

Schlussbericht

Zuweisungsempfänger: Julius Kühn-Institut Bundforschungsinstitut für Kulturpflanzen	Förderkennzeichen: FKZ:2219NR392
---	--

Thema:

Untersuchungen zur infektionshemmenden Wirkung eines Rhamnolipid-haltigen Biopräparates und von Süßholzextrakt auf bodenbürtige Viren von Zuckerrübe und Winterweizen und ihre plasmodiophoriden Vektoren.

Laufzeit des Vorhabens:

01.06.2020 bis 31.08.2021

<u>Projektleiter:</u>	Frau Dr. Annette Niehl
<u>Bearbeiter:</u>	Frau Dr. Viktoria Fomitcheva

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe unterstützt.

Datum der Veröffentlichung: 15.01.2025

I. Ziele 1. Aufgabenstellung

Im Rahmen der Machbarkeitsstudie sollte die inhibierende bzw. resistenzaktivierende Wirkung eines potenziellen Biowirkstoffs auf die beiden Pathosysteme Zuckerrübe - *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) - *Polymyxa betae* (Virusvektor) und Winterweizen - *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) - *P. graminis* (Virusvektor) untersucht werden. Bei dem Biowirkstoff handelte es sich um einen umweltfreundlichen Rhamnolipid-haltigen Supramolekularkomplex bakteriellen Ursprungs (exprimiert von *Pseudomonas aeruginosa*) mit dem Handelsnamen ‚Rhapynal‘. Als Vergleichsprodukt sollte Süßholzextrakt als Biowirkstoff dienen.

2. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Machbarkeitsstudie mit einer Laufzeit von 12 Monaten wurde am 01.06.2020 planmäßig begonnen. Jedoch wurden die experimentellen Arbeiten durch die Einführung von einschränkenden Maßnahmen als Reaktion auf die Corona-Pandemie von Beginn an in wesentlichen Teilen erheblich behindert. Zu Beginn kam es zu einer dreimonatigen zeitlichen Verzögerung bei der Beschaffung von SBWMV-verseuchter Erde als einzig möglichem Inokulum für die Infektionsversuche unter kontrollierten Bedingungen.

Folgende Hauptprobleme traten auf:

- Die wochenlange Untersagung jeglicher Dienstreisen machte die Beschaffung der für die Weizenexperimente erforderlichen SBWMV-verseuchten Befallserde vom Standort Heddesheim (Baden-Württemberg) zunächst unmöglich. Als Alternative wurde deshalb der etwas weniger stark bzw. homogen verseuchte und deutlich weniger charakterisierte Standort Elxleben (Thüringen) gewählt. Allerdings waren Bodenentnahme und –transport von Elxleben nach Quedlinburg auch erst Ende August möglich.
- Die Bereitstellung eines Teils des benötigten Rüben- (pilliert und unpilliert) und Winterweizensaatgutes durch ein Züchtungsunternehmen verzögerte sich durch Corona-bedingte betriebliche Einschränkungen ebenfalls um mehr als 8 Wochen.

Diese beiden Punkte führten dazu, dass die im Projekt vorgesehenen Weizenarbeiten erst mit dreimonatiger Verspätung anlaufen konnten und es auch bei der Rübe eine entsprechende Verzögerung gab. Im Arbeitsplan waren für die 12monatige Laufzeit drei umfassende Versuchsansätze für die Rübe und zwei (d.h. zumindest eine Wiederholung) für den Winterweizen vorgesehen. Um dieses experimentelle Programm ordnungsgemäß realisieren zu können, wurde damit eine Verlängerung des Fördervorhabens um drei Monate erforderlich, die

beantragt und vom Projektträger genehmigt wurde. Damit konnten alle in der Machbarkeitsstudie angestrebten Zielstellungen erreicht werden.

3. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Pflanzen können in ihrer natürlichen Umgebung durch zahlreiche Pathogene (Viren, Bakterien, Pilze) und tierische Schaderreger bedroht werden. Als Reaktion darauf aktivieren sie verschiedene Abwehrmechanismen, so z.B. physische und chemische zelluläre Barrieren, aber auch eigene Immunantworten, die nach Erkennung eines Mikroorganismus sehr schnell ausgelöst werden können (Boller and Felix, 2009). Dabei spielen mikrobielle Substanzen, die von der Pflanze spezifisch erkannt werden und die als *microbe associated molecular patterns* (MAMPs) bezeichnet werden, eine zentrale Rolle (Boller and Felix, 2009; Dodds and Rathjen, 2010). Die lang anhaltend und gegen ein breites Spektrum von Pathogenen wirkende Resistenz wird als systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance, SAR*) bezeichnet (Chester, 1933; Kuc, 1982; Ryals et al., 1994).

Verschiedene Phytohormone, wie Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen haben sich als die zentralen Faktoren bei der Aktivierung der Signalübertragungswege im Zusammenhang mit Pflanzenimmunität herausgestellt. Sie ermöglichen der Pflanze, das erforderliche Spektrum an Abwehrreaktionen gegen Pilze, Oomyzeten, Bakterien und Viren zu aktivieren bzw. zu modulieren (Robert-Seilaniantz et al., 2007; 2011; Tsuda et al., 2009, Vlot et al., 2009; Kouzai et al., 2018). Die Phytohormone können damit Pflanzenschutzeffekte in praxisrelevantem Maße auslösen und das bei so unterschiedlichen Kulturen wie Tabak, Weizen, Reis, Gurke oder Salat. Die pflanzliche Immunantwort führt zur Verdickung von Zellwänden, zur Produktion antimikrobieller Substanzen und in einigen Fällen zu hypersensitiven Reaktionen, die die weitere Pathogenentwicklung und –ausbreitung in der Pflanze verhindern.

Angesichts der effektiven pflanzeneigenen Abwehrleistungen ist die Stimulierung der angeborenen Immunität durch natürliche oder synthetische Elizitoren eine viel versprechende Alternative zu konventionellen Pestiziden und ein wichtiger Beitrag für die nachhaltige Produktion von Kulturpflanzen.

In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Berichte über neue chemische Substanzen, die die angeborene Immunität von Pflanzen aktivieren und die Abwehrreaktionen steigern können.

Rhamnolipide (RLs) und Lipopeptide (LPs) sind unterschiedliche Gruppen von amphiphilen Molekülen, die mittels „Grüner Chemie“, d.h. durch Mikroorganismen synthetisiert werden. Auch diese Stoffe können die zu unterschiedlichen Zeitpunkten (früh, spät) einsetzenden

Abwehrreaktionen der Pflanze auf Basis ihrer angeborenen Immunität aktivieren und damit ein Resistenzverhalten auslösen.

