

Schlussbericht zu Nr. 9.1 NKFT 88

Zuwendungsempfänger:
EpiLogic® GmbH Agrarbiol. Forschung und Beratung

Förderkennzeichen:
0311699

Vorhabensbezeichnung:
Modellregion München - Erarbeitung von methodischen Grundlagen zur Analyse und Handhabung von Krankheitserregern an Pflanzen und für den Aufbau eines BioService

Aktivitätsschwerpunkt:
Genombasierte Produktentwicklung

Laufzeit des Vorhabens:
01.11.1997 bis 31.03.2002

Berichtszeitraum:
01.11.1997 bis 31.03.2002

Projektleitung:
Friedrich G. Felsenstein

1. Aufgabenstellung

Das ökonomische Schadenspotential, das insbesondere pilzliche Krankheitserreger in der landwirtschaftlichen und gartenbaulichen Pflanzenproduktion mit Ertrags- und Qualitätseinbußen verursachen können, wird allein für Europa auf mehrere Milliarden € geschätzt. Ohne einen aktiven und erfolgreichen biologischen und/oder chemischen Pflanzenschutz wäre heute die Sicherung der Ernährung weder in Europa noch global denkbar. Extrem erschwert und essentiell gefährdet werden diese Bemühungen jedoch durch das zumeist hohe Anpassungspotential der Pathogene, so dass sich hieraus ein ständiger Wettlauf zwischen der Entwicklung neuer chemischer Präparate sowie krankheitsunempfindlicher Sorten und der Anpassungsdynamik der Krankheitserreger ergibt. Dabei gilt zu berücksichtigen, dass die Entwicklung neuer wirksamer Präparate oder Sorten auch heute noch etwa 10 bis 15 Jahre beansprucht und dabei teilweise extrem hohe Vorlaufkosten verursacht. Ohne eine korrekte Beurteilung des Resistenzrisikos und/oder der jeweils aktuellen Anpassungssituation sowie der potentiellen Anpassungsdynamik ist dieser Wettlauf mit dem genetischen Potential der Pathogene kaum zu dominieren, da weder rechtzeitig reagiert noch gegengesteuert werden kann. Fehlentscheidungen, -einschätzungen und -planungen sind in diesem entwicklungsintensiven Bereich zudem besonders schmerzhaft. Aus diesem Grund sind auch die Selektionskriterien, unter denen die Entwicklung neuer Wirkstoffe und Sorten vorangetrieben wird, für den späteren Erfolg dieser Produkte von absolut entscheidender Bedeutung. Hier können nur mit genetisch genau charakterisierten bzw. definierten Pathotypen/Isolaten, also mit einer produktorientierten Nutzung der genetischen Information zu den entsprechenden Pathogenen, nachhaltig erfolgreich neue Zuchtsorten und Wirkstoffe selektiert werden.

Ziel des Vorhabens war deshalb die Entwicklung und/oder die Verbesserung von methodischen Grundlagen zur Handhabung und Analyse wichtiger pilzlicher Pflanzenpathogene über die gesamte Bearbeitungsschiene der Stichprobengewinnung, der Erregerisolierung, Kultivierung, Pathogenanalyse und genetischer Charakterisierung (vornehmlich Virulenz und Fungizidresistenz), isolat- und damit eigenschaftsspezifischer Aufbewahrung und Infektion. Im Zentrum stand dabei das Interesse der Entwicklung hocheffizienter, möglichst miniaturisierter Verfahren (*in vivo* und *in vitro*), um die Handhabung und Analyse einer maximalen Anzahl an verschiedenen Pathogenen sowie deren Isolaten künftig zu ermöglichen. Zusätzlich war es auch von Bedeutung zu klären, inwieweit molekulargenetische Verfahren insbesondere der Isolatidentifizierung und -charakterisierung einen zusätzlichen Informations- und/oder Selektionsvorteil bieten könnten.

