola* anzupassen, bietet sich der Einsatz mathematischer Modelle zur Vorhersage der Krankheit an. Ein solches Modell liegt vor: Das neue Geisenheimer Peronospora-Prognosemodell wurde in den letzten beiden Vegetationsperioden erfolgreich validiert (BERKELMANN-LÖHNERTZ et al. 2010). Auf der Basis dieses Krankheitsmodells lassen sich Infektionszeitpunkte für boden- und blattbürtige Infektionen sowie die individuelle Länge der Inkubationszeiten vorhersagen. Diese Voraussetzungen erlauben eine Verknüpfung von Resistenzinduktion und Krankheitsprognose mit dem Ziel der Optimierung des Rebschutzes im ökologischen Weinbau.

Nur wenn die Zeitpunkte für eine optimale Terminierung der Applikationen bekannt sind und wenn die Wirtspflanze ausreichend Zeit hatte, die pflanzeneigene Abwehr zu aktivieren, ist der Bekämpfungserfolg auch mit deutlich reduzierten Kupfermengen sicher. Auf dieser Basis ist also eine weitere Minimierung des Einsatzes kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel möglich.

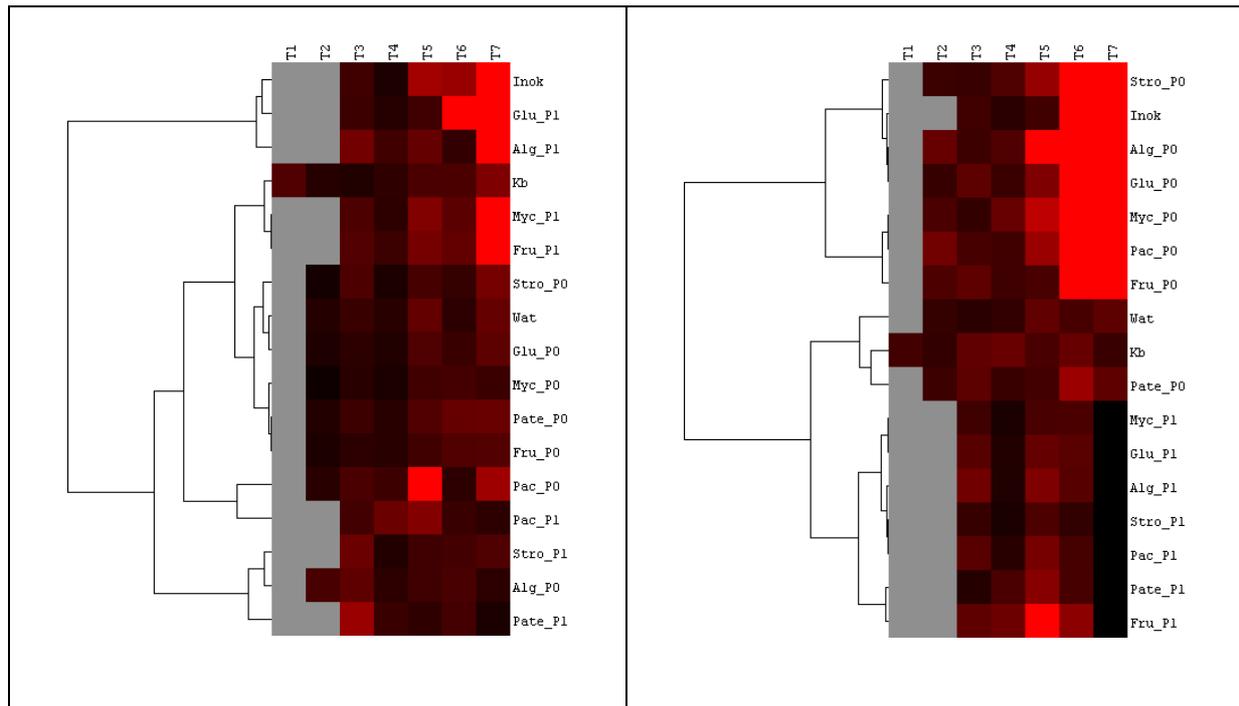
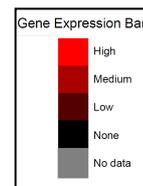