RLs sind Lipopolysaccharide, die bekannt sind für Biokompatibilität, Bioabbauvermögen und geringe Toxizität. Glycolipid-Elizitoren werden von verschiedenen Bakterienarten, so z.B. *Pseudomonas* spp. und *Burkholderia* spp. gebildet. Es sind effektive oberflächenaktive Moleküle (Biotenside), die für verschiedenste industrielle Zwecke eingesetzt werden können, so z.B. für Produktformulierungen bei Nahrungsmitteln, Kosmetika und Pharmazeutika aber auch zur Bindung von Luftschadstoffen. RLs sind geeignet zur Aufnahme und zum Abbau schwer löslicher Substrate. Sie sind essentiell für die Flexibilität mikrobieller Oberflächen und die Entwicklung von Biofilmen (Abdel-Mawgoud et al., 2010). Sie wurden auch als potenzielle Moleküle zur Stimulierung der angeborenen Immunität in tierischen Zellen identifiziert (Andrä et al., 2006; Bauer et al., 2006; Howe et al., 2006; Vatsa et al., 2010). RLs von *Burkholderia plantarii* stimulieren das Immunsystem von menschlichen Zellen (Andrä et al., 2006). RLs können aber auch Pathogenresistenz in Rebe, Weizen und Tabakzellen induzieren (Varnier et al., 2009; Vatsa et al., 2010). In *Arabidopsis thaliana* induzierten sie Resistenz gegen den necrotrophen Pilz *Botrytis cinerea*, ebenso gegen das hemibiotrophe Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* und den biotrophen Oomyzeten *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Damit können RLs in *A. thaliana* eine Immunreaktion gegen Pathogene mit ganz unterschiedlicher Lebensform auslösen (Sanchez et al., 2012).

Außer ihrer abwehrstimulierenden Wirkung besitzen die RLs auch antimikrobielle Eigenschaften, die zusätzlich zur Immunreaktion die Ausbreitung von Pilzen und Oomyzeten in infizierten Pflanzen verhindern (Stanghellini and Miller, 1997; Vatsa et al., 2010). RLs können sehr effektiv *Phytophthora sojae* Zoosporen in Sojabohnen auflösen und als effektive Fungizide dienen (Sancheti and Ju, 2019).

RLs haben so wie auch LPs unterschiedliche potenzielle Funktionen in den sie produzierenden Bakterien. Für LPs ist die Fähigkeit zur Induzierung der pflanzeneigenen Immunität beschrieben worden (Ongena et al., 2007; Raaijmakers et al., 2010; Monnier et al., 2019; Zanotto et al., 2019; Brück et al., 2020; Pršić and Ongena, 2020). Sie können mit der Plasmamembran von Pflanzen interagieren und eröffnen damit die Möglichkeit für einen lipidgeleiteten Weg zur Auslösung von Pflanzenimmunität.

LPs werden durch Vertreter zahlreicher Bakteriengattungen produziert, so z.B. *Streptomyces*, *Pseudomonas* und *Bacillus* (Raaijmakers et al., 2010). Sie bestehen aus einer kurzen Peptidkette mit einem Lipidschwanz. Lipopeptide von *B. subtilis* (Surfactin, Mycosubtilin und

Plipastatin) wurden als MAMPs erkannt durch *Vitis vinifera* und *A. thaliana* (Farace et al., 2015 ; Debois et al., 2015). Die Elizitoreigenschaften von Lipopeptiden wie Surfactine, Fengycin and Massetodine A wurden für Bohnen- und Tomatenpflanzen beschrieben (Ongene et al., 2007; Tran et al., 2007).

Die Mechanismen der Erkennung von RLs und LPs durch Zellen sind noch unbekannt. Es wird vermutet, dass sie ebenfalls durch spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche erkannt werden, wie das für MAMPs schon gezeigt werden konnte.

RLs lassen sich heute auch synthetisch herstellen. Das synthetische RL Bolaforms löste eine Immunantwort in *A. thaliana* aus (Menhour et al., 2015; Nasir et al., 2017; Luzuriaga-Loaiza et al., 2018).

Das RL ‚Rhapynal‘ ist ein Produkt der Biotensidon GmbH (Karlsruhe, Deutschland). Es ist ein umweltfreundlicher Supramolekularkomplex bakteriellen Ursprungs bestehend aus drei Komponenten: Rha - Rhamnolipid, pyn - Pyoverdin, al -Alginat. Alle Komponenten werden im Fermenter von einem nichtpathogenen *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm gebildet und in das Medium abgegeben, aus dem sie anschließend isoliert werden. Ob als Löschmittelzusatz, zur Bodenregenerierung im Umweltschutz, in der Landwirtschaft oder der Pharmazie – die Anwendungsbereiche von ‚Rhapynal‘ sind vielseitig.

In der Landwirtschaft wird Rhapynal beispielsweise als Bestandteil einer Saatgutbeschichtung verwendet. Hierdurch können die Samen vermehrt Feuchtigkeit binden und besser keimen. (<https://biotensidon.com/anwendungsgebiete/landwirtschaft>). Zusätzlich erleichtern die Rhamnolipide den Nährstofftransport, wodurch eine frühere und bessere Keimung erzielt wird. Die Keimlinge wachsen schneller und bringen größere Wurzeln hervor (Sancheti and Ju, 2020).

4. Literaturverzeichnis

1. Abdel-Mawgoud AM, Le´pine F, De´ziel E (2010): Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. Appl Microbiol Biotechnol 86: 1323-1336
2. Andrä J, Rademann J, Howe J, Koch MH, Heine H, Zähringer U, Brandenburg K (2006): Endotoxinlike properties of a rhamnolipid exotoxin from *Burkholderia (Pseudomonas) plantarii*: immune cell stimulation and biophysical characterization. Biol Chem 387, 301-310

3. Bauer J, Brandenburg K, Zähringer U, Rademann J (2006): Chemical synthesis of a glycolipid library by a solid-phase strategy allows elucidation of the structural specificity of immunostimulation by rhamnolipids. *Chemistry* 12, 7116-7124
4. Boller T, Felix G (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* 60, 379-406
5. Brück HL, Coutte F, Dhulster P, Gofflot S, Jacques P, and Devigne F (2020): Growth dynamics of bacterial populations in a two-compartment biofilm bioreactor designed for continuous surfactant Biosynthesis. *Microorganisms* 8, 679
6. Chester KS (1933): The problem of acquired physiological immunity in plants. *Q Rev Biol* 8, 275-324
7. Debois D, Jourdan E, Smargiasso N, Thornart P, De Pauw E and Ongena M (2015): Spatiotemporal monitoring of the antibiome secreted by *Bacillus subtilis* on plant roots using MALDI mass spectrometry imaging. *Anal Chem* 86, 4431-4438
8. Farace G, Fernandez O, Jacquens L, Coutte F, Krier F, Jacques P, Clément C, Barka EA, Jacquard C and Dorey S (2015): Cyclec lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defense responses in grapevine. *Mol Plant Pathol* 16, 177-187
9. Howe J, Bauer J, Andrä J, Schromm AB, Ernst M, Rössle M, Zähringer U, Rademann J, Brandenburg K (2006): Biophysical characterization of synthetic rhamnolipids. *FEBS J* 273, 51015112
10. Kastirr U; Ziegler A; Niehl A (2018): Schlussbericht zum Vorhaben: Monitoring zum Vorkommen bodenbürtiger Viren in Weizen, Triticale und Roggen in den wichtigsten Getreideanbaugebieten Deutschlands. (Berichte aus dem Julius Kühn-Institut 198), 54
11. Kouzai Y, Noutoshi Y, Inoue K, Shimizu M, Onda Y, and Mochida K (2018): Benzothiadiazole, a plant defense inducer, negatively regulates sheath blight resistance in *Brachypodium distachyon*. *Nature* 8, Article Number 17358
12. Kuc J (1982): Induced immunity to plant disease. *Bio Science* 32, 854-860
13. Lizuriaga-Loaiza WP, Schellenberger R, De Gaetano Y, Akong FO, Villaume S, Crouzet J, Haudrechy A, Baillieul F, Clément C, Lins L, Allais F, Ongena M, Bouquillon S, Deleu M and Dorey S (2018): Synthetic Rhamnolipid Bolaforms trigger an innate immune response in *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* 8(1), Article Number 8534
14. Menhour B, Mayon P, Plé K, Bouquillon S, Dorey S, Clément C, Deleu M, Haudrechy A (2015): A stereocontrolled synthesis of the hydrophobic moiety of rhamnolipids. *Tetrahedron letters* 56, 1159-1161