2. Voraussetzung, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Der **Forschungsbedarf** als Voraussetzung für ein derartiges Projekt wurde bereits im obigen Abschnitt (Punkt 1) einführend dargelegt. Für die Durchführung des Vorhabens stand ein ausreichendes Maß an **technischer Laborausstattung** wie Mikroskope/Stereomikroskope, sterile Werkbänke oder Anzucht-kammern zur Verfügung, wobei die Geräteausstattung im Projektverlauf aus eigenen Mitteln noch opti-miert wurde. Jedoch waren keinerlei Möglichkeiten der Umweltsimulation, insbesondere der individuellen Variation der drei wesentlichen Komponenten Lichtintensität und Tageslänge, relative Luftfeuchte und Temperatur vorhanden. Bei der gesamten Aufgabenbearbeitung haben sich deshalb die im Rahmen des Projekts angeschafften drei Klimasimulationsschränke (**vorhabensspezifische Anlagen**) als wertvolle Investitionsentscheidung herausgestellt, ohne die ein derartiges vielschichtiges Vorhaben nicht zu be-werkstelligen gewesen wäre (s.a. Punkt 3). In der Anlaufphase des Vorhabens wurden für einige Monate noch die **Räumlichkeiten** an der TU München-Weihenstephan, Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzen-züchtung, genutzt, bevor dann Mitte 1998 der Umzug in eigene Labor- und Büroräume mit ca. 400 m² Nutzfläche direkt am Campus von Weihenstephan in der Hohenbachernstraße erfolgte. Der neue **Unternehmensstandort** mit seiner direkten Zugehörigkeit zu Weihenstephan bildete für das Vorhaben eine wichtige Voraussetzung. So konnte geeignetes **Fachpersonal** relativ rasch gewonnen werden. Zudem ermöglichte die Standortwahl direkte und unkomplizierte **Kontakte** zu einer breiten Anzahl an „Grünen“ Forschungseinrichtungen in Weihenstephan mit verschiedenen Lehrstühlen (z.B. Lehrstuhl für Phyto-pathologie, Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung) sowie der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, was wiederum beste Voraussetzungen für einen **Informationsaustausch und thematische Kooperationen** (s. Punkt 5) bildete. Durch bereits im Vorfeld vorhandene persönliche und fachliche Kontakte des Geschäftsführers der EpiLogic GmbH, Dr. Friedrich G. Felsenstein, war dies von Anfang an gewährleistet. Dieser konnte zudem **eigene Erfahrungen und fachliche Kompetenz** in das Vorhaben einbringen, da er sich selbst bereits seit über 10 Jahren mit der Thematik beschäftigte (Promotion 1991, dann Assistentenstelle am Lehrstuhl [bis 1998], Gründung der EpiLogic GmbH im Nov. 1996). Zudem bestanden zu Projektbeginn bereits Kontakte zu Pflanzenzuchtbetrieben, Forschungseinrichtungen der Industrie sowie wissenschaftlichen Institutionen auf nationaler und internationaler Ebene. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Teilnahme am EU-Projekt ‚COST-Action 817: Populati-on studies of airborne pathogens as a means of improving strategies for disease control‘ (s.a. Punkt 4).

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Als Zielpathogene für das Vorhaben wurden ökonomisch wichtige Krankheitserreger an landwirtschaftli-chen und gartenbaulichen Kulturpflanzen gewählt, die eine überregionale, teilweise globale Bedeutung innehaben, ein hohes Anpassungspotential besitzen und zumeist einer starken Ausbreitungsdynamik über die Windverbreitung unterliegen. Durch einen engen Kontakt mit Pflanzenzüchtung und chemischer In-dustrie (s.a. Punkt 2) wurde dabei je nach wirtschaftlicher Bedeutung des Pathogens und Interesse bei den Partnern die Schwerpunktsetzung innerhalb des Vorhabens bzw. eine Justierung und gegebenenfalls auch Korrektur der Zielsetzung während der Projektlaufzeit vorgenommen.

Bereits bei Antragstellung war klar, dass je nach Erreger unterschiedliche Zeitspannen für die Erarbeitung der methodischen Grundlagen erforderlich sein würden. Dabei ließen sich vorab nur grobe Zeitrahmen abschätzen. So wurden je nach gewähltem Erreger Zeitspannen zwischen 1 Jahr und 3 Jahren angesetzt. Für die pathogenspezifische Meilensteinsetzung bot sich am besten der Zeitpunkt als ‚Endkontrollpunkt‘ an, an dem der Übergang von der Grundlagenforschung (= Erarbeitung der methodischen Grundlagen) in die eigentliche Produktentwicklung, d.h. in die Erstellung der pathogenspezifischen Leistungsschiene für die genombasierte Entwicklung von krankheitsresistenten Sorten und effizienten Wirkstoffen (= Umset-zung am Markt) erfolgen konnte.

Bei den Arbeiten zum Vorhaben galt es grundsätzlich, bei jedem Krankheitserreger unter dem Blickpunkt eines möglichst hohen Isolatdurchsatzes eine Reihe von Projektpunkten bzw. Arbeitszielen zu erreichen, welche eine spätere Integration in den BioService des Unternehmens ermöglichen würden. Diese Punkte umfassen im Wesentlichen die methodischen Grundlagen je Pathogen zur

- Stichprobengewinnung
- Isolation einzelner Individuen
- Pathogentransfer/-überimpfung
- Pathogenkultivierung/-vermehrung
- Pathogenkonservierung, Daueraufbewahrung
- Eigenschaftsanalyse (Virulenz, Wirkstoffsensitivität u.ä.)
- Miniaturisierung der Testsysteme (*in vivo*, *in vitro*)