Abb. 1: Genexpressionsanalyse für das Enzym Lipoxygenase durch hierarchische Clusteranalyse; links: protektiv; rechts: kurativ; Jahr: 2009; oberer Rand: Probenahme-Termine bezogen auf den Zeitpunkt der Applikation bzw. Inokulation; rechter Rand: Prüfglieder (PO = Elicitor ohne *P. viticola*; P1 = Elicitor mit *P. viticola*); grau = keine Ergebnisse; schwarz = keine erhöhte Genexpression; dunkelrot = Genexpression gering; mittelrot = Genexpression mittelstark; rot = Genexpression hoch (vgl. Legende rechts)



Der Einsatz Resistenz induzierender Substanzen im Rebschutz ist natürlich auch für integriert wirtschaftende Winzer interessant. Wenn möglicherweise durch die Aktivierung der pflanzeneigenen Abwehr Applikationen anderer Pflanzenschutzmittel eingeschränkt werden können, ist das ein weiterer überzeugender Beitrag zur Umsetzung des „Reduktionsprogramms chemischer Pflanzenschutz“ in der Weinbaulichen Praxis.

Um allerdings den Bedürfnissen der ökweinbaulichen Praxis gerecht zu werden und Existenz bedrohende Bekämpfungsempässe (von echten „Lücken“ sollte nicht gesprochen werden) zu vermeiden, sollte ein Antrag zur Aufnahme der Phosphonate in die EU-Öko-Verordnung mit Nachdruck verfolgt werden.

Literatur

Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bézier A, Lambert B, Joubert J-M, Pugin A (2003): Laminarin Elicits Defense Responses in Grapevine and Induces Protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. MPMI 16 (12), 1118-1128.

Berkelmann-Löhnertz B, Heibertshausen D, Baus-Reichel O, Hofmann U, Kauer R (2008): Ohne Kupfer geht es nicht – Status quo im ökologischen Weinbau nach vier Jahren BÖL-Verbundprojekt. Fachgespräch „Bedeutung von Kupfer für den Pflanzenschutz,

insbesondere für den Ökologischen Landbau – Reduktions- und Ersatzstrategien“. Berichte aus dem Julius Kühn-Institut 142, 17-20.

Berkelmann-Löhnertz B, Baus O, Hassemer-Schwarz H, Frühauf C (2010): Elaboration and validation of a downy mildew forecast model regarding soilborne infections. Conference PATHOLUX 2010: Impact of plant pathogens on food quality of agricultural crops and wine; Remich (Luxembourg), 23.11.2010. Book of Abstracts, 43-44.

Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Uknes S, Ryals J (1994): Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Ann. Rev. Phytopathol., 32, 439-459.

Percival GC (2001): Induction of systemic acquired disease resistance in plants: Potential implications for disease management in urban forestry. J. of Arboriculture 27 (4), 181-192.

Schwarzbach W (2008): Kupfer als Pflanzenschutzmittel-Wirkstoff: Bewertung der Auswirkungen auf den Naturhaushalt. Fachgespräch „Bedeutung von Kupfer für den Pflanzenschutz, insbesondere für den Ökologischen Landbau – Reduktions- und Ersatzstrategien“. Berichte aus dem Julius Kühn-Institut 142, 10-14.

Trouvelot S, Varnier A-L, Allègre M, Mercier L, Baillieul F, Arnould C, Gianinazzi-Pearson V, Klarzynski O, Joubert J-M, Pugin A, Daire X. (2008): A β -1,3 Glucan Sulfate Induces Resistance in Grapevine against *Plasmopara viticola* through Priming of Defense Responses, Including HR-like Cell Death. MPMI 21 (2), 232-243.

Vallad GE & Goodman RM (2004): Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. Crop Science 44, 1920-1934.

Danksagung

Wir bedanken uns beim „Fonds National de la Recherche Luxembourg“ für die finanzielle Unterstützung des Vorhabens. Bei Helga Findeis, Max Sandmann und Winfried Schönbach sagen wir herzlichen Dank für die exzellente technische Assistenz sowie für die methodische Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Gewächshausversuche. Ebenso danken wir für die perfekte fotografische Dokumentation in allen Teilbereichen der Untersuchungen. Bei Sylvain Legay möchten wir uns für die Mitwirkung bei den Laborarbeiten in Luxemburg bedanken.