15. Monnier N, Furlan AL, Buchoux, S, Deleu M, Dauchez M, Ripa S, and Sarazin C (2019): Exploring the dual interaction of natural rhamnolipids with plant and fungal biomimetic plasma membranes through Biophysical studies. *Int J Mol Sci* 20, 1-20
16. Nasir MN, Lins L, Crowet JM, Ongena M, Dorey S, Dhondt-Cordelier S, Clément C, Bouquillon S, Haudrechy A, Sarazin C, Fauconnier ML, Nott K, and Deleu M. (2017): Differential interaction of synthetic glycolipids with biomimetic plasma membrane lipids correlates with plant biological response. *Langmuir* 33, 9979–9987
17. Niehl, A. Heinlein, M (2019): Perception of double-stranded RNA in plant antiviral immunity. *Mol Plant Pathol* 20, 1203-1210
18. Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P (2007): Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol* 9, 1084-1090
19. Pršić J and Ongena M (2020): Elicitors of plant immunity triggered by beneficial bacteria. *Front Plant Sci* 11, 1-12
20. Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M (2010): Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 34, 1037-1062
21. Robert-Selianiantz A, Grant M, Jones JD (2011): Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Ann Rev Phytopathol* 49, 317-343
22. Robert-Selianiantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD (2007): Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol* 10, 372-379
23. Ryals J, Uknes S and Ward E (1994): Systemic acquired resistance. *Plant Physiol* 104, 1109-1112
24. Sancheti, A and Ju, K-L (2019): Eco-friendly rhamnolipid based fungicides for protection of soybeans from *Phytophthora sojae*. *Pest Manag Sci* 75, 3031-3038
25. Sancheti, A, and Ju, K-L (2020): Rhamnolipid effects on water imbibition, germination, and initial root and shoot growth of soybeans. *J Surfact Deterg* 23, 371-381
26. Sanchez L, Courteaux B, Hubert J, Kauffmann S, Renault JH, Clément C, Baillieul F, Dorey S (2012): Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in *Arabidopsis* and highlight a central role for salicylic acid. *Plant Physiol* 160, 1630-1641
27. Stanghellini ME, Miller RM (1997): Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Dis* 81, 4-12

28. Tran H, Ficke A, Asiimwe T, Hofte M and Raaijmakers JM (2007): Role of the cyclic lipopeptide massetolide A in biological control of *Phytophthora infestans* and in colonization of tomato plants by *Pseudomonas fluorescens*. *New Phytologist* 17, 731-742
29. Tsuda K, Sato M, Stoddard T, Glazebrook J, Katagiri F (2009): Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet* 5:e1000772
30. Varnier AL, Sanchez L, Vatsa P, Boudesocque L, Garcia-Brugger A, Rabenoeline F, Sorokin A, Renault JH, Kauffmann S, Pugin A, Clement C, Baillieul F, Dorey S (2009): Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Plant Cell Environ* 32, 178-193
31. Vatsa P, Sanchez L, Clément C, Baillieul F, Dorey S (2010): Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes. *Int J Mol Sci* 11, 5095-5108
32. Vlot AC, Dempsey DA and Klessig DF (2009): Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47, 177–206
33. Zanotto AW, Valério A, de Andrade CJ, and Pastore GM (2019): New sustainable alternatives to reduce the production costs for surfactin 50 years after the discovery. *App Microbial Biotechnol* 103, 10123-10127

II. Eingehende Darstellung der Zuwendungsverwendung

1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse

Die Zuwendungen an Projektmitteln für Personal und Verbrauchsmaterialien wurden im Rahmen der geplanten Finanzierung ausgegeben. Durch Corona-bedingte Reiseeinschränkungen konnten nicht alle geplanten Dienstreisen durchgeführt werden; deshalb wurde ein Teil der bereitgestellten Mittel für zusätzlich benötigtes Verbrauchsmaterial eingesetzt.

Über die wissenschaftlichen Ergebnisse des Vorhabens wird detailliert im Abschnitt III berichtet.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Der zahlenmäßige Nachweis wurde in tabellarischer Form dem Zwischenbericht und dem Schlussbericht beigelegt.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Alternative Energien sind bereits heute wichtig. Ihre Bedeutung wird im Zuge der deutschen Energiewende aber auch international in Zukunft weiter deutlich steigen. Zuckerrüben sind ein ausgezeichneter, sehr energiereicher Ausgangsstoff für die Produktion von Biogas und Bioethanol. Die im Fördervorhaben erzielten Ergebnisse liefern wichtige methodische Grundlagen für die Gesunderhaltung von Rübenbeständen und damit zur Sicherung hoher Erträge. Die geleisteten Arbeiten waren für die Erfüllung der gestellten Aufgaben notwendig und angemessen, um die Zielstellung des Forschungsvorhabens erfolgreich zu erreichen.

4. Voraussichtlicher Nutzen

Dieses Forschungsvorhaben leistet einen wissenschaftlichen Beitrag für die Erschließung des Wertschöpfungspotenzials zur Sicherung der Zuckerrübenproduktion als nachwachsender Rohstoff für die Ethanol- und Biogasproduktion.

5. Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens durch andere Stellen

Während der Laufzeit des Forschungsvorhabens wurden von dritter Seite keine Ergebnisse bekannt, die für die Durchführung des Vorhabens relevant waren.

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Fomitcheva V, Strauch CJ, Bonse S, Bauer P, Kühne T, Niehl A. Bio-control of soil-borne virus infection by seed application of Glycyrrhiza glabra extract and the rhamnolipid Rhapynal. *Planta*. 2024 Sep 13;260(4):94. doi: 10.1007/s00425-024-04529-5.

III. Untersuchungsobjekte

BNYVV	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
BSBV	<i>Beet soil-borne virus</i>
BVQ	<i>Beet virus Q</i>
SBWMV	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i>

IV. Zuckerrüben- und Winterweizenmaterial sowie Erdproben

Saatgut (anfällige bzw. resistente und tolerante Genotypen) und Bodenproben wurden von Züchtungsfirmen (Strube D & S GmbH, KWS SAAT SE & Co. KGaA) und dem JKI bereitgestellt. Es wurde auch Handelssaatgut eingesetzt (Tabellen 1 und 2).