Bei jedem Pathogen mussten dabei ganz unterschiedliche, sehr spezifische Umweltansprüche und biologische Abläufe Berücksichtigung finden. Die Arbeiten gestalteten sich daher äußerst vielschichtig und ein Erfolg des Projekts war ausschließlich dadurch zu erzielen, dass mehrere Erreger stets parallel bearbeitet wurden, wobei ohne die im Rahmen des Projekts angeschafften drei Klimasimulationsschränke (vorhabensspezifische Anlagen, s.a. Punkt 2) ein derartiges vielschichtiges Vorhaben nicht zu bewerkstelligen gewesen wäre. Die Versuche richteten sich dabei in ihrem Ansatz zumeist nach den Erfahrungen aus den vorangegangenen Versuchsreihen. Neue Erkenntnisse bei den methodischen Grundlagen wurden zudem auf ihre Ergebnisstreuung, Zuverlässigkeit und Praktikabilität hin in entsprechenden Versuchsreihen überprüft. So benötigten die Untersuchungen einen erheblichen Zeitaufwand und es war die richtige Entscheidung, die Laufzeit des Vorhabens auf mindestens vier Jahre auszulegen. Sehr positiv war zudem, dass der Bewilligungszeitraum des Projekts über den ursprünglich angesetzten Zeitrahmen vom 01.11.1997 bis 31.10.2001 hinaus über eine Streckung der finanziellen Mittel bis zum 31.03.2002 verlängert werden konnte.

Vergleicht man die im Projektantrag anvisierten Pathogene mit den nunmehr tatsächlich in das Projekt integrierten Erregern (s. Punkt 6), so erfolgte während der Projektlaufzeit nicht nur eine gewisse Modifizierung des bearbeiteten Erregerspektrums, sondern auch eine deutliche Erweiterung in der Anzahl und in der Ausrichtung. So wurden wichtige Schaderreger nicht nur an landwirtschaftlichen, sondern auch an gartenbaulichen Kulturpflanzen aufgenommen. Hintergrund für die Auswahl der Zielpathogene war stets die kontinuierliche Bedarfsvaluierung vornehmlich bei der chemischen Industrie und in der Pflanzenzüchtung.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Bei vier wichtigen windverbreiteten Schaderregern, dem Weizenmehltau, Gerstenmehltau, Weizenbraunrost und dem Gerstenzwergerost war ihre Handhabung bereits in etlichen Punkten (Stichprobengewinnung, Eigenschaftsanalyse u.a.) entwickelt, erprobt und bis dahin auch inzwischen international anerkannt. An die Erfahrungen bei diesen Pathogenen aus den vergangenen 15 Jahren am Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung konnte teilweise direkt aufbauend angeknüpft werden. Bei allen weiteren pilzlichen Pathogenen waren nur bruchstückhaft Informationen zu einzelnen Zielpunkten des Projekts (s.o. Punkt 3) zu evaluieren, teilweise mit unterschiedlichen, auch widersprüchlichen Angaben. In einigen Fällen erwies sich auch die bisherige Lehrbuchmeinung als nicht ganz korrekt. Laborgeeignete, insbesondere miniaturisierte und auf einen hohen Isolatdurchsatz hin geeignete Arbeitsverfahren lagen bei den meisten Pathogenen überhaupt noch nicht vor, oder beispielsweise bei fakultativen Erregerformen nur *in vitro*, jedoch nicht *in vivo*, so dass bei etlichen Pathogenen die Erforschung der methodischen Grundlagen der Pathogenhandhabung und -analytik tatsächlich noch „in den Kinderschuhen“ steckte. Fachliteratur sowie Informations- und Dokumentationsdienste konnten deshalb nur in eingeschränktem Umfang für das Vorhaben

herangezogen werden oder waren zumeist lediglich Grundlage für eine Neuarbeitung oder Weiterentwicklung der methodischen Ansätze. Als Informationsgrundlage für die Versuche dienten deshalb in erster Linie ein reger Informations- und Erfahrungsaustausch innerhalb der Firma sowie mit Kooperationspartnern (s.u. Punkt 5) und weiteren Kontakten (s.o. Punkt 2). Bei der Suche nach brauchbaren Hinweisen/Anregungen wurde auf nachfolgend aufgelistete Fachliteratur zurückgegriffen:

- Gesunde Pflanze
- Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz
- Pflanzenschutzpraxis
- Beiträge zur Deutschen Pflanzenschutztagung, 1988 - 2000
- Phytopathology
- Journal of Phytopathology
- European Journal of Plant Pathology
- Plant Disease
- Plant Breeding
- Plant Pathology
- Physiological Plant Pathology
- Netherlands Journal of Plant Pathology
- Canadian Journal of Plant Pathology
- Canadian Journal of Research
- Canadian Plant Disease Survey
- Canadian Journal of Microbiology
- Canadian Journal of Botany
- Canadian Journal of Plant Science
- Journal of Agricultural Research
- Mycological Research
- Applied and Environmental Microbiology
- EPPO Bulletin
- Annuals of Applied Biology
- Transcriptions of the British Mycological Society
- Genetic Resources and Crop Evolution
- Journal of Chromatography
- Proceedings of the International Congress of Plant Protection
- Proceedings of the British Crop Protection Conference

Daneben wurden diverse Dissertationen, Diplomarbeiten und Internet-Homepages durchforstet.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Eine intensivere Zusammenarbeit erfolgte innerhalb Freising-Weihenstephans mit dem Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, der 1999 gegründeten EpiGene GmbH (molekulargenetische Verfahren) sowie mit der Bayerischen Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau. In all diesen Fällen erstreckte sich diese auch auf die gegenseitige Nutzung von Forschungseinrichtungen. Des weiteren wurde ein teilweise intensiver methodischer Austausch mit Partnern aus der chemischen Industrie sowie zu in- und ausländischen Institutionen, bei letzteren insbesondere über das EU-Projekt ‚COST-Action 817: Population studies of airborne pathogens as a means of improving strategies for disease control‘ gepflegt und je nach spezifischer Fragestellung das hierzu vorliegende Wissen für ein erfolgreiches Gelingen des Projekts einbezogen.