Tab. 1. Verwendetes Saatgut von Zuckerrübe und Winterweizen

Kultur	Sorte	Resistenzstatus	Herkunft
Zuckerrübe	Hannibal	tolerant	Strube
Winterweizen	Lisanna	tolerant	KWS
	MS133E15250	anfällig	Strube
	Reflection	anfällig	Handelssaatgut
	Kamerad	anfällig	Handelssaatgut
	Chevignon	anfällig	Handelssaatgut
	Alcedo	anfällig	Handelssaatgut
	Cadenza	resistent	JKI

Alle Bodenproben wurden mittels RT-PCR ausgehend von direkt aus ihnen extrahierter Gesamt-RNA auf ihren Virusstatus untersucht.

Tab. 2. Verwendete Bodenproben

Bezeichnung	Viren	Herkunft
Elxleben	SBWMV	Deutschland
Pithiviers	BNYVV, BVQ, BSBV	Frankreich
Mintraching	BNYVV, BVQ, BSBV	Deutschland

V. Chemikalien, Einheiten, Abkürzungsverzeichnis

dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat Natriumsalz
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
HCl	Salzsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
RT	Reverse Transkriptase
rpm	Umdrehungen pro Minute (english: <u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute)
PCR (qPCR)	Polymerase chain reaction (quantitativer PCR)
nm	Nanometer
Abb	Abbildung
bp	Basenpaare

°C	Grad Celsius
et al.	und andere
min	Minute(n)
ng	Nanogramm
s	Sekunde(n)
üN	über Nacht
U	Einheiten (Units)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
M	Molar
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm

VI. Material und Methoden

1. RNA-Isolierung aus Pflanzenmaterial

Gesamt-RNA wurde in der Regel mit dem „Plant Purification Agent“ (Bio&Cellki) isoliert. Es wurden dafür 100 mg gefrorenes Pflanzenmaterial zermörsert und mit 500 µl des Reagens versetzt. Nach 5 min Exposition bei Raumtemperatur (RT) wurde die Lösung durch 2 min Zentrifugation bei 12.000g geklärt. Der Überstand wurde in RNase-freie Eppendorf-Tubes überführt, anschließend mit 300 µl Chloroform versetzt und geschüttelt (Vortexer). Nach 10 min Zentrifugation bei 12.000g und 4°C wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen iso-Propanol versetzt und die RNA bei 12.000g, 10 min bei 4°C pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, leicht getrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

2. RNA-Isolierung aus Erdproben

Gesamt-RNA aus Bodenproben wurde mit dem FastRNA® Pro-Soil-Direct Kit (MP Biomedicals) gewonnen. Für eine maximale Ausbeute ist der vollständige Aufschluss der Probe sehr wichtig. Jede Erdprobe wurde zunächst fein gemörsert; 500 mg wurden in ein für den Rotor-Stator Homogenisator (SpeedMill PLUS, AnalytikJena) geeignetes Reaktionsgefäß mit 1 ml RNA Soil Lysis Solution übergeführt. Nach 3 min Homogenisierung wurde die Lösung

durch 5 min Zentrifugation bei 12.000g geklärt. Der Überstand wurde in RNase-freie Eppendorf-Tubes überführt, anschließend mit 750 µl Phenol:Chloroform (1:1) versetzt und geschüttelt (Vortexer). Nach 5 min Inkubation und 5 min Zentrifugation bei 12.000g wurde die wässrige Phase mit 200 µl Inhibitor Removal Solution versetzt. Nach 5 min Zentrifugation bei 14.000g wurde der Überstand mit 660 µl 100%igem iso-Propanol versetzt, die RNA 15 min mit 14.000g bei 4°C pelletiert, mit 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen, leicht getrocknet und in 200 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zur RNA-Lösung wurden 600 µl RNAMATRIX Binding Solution und 10 µl RNAMATRIX Slurry gegeben, kurz geschüttelt und 5 min in einem Rotation-Überkopfschüttler sanft inkubiert. Nach 10 s Zentrifugation wurde das Pellet mit 500 µl RNAMATRIX Wash Solution zweimal gewaschen. Der Überstand wurde restlos entfernt, das Pellet leicht getrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

3. RT-PCR-Reaktion

cDNA-Synthese

M-MLV RT (Promega)

Zu 3 µl (300 ng) isolierter RNA wurden 29 µl enzymfreier Reverse Transkriptase-Prämix (RT-Prämix) gegeben. Dieser bestand aus dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer, 0,5 mM dNTPs und dem sequenzspezifischen Primer (0,4 µM). Der Ansatz wurde 2 min auf 72°C erhitzt, auf RT abgekühlt, mit 0,5 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl, Promega) versetzt und 60 min bei 42°C inkubiert.

PCR

Für die sich anschließende PCR wurden jeweils 2 µl des cDNA-Ansatzes eingesetzt. Hinzugegeben wurden der konzentrierte Puffer der verschiedenen Hersteller (enthalten 1,5 mM MgCl₂), 0,4 µM jedes Primers, 0,2 mM dNTPs und eine Einheit Taq-Polymerase. Das Reaktionsvolumen betrug 25 µl.

Amplifikationsbedingungen für:

RedTaq Master Mix (Biozym):

Denaturierung: 94°C – 4 min; 35 Zyklen: 95°C -10 s, 65°C -20 s, 72°C -10 s.

SensiFastTMSYBR No-Rox Mix (BioCat):

Denaturierung: 94°C – 4 min; 35 Zyklen: 94°C – 10 s, 65°C – 20 s, 72°C – 20 s.

4. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von Plasmid-DNA, PCR-Fragmenten und Restriktionsansätzen wurden 1,0%ige Agarosegele in 1xTAE-Puffer verwendet. Die Auftrennung erfolgte in unterschiedlichen, mit 1xTAE Puffer gefüllten Standard-Horizontalkammern. Als Nukleinsäurefarbstoff diente Ethidiumbromid (0,1 µg/ml).

5. Lösungen und Puffersysteme

Bezeichnung	Reagenzien	Zusammensetzung
TAE (10x)	EDTA·Na ₂ ·2H ₂ O	2 M
	Eisessig	5,7%
	Tris	50 mM

6. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers Net GmbH (Ulm) synthetisiert und mittels HPLC gereinigt.

7. DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungsarbeiten wurden als Auftrag durch die Fa. Macrogen C. (Korea) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden nach Reinigung mit PeqGOLD Cycle-Pure Kit (Peqlab, VWR) unter Verwendung spezifischer Primer direkt sequenziert.

8. Sequenzanalyse und Primerentwicklung

Für die Sequenzanalyse und um geeignete spezifische Primer identifizieren zu können, war ein Sequenz Alignment durchzuführen. Dies erfolgte durch visuellen Abgleich mittels DNAsis Max (Hitachi Software Engineering Co., Ltd), Genrunner (Hastings Software, Inc), DNAMAN (Lynnon Biosoft) und NCBI BLAST. Die Auswahl der Primer erfolgte per Hand, wobei auf annähernd gleiche Schmelztemperaturen der Primerpaare geachtet wurde. Mittels Gradienten-PCR (gradientenfähiger Thermocycler, SensoQuest, Deutschland) wurden die Schmelztemperaturen der Primerpaare kontrolliert.

9. Primersequenzen

Alle Primer (für die cDNA Herstellung und für Standard-PCR/qualitative real time PCR) waren so gestaltet worden, dass sie bei den gewählten Bedingungen optimale Ergebnisse garantierten. Die Primersequenzen sind in den Tabellen 3 und 4 aufgelistet.

Tab.3. Reverse Primer für cDNA Präparation¹.

BNYVV-RNA	Primer-Name	Primer-Sequenz in 5'-3' Orientierung
RNA1	RNA1-Rv	³⁰³⁵ TCCCTGATAGGGTCAGCCA A ³⁰¹⁶
RNA2	RNA2- Rv	⁷²⁶ AGCAGCAGCTAATTGCTAT ⁷⁰⁸
RNA3	RNA3-Rv	¹⁵²⁷ CGGACGGGAACACCATGTAA ¹⁵⁰⁷
RNA4	RNA4-Rv	¹¹⁴⁰ CAAACCTTCGCCACCCTTC ¹¹²¹
RNA5	RNA5-Rv1	⁹³² CGGGGGACCAACAAACATCA ⁹¹³
SBWMV-RNA	Primer-Name	Primer-Sequenz in 5'-3' Orientierung
RNA2	PGRV4b	¹⁰⁶⁶ TAACCGCTTTGGGATGATAG ¹⁰⁴⁶

Tab.4. Primer für Standard-PCR/qualitative real time PCR/qPCR¹.

BNYVV-RNA	Primer-Name	Primer-Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Amplikon (bp)
RNA5	RNA5-Rv RNA5-Fw	⁹³² CGGGGGACCAACAAACATCA ⁹¹³ ²⁵⁹ GCCGCTTTTCCTTTGCGATT ²⁷⁸	674
RNA4	RNA4-Rv RNA4-Fw	¹¹⁴⁰ CAAACCTTCGCCACCCTTC ¹¹²¹ ⁷¹² TGCCCCGTGTTATAGTGGTG ⁷³¹	429
RNA3	RNA3-Rv RNA3-Fw	¹⁵²⁷ CGGACGGGAACACCATGTAA ¹⁵⁰⁷ ¹²⁶³ CACGGTGTTGCGGTGAGAAGA ¹²⁸²	265
RNA2	RNA2-Rv RNA2-Fw	⁷²⁶ AGCAGCAGCTAATTGCTAT ⁷⁰⁸ ²⁴⁶ ACAATCGCATGCTATGGACT ²⁶⁵	481
RNA1	RNA1-Rv RNA1-Fw	³⁰³⁵ TCCCTGATAGGGTCAGCCAA ³⁰¹⁶ ²⁶⁸⁴ TTGCGGAATTGTTGAGTGCG ²⁷⁰³	352
SBWMV-RNA	Primer-Name	Primer-Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Amplikon (bp)
RNA2	PGRV4b PGRV4a	¹⁰⁶⁶ TAACCGCTTTGGGATGATAG ¹⁰⁴⁶ ³⁸⁵ CTGCGACTCACGCTTACATA ⁴⁰⁵	681

¹ Die hochgestellten Zahlen bezeichnen die Nukleotidpositionen im jeweiligen RNA-Molekül.

VII. Wissenschaftliche Ergebnisse

Die Rizomania oder viröse Wurzelbärtigkeit der Zuckerrübe hat noch immer große wirtschaftliche Bedeutung. Hauptverursacher ist das *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), das jedoch sehr häufig als Mischinfektion mit dem *Beet soil-borne virus* (BSBV) und dem *Beet virus Q* (BVQ) auftritt. Auch wenn mit der Entwicklung toleranter Sorten und ihrem konsequenten Anbau der vom BNYVV verursachte Schaden weitgehend reduziert werden konnte, so bleibt das erhebliche Gefährdungspotenzial doch weiterhin bestehen. Es resultiert einerseits aus der Tatsache, dass durch die nur bedingt eingeschränkte Virusvermehrung in den toleranten Rüben das Infektionspotential des Bodens bei jedem Anbau erneuert wird und die virustragenden Dauersporen des plasmodiophoriden Vektors *Polymyxa betae* über Jahrzehnte im Boden vital und infektiös bleiben. Andererseits ist die züchterisch verfügbare genetische Basis für BNYVV-Toleranz auch heute noch sehr schmal. Der hierdurch permanent gegebene Selektionsdruck auf Viruspopulationen hat schon zu mehreren resistenzbrechenden Pathotypen des Virus geführt. Nach Infektion mit diesen Pathotypen reagieren auch tolerante Sorten mit erheblichen Ertragsverlusten.

Für Winterweizen gilt grundsätzlich das Gleiche. Das sich in Deutschland immer weiter ausbreitende *Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV) wird ausschließlich durch *Polymyxa graminis* auf die Pflanzen übertragen. Bei beiden Kulturarten gibt es keine Resistenz gegen den Vektor. Die einzige verfügbare Resistenz (Sbm1) gegen SBWMV im Weizen ist ebenfalls sehr schmal. Sie ist im aktuellen Weizensortiment noch kaum vertreten. Da es sich um eine sogenannte Translokationsresistenz handelt, kommt es auch in Sbm1-Pflanzen zur Virusvermehrung in der Wurzel und damit zur Regenerierung des Infektionspotenzials im Boden. Allerdings erfolgt kein Übergang des Virus von der Wurzel in oberirdische Pflanzenteile. Aufgrund der Parallelität im Infektionsmechanismus wurde neben der Rübe auch das Pathosystem Weizen-SBWMV in die Machbarkeitsstudie einbezogen.

Mit dem Vorhaben sollte abgeklärt werden, ob das Rhamnolipid-Präparat ‚Rhapynal‘ (Fa. Biotensidon GmbH) und auch Süßholzextrakt (LE - von Liquorice extract, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Fa. Trifolio-M GmbH) in der Lage ist, die Infektion von Zuckerrüben und Winterweizen mit bodenbürtigen Viren deutlich zu verzögern bzw. zu reduzieren. Damit könnten die besonders ertragsmindernden Frühinfektionen vermieden oder deutlich abgeschwächt werden.

Ausgangspunkt war die Behandlung (Inkubation) von Saatgut unter verschiedenen Bedingungen. Nach der Aussaat in virushaltige Befallserde und Kultur in der Klimakammer wurden die Pflanzenentwicklung wiederholt bewertet und Pflanzenwurzeln entnommen. Diese wurden mit qualitativer und quantitativer PCR auf das Vorhandensein der Viren (BNYVV, BVQ, BSBV, SBWMV) getestet.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Zuckerrübe - BNYVV - *Polymyxa betae*

Rübensamen der toleranten Sorten „Lisanna“ (KWS) und „Hannibal“ (Strube) sowie des anfälligen Genotyps „MS 133E15250“ (Strube) wurden sowohl in pillierter als auch in unpillierter Form eingesetzt.

Vor der Einsaat wurden sie mit den Biowirkstoffen bei RT wie folgt inkubiert:

1. Rhapynal (unverdünnt, 200 g/l)
2. Rhapynal (1:1 mit Wasser verdünnt, 100 g/l)
3. Rhapynal (1:10, 20 g/l)
4. Rhapynal (1:100, 2 g/l)
5. LE (unverdünnt, 50%, w/v)
6. LE (1:10 mit Wasser verdünnt, 5%, w/v).

Die Inkubationsdauer betrug jeweils

- 15 min
- üN.