6. Ergebnisse

Ziel des Vorhabens war es, die methodischen Grundlagen für ein möglichst breites Spektrum an ökonomisch wichtigen pilzlichen Pathogenen an Kulturpflanzen zu erarbeiten (s.a. Punkt 1). Dieses Ziel wurde in seinen wesentlichen Punkten in vollem Umfang erreicht. Mit dieser im Rahmen des BioRegio-Projekts ermöglichten Vorlaufforschung ist es nunmehr bzw. war es bereits möglich, eine schrittweise Erweiterung und Diversifizierung in der Dienstleistungspalette einer angewandten Forschung des Unternehmens vorzunehmen, um die jeweils schwerpunktmäßig unterschiedlichen Bedürfnisse künftiger Kooperationspartner (s.a. Punkt 1 und 7) ansprechen zu können. Im Ergebnisteil wird deshalb ein Überblick zu den im Rahmen des BioRegio-Projekts bearbeiteten Pathogenen unter den hier nochmals aufgelisteten Gesichtspunkten (vgl. Punkt 3)

- Stichprobengewinnung
- Isolation einzelner Individuen
- Pathogentransfer/-überimpfung
- Pathogenkultivierung/-vermehrung
- Pathogenkonservierung, Daueraufbewahrung
- Eigenschaftsanalyse (Virulenz, Wirkstoffsensitivität u.ä.)
- Miniaturisierung der Testsysteme (*in vivo*, *in vitro*)

nachfolgend gegeben:

Blumeria graminis f.sp. tritici, Blumeria graminis f.sp. hordei (Echter Mehltau an Weizen, Echter Mehltau an Gerste): Wie erwähnt (s. Punkt 4) lagen bei diesen beiden Krankheitserregern bereits umfangreiche Erfahrungen und Erkenntnisse zu ihrer Handhabung und Pathogenanalyse vor. Ergänzende Versuchsreihen erbrachten nur noch kleinere Fortschritte in den o.g. Punkten, so dass die gesamte Leistungsschiene der methodischen Grundlagen bei beiden Erregern vollständig vorliegt. Eine länderübergreifende Stichprobengewinnung kann dabei gut mit einer mobilen Düsensporenfalle vorgenommen werden, wobei entsprechende Sporensammlungen zeigten, dass die Konzentration an Erregerporen in der Luft wesentlich von der regionalen quantitativen Epidemie vor Ort und den Windverhältnissen abhängt. Mit zunehmender Windstärke steigt dabei die Konzentration an Sporen in der Luft überproportional an. Alle Schritte im Labor erfolgen dann bei diesen beiden obligaten Parasiten miniaturisiert *in vivo* an Blattsegmenten auf Wasseragar. Die Versuchsreihen zeigten auf, dass ein gleichmäßiger Infektionserfolg wesentlich vom Blattalter und -stadium abhängt, wobei bei zunehmender Seneszenz der Blätter dieser überproportional abnimmt. Eine spezifische und hohe physiologische Aktivität im Blatt scheint hier eine wesentliche Voraussetzung für die Erkennung des Wirtes durch den Pilz zu sein.

Puccinia recondita f.sp. tritici, Puccinia recondita f.sp. recondita (Weizenbraunrost, Roggenbraunrost): Arbeitsmethoden zu diesem Erregerkomplex waren schon vor Projektbeginn in der EpiLogic GmbH teilweise entwickelt und etabliert. Es wurden jedoch weitere Erkenntnisse und teilweise Verbesserungen zur Erregergewinnung, Erregererhaltung und Miniaturisierung eines *in vivo* -Testverfahrens, ebenfalls mit Blattsegmenten auf Wasseragar, erzielt, so dass nunmehr alle benötigten methodischen Stufen vorliegen. Auch bei diesen beiden Pathogenen ist eine repräsentative Stichprobengewinnung aus der Luft während der Fahrt durch das jeweilig Anbaugebiet unter Beachtung seiner spezifischen biologischen Bedürfnisse gut möglich.

Septoria tritici (Blattbräune bei Weizen): Die Entwicklung der methodischen Grundlagen für alle o.g. Zielpunkte gestaltete sich bei diesem Erreger besonders schwierig und zeitaufwendig und zog sich letztendlich über mehrere Jahre bis kurz vor Projektschluss hin. Insbesondere bereitete das angestrebte miniaturisierte *in vivo* -Analysenverfahren mit Blattsegmenten auf Wasseragar extreme Schwierigkeiten und

experimentellen Aufwand. Letztendlich konnte jedoch auch dieses bei *Septoria tritici* entwickelt und erfolgreich erprobt werden. Parallel erfolgte die Etablierung eines *in vitro* -Testsystems auf Microtiter-Ebene. Ein Vergleich beider Verfahren machte deutlich, dass bei dem *in vivo* -Prüfsystem eine weit geringere Streuung der Messwerte vorliegt und damit eine wesentlich höhere Zuverlässigkeit in der Aussage erbringt. Demgegenüber zeichnet sich das *in vitro* -Testsystem durch einen potentiell höheren Probendurchsatz aus, so dass sich beide Systeme, auf einander aufbauend, gut ergänzen können. Eine Stichprobengewinnung aus der Luft ließ sich bei diesem Erreger bisher nicht realisieren; die Sammel- und Inkubationsbedingungen waren mit der Biologie des Pathogens noch nicht in Einklang zu bringen, so dass die Stichprobengewinnung manuell aus Feldbeständen erfolgen muss, was bei europaweiter Aufgabenstellung den Aufbau eines entsprechenden Netzwerkes notwendig macht. Fragen zur optimalen Probengewinnung und zum -versand (trocken/frisch) konnten abgeklärt werden.

Drechslera/Pyrenophora teres (Netzfleckenkrankheit an Gerste): Bei *Drechslera teres* konnten alle wichtigen Schritte im Arbeitsverfahren fertig entwickelt werden. Dies sind zum einen die repräsentative Stichprobengewinnung aus dem in der Luft befindlichen Sporeninokulum mit Hilfe der mobilen Düsen-sporen-falle. Interessant ist hierbei, dass bis dato eine Verbreitung der Krankheit mit dem Wind als von untergeordneter Bedeutung angesehen oder höchstens über nur sehr kurze Distanzen angenommen wurde, was durch eine Stichprobengewinnung ‚auf der Autobahn‘ widerlegt werden konnte. Pathogentransfer und -vermehrung erfolgen über jeweils geeignete Nährmedien *in vitro*. Des weiteren wurde ein miniaturisiertes *in vivo* -Testverfahren für die Pathogenanalyse zur Virulenz- und Fungizid-sensitivitätsbestimmung entwickelt, bei dem mit einem Airbrush-System (Mikrosprüher) Blattsegmente auf Wasseragar infiziert werden. Mit den daraus resultierenden definierten Pathotypen konnte in einer groß angelegten Testreihe bereits die Tauglichkeit des Verfahrens für die Selektion genetisch unterschiedlicher Resistenzdonoren im Rahmen einer genombasierten Entwicklung resistenter Sorten in der Pflanzenzüchtung nachgewiesen werden. Definierte Pathotypen wurden nach erfolgreicher schneller Vermehrung auch an den Lehrstuhl für Phytopathologie in Freising-Weihenstephan für differenzielle Untersuchungen (Induktion von Krankheitsresistenz unter Ozonbegasung) abgegeben und experimentell mit Erfolg eingesetzt.

Uncinula necator (Echter Mehltau an Wein, Rebenmehltau): Aufgrund seines großen Schadenspotenzials und seiner damit verbundenen ökonomischen Bedeutung wurde dieser Erreger in das Bio-Regio-Projekt aufgenommen. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei diesem Pathogen um einen sehr anspruchsvollen Krankheitserreger handelt, der zudem stark der Gefahr des Befalls mit Hyperparasiten unterliegt. Die Testreihen ergaben, dass *Uncinula necator* ganz andere, teilweise sogar gegenläufige biologische Ansprüche an Licht, Temperatur und Luftfeuchte besitzt als beispielsweise Weizen- oder Gerstenmehltau, so dass sich diese Erregerformen keinesfalls unter gleichen Inkubationsbedingungen im Labor halten bzw. reproduzieren lassen. Auch der Pathogentransfer sowie die Isolaterhaltung unterliegen teilweise recht unterschiedlichen Bedürfnissen, wobei sich wiederum die methodischen Ansprüche beim Rebenmehltau teilweise weitaus komplexer gestalten. Eine Miniaturisierung des Testsystems erfolgte mit der Infektion von Blattscheiben (\varnothing ca. 1 cm) auf Wasseragar in kleinen Petrischalen (\varnothing ca. 6 cm). Eine Stichprobengewinnung ist mit der mobilen Düsen-sporen-falle gut möglich, was eine maximale Repräsentativität bei der Probenahme gewährleistet.