Für die Referenzkontrollen (Wasserkontrollen) wurde das entsprechende Saatgut in Wasser inkubiert (15 min bzw. üN).

Das behandelte Saatgut wurde in BNYVV-Befallserde von folgenden Standorten mit charakterisiertem Verseuchungsgrad eingesät (pro Variante 8 Töpfe mit jeweils 3 Samen in 10 Wiederholungen):

- Pithiviers (Frankreich, resistenzbrechender P-Pathotyp des BNYVV mit 5 genomischen RNAs)
- Mintraching (Deutschland, nicht resistenzbrechender B-Pathotyp mit 4 genomischen RNAs)

Die Kultur der Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer. Vier, 5, 6, 7, 8 und 9 Wochen nach Einsaat (WnE) wurden pro Variante aus jeweils 8 Töpfen die 3 Sämlinge (total 24

Sämlinge/Variante) entnommen und die Rübenwurzeln ausgewaschen und vereinigt. Anschließend wurde aus diesen Wurzeln in zwei Wiederholungen (Inkubationsvarianten 1 - 6 plus jeweilige Wasserkontrolle) die Gesamt-RNA extrahiert. Daraus wurden im nächsten Schritt in einem Multiplex-Format pro RNA-Isolation 2 cDNA-Präparate für alle 5 BNYVV-RNAs parallel synthetisiert. Damit wurden pro Inkubationsvariante 4 parallele cDNA-Präparate für die nachfolgende PCR-Analyse hergestellt. Der Nachweis des BNYVV in den beprobten Wurzeln erfolgte mittels qualitativer PCR und Biozym RedTaq Mix (Biozym) als Mastermix. Anschließend wurden alle BNYVV-Genomkomponenten (RNA 1-5 bzw. RNA 1-4) in den Wurzeln aller Biowirkstoff-Varianten und den Wurzeln der Wasserkontrollen mittels qPCR in jeweils 5 bis 7 Replikaten auch quantifiziert (ct-Werte stets als Mittelwerte). Hierfür kam das BioCat SensiFast™ SYBR No-Rox® Kit zum Einsatz.

Die PCR-Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung von Saatgut beider Sorten mit Rhapynal zu einer deutlichen Hemmung der BNYVV-Vermehrung in den Rübenwurzeln führte.

Abbildungen 1, 2 zeigen die Ergebnisse exemplarisch für „Lisanna“ in der Behandlungsvariante 1 (Erde Mintraching). Das galt gleichermaßen für Erde Pithiviers (Abb. 3, 4).

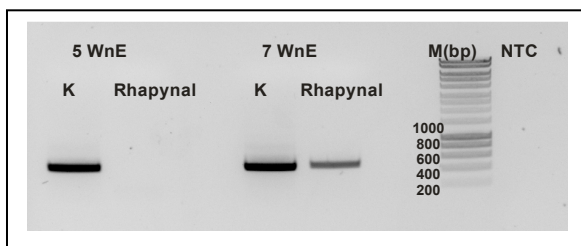


Abb. 1: Elektrophoretische Kontrolle nach qPCR für BNYVV-RNA2 in Rübenwurzeln nach Saatgutinkubation üN in Wasser (K) sowie in unverdünntem ‘Rhapynal’ (Variante 1), Sorte „Lisanna“, Befallserde Mintraching. NTC –no template control.

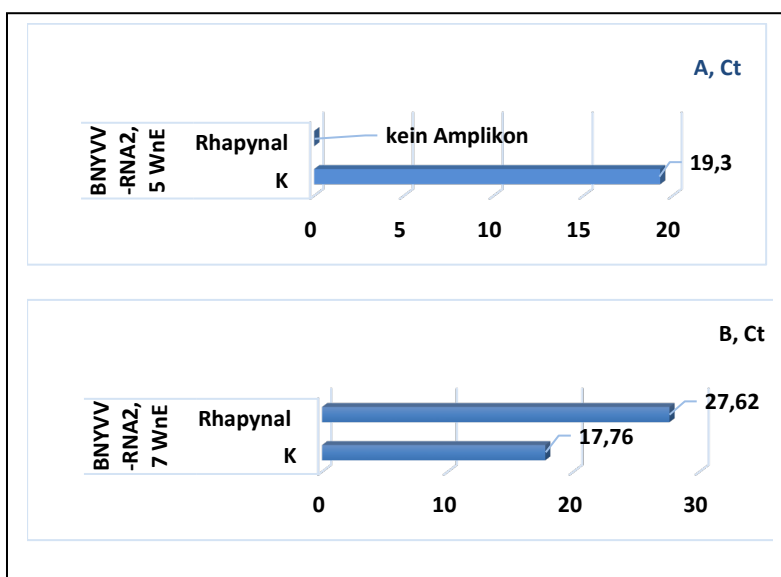


Abb. 2: Quantifizierung der BNYVV-RNA2 5 WnE (A) und 7 WnE (B) in Rübenwurzeln nach Saatgutinkubation üN mit Wasser (K) und in unverdünntem ‘Rhapynal’. Sorte „Lisanna“, Befallserde Mintraching.

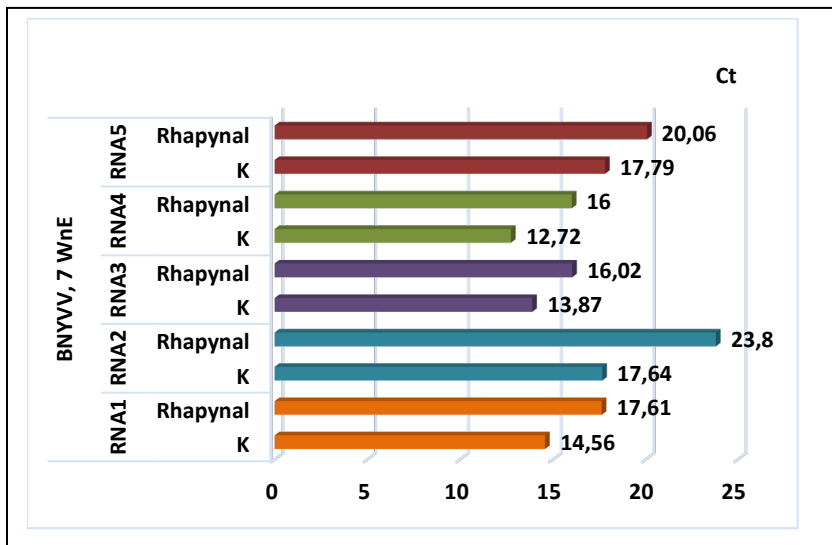


Abb. 3: Quantifizierung der BNYVV-RNAs 7 WnE in Rübenwurzeln nach 15 min Saatgutinkubation in Wasser (K) bzw. unverdünntem 'Rhapynal'. Sorte „Lisanna“, Befallserde Pithiviers.