Plasmopara viticola (Falscher Mehltau am Wein, Rebenperonospora): Auch dieser Erreger wurde während der Projektlaufzeit aufgrund der parallel vorgenommenen Bedarfsevaluierung (s.a. Punkt 3) in das Vorhaben aufgenommen. Die methodischen Studien zeigten dabei eine relativ unproblematische Handhabung des Erregers auf, natürlich unter Beachtung der spezifischen biologischen Bedürf-

nisse dieses Oomyceten. So besteht beispielsweise zur Infektion ein essentieller Bedarf an tropfbar flüssigem Wasser zur Zoosporentlassung, wobei eine Dunkelphase von 12-24 h das Eindringen des Pathogens durch die dann geöffneten Spaltöffnungen auf der Rückseite der Weinblätter ermöglicht. Eine Miniaturisierung des Testsystems wurde, nicht zuletzt anhand der Erfahrungen beim Rebenmehltau, relativ rasch erreicht. Auch die Punkte Pathogenüberimpfung und Erregeraufbewahrung sind abgeklärt. Letzteres ist über ein einfaches Einfrieren bei -20 °C gut möglich. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine Stichprobengewinnung auch mit Hilfe der mobilen Düsensporenfalle erfolgen kann, was bis dato umstritten war, da man eine Verbreitung der Sporangien eher nur über relativ geringe Distanzen wie zwischen benachbarten Blättern annahm. Allerdings hat sich gezeigt, dass die Konzentration an Sporangien in der Luft nicht nur von der lokalen Epidemie und dem vorherrschenden Wind abhängt, sondern zusätzlich von tagesindividuellen klimatischen Faktoren, deren genaue Definition bis zum Projektende noch nicht ganz erforscht werden konnte.

Venturia inaequalis (Apfelschorf): Der Apfelschorf wurde ebenfalls aufgrund einer Bedarfserfassung in das BioRegio-Projekt integriert. Er ist der bedeutendste Krankheitserreger im Apfelanbau und bedarf zu seiner erfolgreichen Bekämpfung zumeist eines intensiven chemischen Pflanzenschutzes mit einer relativ hochfrequenten Spritzfolge. Zudem ist er sehr anpassungsfreudig. In den Versuchsreihen zu seiner methodischen Handhabung erwies er sich als relativ anspruchsvoll, so dass sich die Entwicklung o.g. methodischer Zielpunkte als recht zeitaufwendig erwies. Schließlich gelang es aber doch, alle Punkte abzuarbeiten, welche nunmehr die Erstellung der gesamten Leistungsschiene gewährleistet. Insbesondere die Entwicklung eines miniaturisierten *in vivo* -Testsystems benötigte intensive Versuchsreihen. Ergebnis ist ein Airbrush-System sowohl für die Wirkstoffapplikation als auch für die Pathogeninfektion. Besonderes Augenmerk musste beispielsweise auch auf das verwendete Blattmaterial und dessen kurzfristige Anreicherung für die Versuche gerichtet werden, da nur ein ganz bestimmtes Blattstadium mit einem engen temporären Fenster selbst bei hochanfälligen Sorten infektionssensitiv ist (vgl. a. *Blumeria graminis*, *Sphaerotheca humuli*). Die Stichprobengewinnung mit der mobilen Düsensporenfalle wurde experimentell noch nicht angegangen, die Proben bisher manuell vom Baum genommen.

Sphaerotheca humuli (Echter Mehltau am Hopfen): Dieses Pathogen mit hohem Schadpotential an der Sonderkultur Hopfen wurde in das Projekt aufgenommen, da eine enge räumliche Nähe zur Hallertau, dem weltweit größten Hopfenanbaugebiet, vorliegt und sich zudem eine gute Zusammenarbeit mit der Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, Abschnitt Hopfen, ergab. Dort wurde ebenfalls ein miniaturisiertes *in vivo* -Prüfverfahren nachgefragt, das u.a. im Rahmen einer markergestützten Selektion für Resistenzeigenschaften auf molekulargenetischer Ebene zum Einsatz kommen sollte. In den Testreihen stellte sich heraus, dass es sich bei diesem Erreger wiederum um ein in der Handhabung besonders anspruchsvolles Pathogen handelt, das zudem gerne von Hyperparasiten heimgesucht wird. Letztendlich verliefen die Arbeiten zur Entwicklung der methodischen Grundlagen in allen notwendigen Punkten (s.o.) erfolgreich. Interessant ist beispielsweise, dass auch bei diesem Pathogen für der Auswahl infektionsfähigen Pflanzenmaterials nur auf ein ganz bestimmtes, zeitlich eng begrenztes Entwicklungsstadium der Blätter zurückgegriffen werden kann, in dem eine maximale physiologische Aktivität vorliegt.

Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel): Aus Kapazitätsgründen konnte die Erarbeitung der methodischen Grundlagen bei diesem wichtigen Krankheitserreger an der Kartoffel vornehmlich erst zum Ende der Projektlaufzeit angegangen werden. Eine ganze Reihe von Versuchsanstellungen erbrachte jedoch wertvolle Erkenntnisse und Erfahrungen, auf die nach Ablauf des BioRegio-Projekts im Frühjahr 2002 mit weiteren Versuchsreihen aufgebaut werden konnte. Die bis zum Herbst 2002 durchgeführten experimentellen Arbeiten zur Pflanzenanzucht, Erregerinkubation, -erhaltung, -

überimpfung, -infektion sowie zur Wirkstoffapplikation und der Miniaturisierung eines *in vivo* –Testsystems, mit Hinblick auf einen hohen Isolatdurchsatz, waren bereits so erfolgreich, dass erste Sensitivitätsanalysen probenhalber durchgeführt werden konnten, die stabile, wiederholbare Resultate aufzeigen. Von einem erfolgreichen Abschluss der Arbeiten zu den methodischen Grundlagen kann somit ausgegangen werden.

Erysiphe betae (Echter Mehltau an der Zuckerrübe): Versuche wurden bei diesem Erreger während der Projektlaufzeit mit Unterbrechungen, in 1999 und zuletzt in 2002 vorgenommen. Der Krankheitserreger hat in den letzten Jahren aufgrund neuer mehltauanfälliger Zuchtsorten europaweit regional an Bedeutung gewonnen. Die Versuche bezogen sich vorwiegend auf die Handhabung im Labor wie Erregererhaltung, -isolierung und -infektion sowie auf eine Miniaturisierung des Analyseverfahrens, wobei teilweise auf die Erfahrungen bei den anderen, im Projekt bearbeiteten Mehltauformen (s.o.) zurückgegriffen wurde. Die bisherigen Arbeiten waren allerdings nur teilweise erfolgreich, und so ist auch nach Projektende noch experimenteller Aufwand erforderlich, um die methodischen Grundlagen für die oben bezeichneten Punkte auch bei diesem Erreger komplett abzuklären.

Molekulargenetische Analysen:

Entsprechende Untersuchungen wurden vorgenommen, um die Integration molekulargenetischer Methoden für das Erreichen der Projektziele zu prüfen. Wie bereits erwähnt (s. Punkt 1), sollte flankierend geklärt werden, inwieweit derartige Verfahren insbesondere der Isolatidentifizierung und -charakterisierung und die Nutzung der daraus abgeleiteten genetischen Information einen zusätzlichen Informations- und/oder Selektionsvorteil bei der Sorten- und Wirkstoffentwicklung bieten. Dabei wurde in zwei Richtungen experimentiert, die nachfolgend angesprochen werden. Bei der Diskussion, Planung, Vorbereitung und Durchführung der Versuche wurde jedoch schnell klar, dass ihre konsequente Weiterverfolgung den Rahmen des hier berichteten BioRegio-Projektes in zeitlicher, personeller, finanzieller und auch thematischer Hinsicht rasch und in hohem Umfang überschreiten würde. Die im Rahmen des Projektes durchgeführte experimentelle molekulare Forschung war deshalb der Anstoß zu weit umfangreicheren Aktivitäten, die nicht nur einer separaten Finanzierung hinsichtlich der Laborausstattung und Versuchsdurchführung wie Verbrauchsmaterial und Personal bedurften, sondern schließlich auch zur Gründung der EpiGene GmbH, Biotechnologie im Pflanzenschutz, führten. In letzterer sind nunmehr alle derzeit angestrebten molekularen Aktivitäten der Analyse mono- und oligogen bedingter Wirkstoffresistenz, differentieller Genexpression zur Wirkstoffcharakterisierung und Identifizierung, markergestützten Selektion mono- und oligogen bedingter Eigenschaften und GVO-Analytik zusammengefasst.

1. Untersuchungen zur Wirt-Pathogen-Interaktion:

Im Rahmen des BioRegio-Projekts wurden in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Freising-Weihenstephan, erste Versuche zur Wirt-Pathogen-Interaktion mit der Analyse der differentiellen Genexpression vorgenommen. Ziel des Verfahrens ist die Identifizierung differentiell exprimierter Gene von Pflanzen und Pflanzenpathogenen, deren Aktivität bei Pathogeninfektion bzw. Wirkstoffapplikation spezifisch verändert wird. Hierunter könnten sich dann u.a. auch Virulenzgene und Gene, welche die Fungizidempfindlichkeit steuern, ebenso finden wie Gene, die für ganz spezifische, essentielle Schritte bei der Infektion verantwortlich sind. Als Modellpathogene dienten *Drechslera teres* und *Phytophthora infestans*. Die Versuche waren in ihrem Ergebnis so vielversprechend, dass ihre intensivere Weiterführung in einem separaten Projekt (s.u.) vorgenommen werden sollte, zumal der beantragte finanzielle Rahmen des vorliegenden BioRegio-Projekts weiterführende Arbeiten keinesfalls erlaubt hätte (s. auch o.).