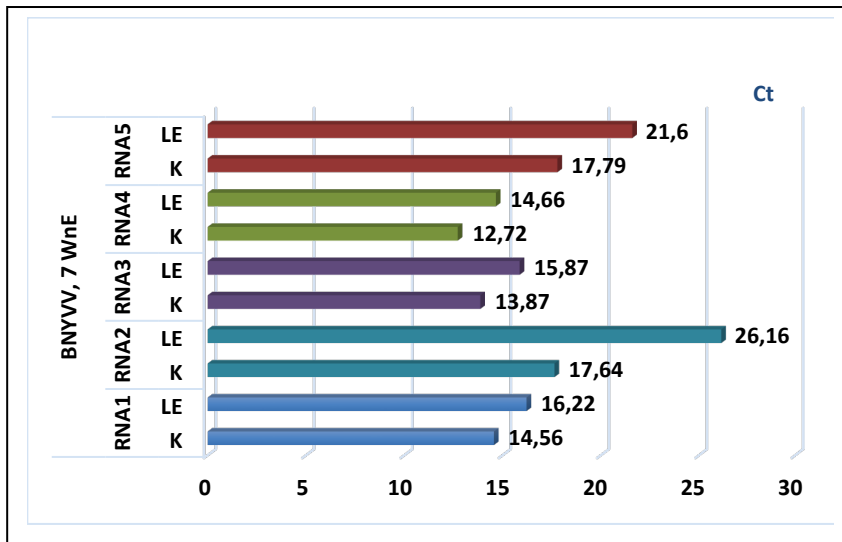


Abb. 4: Quantifizierung der BNYVV-RNAs 7 WnE in Rübenwurzeln nach 15 min Saatgutinkubation in Wasser (K) bzw. unverdünntem LE. Sorte „Lisanna“, Befallserde Pithiviers.

Während die Sämlinge der Wasserkontrolle bereits 4 WnE stark infiziert waren, konnte in den Rhapynal-Varianten auch 5 WnE noch kein BNYVV nachgewiesen werden. Erste Spuren des Virus zeigten sich dort erst 6 WnE. Eine Woche später (7 WnE) war das Virus-Amplikon im Agarosegel sichtbar (Abb.1). Nach qPCR (Abb. 2) war in dieser Variante der ct-Wert 7 WnE 10 Einheiten (Zyklen) höher als in der entsprechenden Wasserkontrolle, d.h. die Viruskonzentration in den Wurzeln der Kontrollpflanzen war ca. 1000fach höher als in den Rhapynal-behandelten Rüben. Für den Nachweis wurde zunächst ein RNA2-spezifisches Amplikon gewählt, das einem Teil des Hüllproteingens entspricht.

In den Behandlungsvarianten 1 und 5 (Rhapynal bzw. LE, unverdünnt, 15 min) wurden alle BNYVV-RNAs quantifiziert und die ct-Wert Differenzen gegenüber der Wasserkontrolle bestimmt. Die Ergebnisse 7 WnE werden wiederum exemplarisch für „Lisanna“ gezeigt (Abb. 3, 4). Die ct-Werte lassen erkennen, dass es schon nach 15 min Inkubation zu einer deutlichen Infektionshemmung kommt.

Die LE-Experimente mit kurzer Inkubationszeit (Variante 5, 15 min) zeigten vergleichbare Ergebnisse wie die Experimente mit Rhapynal (Variante 1, 15 min). Die Konzentrationsunterschiede (Differenz der ct-Werte, Δct) der einzelnen BNYVV-RNAs gegenüber dem jeweils entsprechenden Genomfragment in der Kontrollvariante betragen:

Variante 1

$\Delta ct = 2$ (RNA3, RNA5)

$\Delta ct = 3$ (RNA1, RNA4)

$\Delta ct = 6$ (RNA2)

Variante 5

$\Delta ct = 2$ (RNA1, RNA3, RNA4),

$\Delta ct = 4$ (RNA5)

$\Delta ct = 8$ (RNA2)

Auch in der Variante 2 (Rhapynal, 1:1 verdünnt, $\ddot{u}N$) war eine deutliche infektionshemmende Wirkung zu beobachten, In den Sämlingen der Sorte „Lisanna“ konnten auch 5 WnE noch keine Virus-RNAs nachgewiesen werden (Abb. 5).

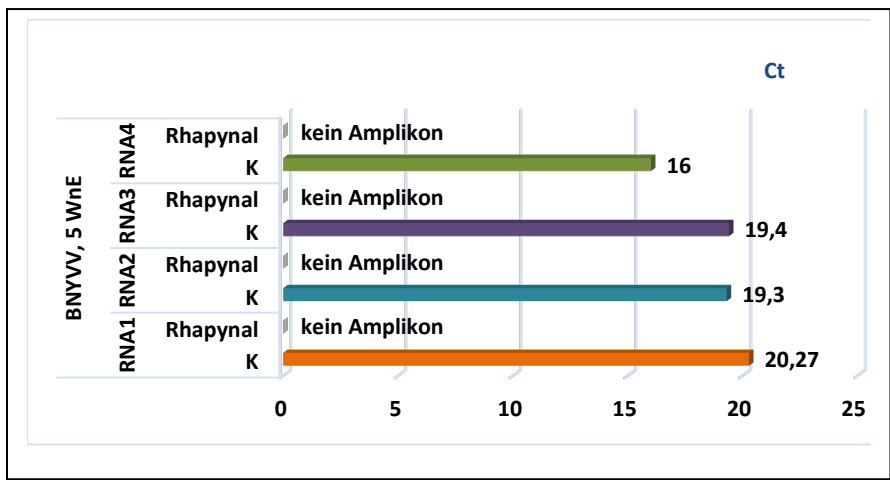


Abb. 5: Quantifizierung der BNYVV-RNAs 5 WnE in Rübenwurzeln nach Saatgutinkubation $\ddot{u}N$ in Wasser (K) bzw. in 1:1 verdünntem ‘Rhapynal’ (Variante 2). Sorte „Lisanna“, Befallserde Mintraching.

Zwei Wochen später (7 WnE) betragen die Unterschiede der viralen RNAs 7 bis 10 Einheiten. Das entspricht noch immer einem 128 bis 1000fach höheren Virusgehalt in der Wasserkontrolle im Vergleich zu den behandelten Proben (Abb. 6).

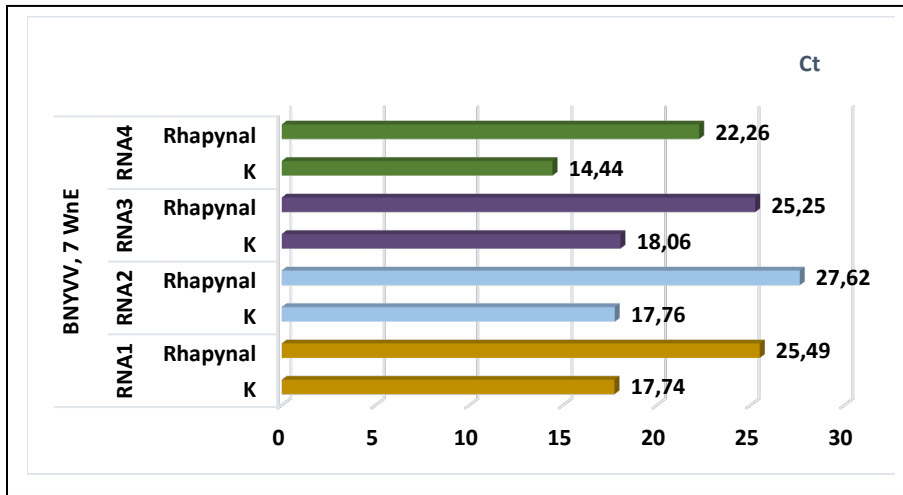


Abb. 6: Quantifizierung der BNYVV-RNAs 7 WnE in Rübenwurzeln nach Saatgutinkubation üN in Wasser (K) bzw. in 1:1 verdünntem ‘Rhapynal’ (Variante 2). Sorte ‘Lisanna’, Befallserde Mintraching.