2. Untersuchungen zur monogen bedingten Wirkstoffresistenz gegenüber Strobilurinen:

Während der Projektlaufzeit wurde 1998 erstmals Resistenz gegenüber der Wirkstoffgruppe der Strobilurine beim Weizenmehltau festgestellt. Diese Resistenz ist monogen durch die Änderung einer einzigen Nucleotinsäure in der mitochondrialen DNA bedingt (sog. SNP). In den nachfolgenden Jahren erlangten dann immer mehr Erreger, die auch in diesem Projekt bearbeitet wurden, diese Resistenzeigenschaft. In Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Freising-Weihestephan, der chemischen Industrie und der neu gegründeten EpiGene GmbH, Freising-Weihestephan (s.a.o.), wurden biotechnologische Methoden entwickelt, die eine sowohl qualitative als auch quantitative Detektion einer entsprechenden SNP-Resistenzeigenschaft erlauben. In entsprechenden Vergleichsreihen wurden Isolate, die im Biotest als resistent bzw. sensitiv eingestuft worden waren, in ihrer Resistenzeigenschaft molekulargenetisch überprüft, wobei sich eine 100 %ige Übereinstimmung der Resultate ergab. Die molekulargenetischen Verfahren erwiesen sich dabei nicht nur als alternativer methodischer Ansatz, sondern als echte Ergänzung zu den bisher entwickelten *in vivo*- und *in vitro* -Verfahren. Dies insbesondere, da mit ihnen auch totes Erregermaterial (einschließlich dem Pflanzenmaterial) analysiert werden kann, das dem Biotest bisher nicht zugänglich war und so zu einer Erweiterung bzw. Ergänzung des Analysepotenzials führt. Dies wiederum ermöglicht beispielsweise eine prinzipiell globale Ausdehnung der Erregeranalyse, da in allen Regionen der Erde gesammeltes und befallenes Pflanzenmaterial beispielsweise vor Ort getrocknet, damit abgetötet und konserviert, und dann nach dem Abschluss der Stichprobengewinnung zugeschickt werden kann. Dies kommt wiederum phytosanitären Hygiene- oder Quarantänebestimmungen entgegen.

Obige Ausführungen machen deutlich, dass die Aufgabenstellung im BioRegio-Projekt, zu evaluieren, inwieweit molekulargenetische Verfahren zum Erreichen der Projektziele positiv beitragen können, eindeutig abgeklärt werden konnte.

7. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit der Ergebnisse; Fortschritt auf diesem Gebiet bei anderen Stellen

Wie bereits erläutert, sind überregionale Informationen zu Art, Ausmaß und Dynamik der Erregeranpassung an Wirkstoffe und die Krankheitsresistenz in der Pflanze für einen erfolgreichen Pflanzenschutz von absolut grundlegender Bedeutung. Außerdem lassen sich krankheitsresistente Zuchtsorten und neue effiziente Wirkstoffe am besten unter Nutzung der genetischen Informationen zum entsprechenden Zielpathogen (Virulenz, Wirkstoffsensitivität) selektieren (s.a. Punkt 1). Genau hier greift das auf das Vorhaben aufbauende Leistungsspektrum der EpiLogic GmbH: Zum einen werden länderübergreifend - teilweise mit globalem Potenzial - Informationen zu Art, Ausmaß und zur Dynamik der Erregeranpassung erarbeitet und des weiteren ein genetisch genau definiertes und nach den jeweils aktuellen Erkenntnissen stets modifiziertes bzw. optimiertes Pathotypenspektrum für die Produktselektion zur Verfügung gestellt. Gleichzeitig können entsprechende Untersuchungen „Inhouse“ über die dann im Unternehmen installierten miniaturisierten Prüfverfahren vorgenommen werden. Zielgruppen sind die öffentlichen und privaten Institutionen der landwirtschaftlichen und gartenbaulichen (Pflanzenschutz-)Beratung, die Wirkstoffe entwickelnde chemische Industrie, die Pflanzenzüchtung, Institutionen für die Zulassung von neuen Wirkstoffen und Sorten sowie allgemein Versuchsansteller im sog. 'Grünen Bereich'.

Nach der erfolgreichen Durchführung des Vorhabens mit pathogenspezifisch jeweils unterschiedlichen Zeitschienen wurde als Verwertung der Ergebnisse folglich die konzeptionelle Planung und Realisierung einer pathogenspezifisch jeweils möglichst kompletten Leistungsschiene vorgenommen (bzw. wird derzeit noch vorgenommen), welche von der Stichprobengewinnung über die Pathogen-, Pflanzen-, Wirkstoffana-

lyse und dem zugehörigen Informationstransfer bis hin zur Pathotypenerhaltung und -bereitstellung reicht (s.a. Punkt 3 und Punkt 6).

Die Firma EpiLogic GmbH, die vor Projektbeginn auf einige wenige Erreger und Arbeitsverfahren fokussiert war, kann so ihr Tätigkeitsfeld wesentlich ausweiten. Gleichzeitig ergeben sich aus den Forschungsarbeiten des Projekts allein über die Akkumulation des entsprechenden Wissens weiterführende Ansätze und Möglichkeiten, die sich über das Projekt hinaus sehr positiv auswirken. So haben sich beispielsweise auf dem molekulargenetischen Sektor weiterführende Ansätze in der Eigenschaftsanalyse der Pathogene und damit in der Kooperation mit der chemischen Industrie und der Pflanzenzüchtung ergeben (s.o. Punkt 6). Bisher gibt es weder in Deutschland noch in Europa neben der EpiLogic GmbH ein Unternehmen oder eine wissenschaftliche Einrichtung, welche die hier ermöglichte komplette Leistungsschiene in ihrer Pathogenvielfalt anbietet oder anbieten könnte. Ein entsprechender Fortschritt auf diesem Gebiet bei anderen Stellen wurde uns während der Durchführung des Vorhabens nicht bekannt.