In einem nächsten Schritt wurde die Wirksamkeit von Rhapynal und LE in höheren Verdünnungsstufen (Variante 3 und 4) nach Saatgutinkubation (üN) der tolerante Sorte ‘Hannibal’ getestet (Abb. 7). Als Befallserde diente Pithiviers. Targets für die qPCR waren die RNA2 und RNA3. Während bei der 1:10 Verdünnung noch schwache Unterschiede zur Wasserkontrolle erkennbar waren, blieb die 1:100 Verdünnung ohne hemmenden Effekt.

In der Variante 6 (LE, 1:10 verdünnt, üN) konnte 7 WnE die RNA3 mittels qPCR nachgewiesen werden mit einer ct-Differenz zur Wasserkontrolle von 9 Einheiten. Das entspricht einer um den Faktor 512 geringeren Viruskonzentration in den LE-behandelten Pflanzen.

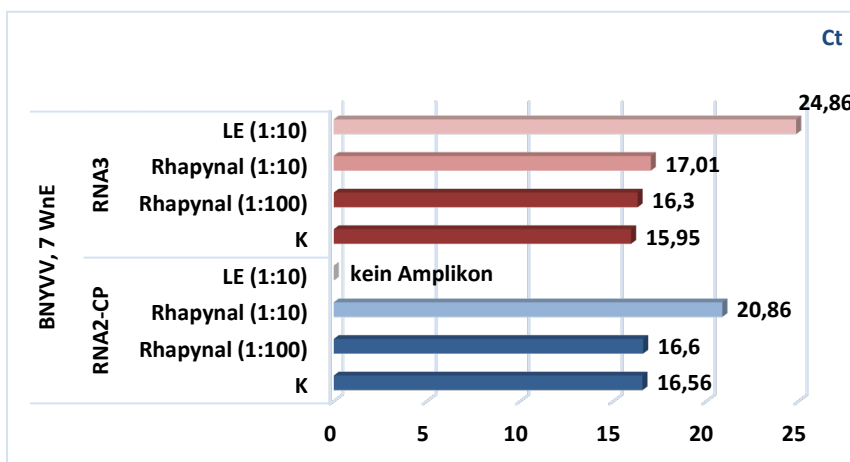


Abb. 7: Quantifizierung der RNA 2 und RNA 3 des BNYVV 7 WnE in Rübenwurzeln nach Saatgutinkubation üN in Wasser (K), in verdünntem (1:10, 1:100) ‘Rhapynal’ und in 1:10 verdünntem LE, Sorte ‘Hannibal’. Befallserde Pithiviers.

Die Ergebnisse belegen das deutliche Potenzial von Rhapynal und Süßholzextrakt, die frühe Vermehrung des BNYVV in Rübenwurzeln nach natürlicher Übertragung durch *P. betae* zu hemmen.

Neben dem BNYVV als Hauptverursacher gehören zum Rizomania-Komplex auch das *Beet virus Q* (BVQ) und das *Beet soil-borne virus* (BSBV), deren Bedeutung für das Krankheitsgeschehen jedoch als wesentlich geringer eingeschätzt wird. Dennoch wurde mit Rhapynal in den Varianten 1 (1:1, üN) für die Kombination „Lisanna“/Erde Mintraching und den Varianten 3 (1:10, üN) und 4 (1:100, üN) auch die Vermehrung dieser beiden Viren in den Rübenwurzeln analysiert. Mittels qRT-PCR wurde 4 WnE und 8WnE die Konzentration der BVQ-RNA2 und der BSBV-RNA3 ermittelt (Abb. 8, 9). Die Differenz der ct-Werte gegenüber der jeweiligen Wasserkontrolle betragen 5 bis 6, was eine 32fach bzw. 64fach geringere Viruskonzentration in den Rhapynal-behandelten Pflanzen bedeutet. Analog zum BNYVV blieb die 1:100 Verdünnung ohne Effekt auf die Vermehrung von BVQ und BSBV in den Rübenwurzeln.

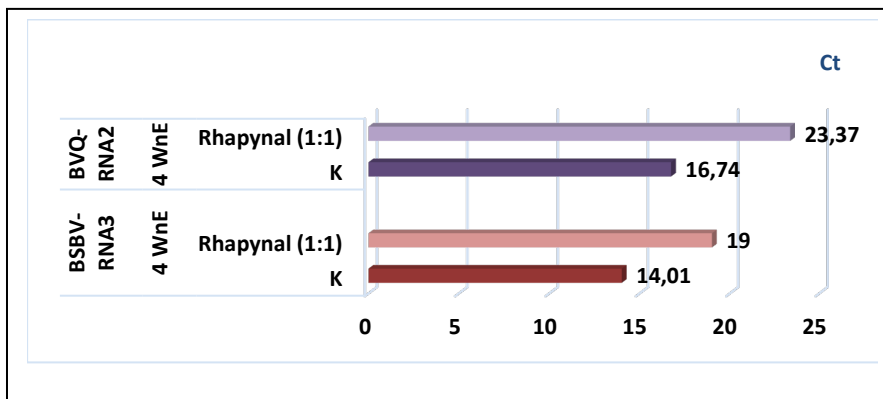


Abb. 8: Quantifizierung der BVQ-RNA2 und BSBV-RNA3 4 WnE in Rübenwurzeln nach Saatgutinkubation üN in Wasser (K) und 1:1 verdünntem ‘Rhapynal’, Sorte „Lisanna“, Befallserde Mintraching.

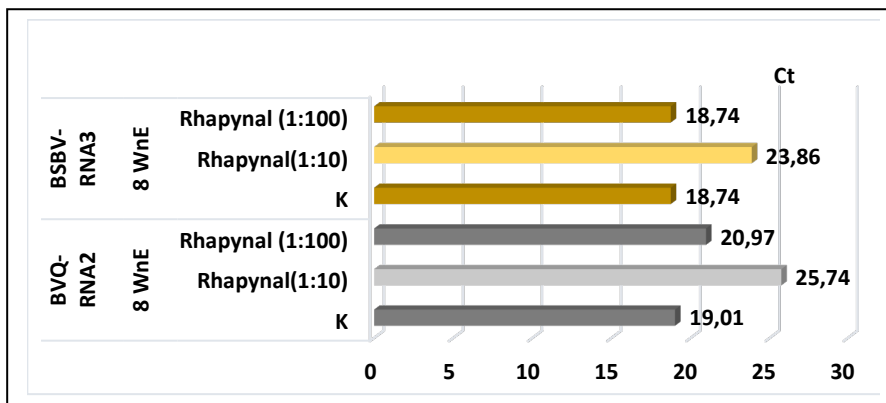


Abb. 9: Quantifizierung der BVQ-RNA2 und BSBV-RNA3 8 WnE in Rübenwurzeln nach Saatgutinkubation üN in Wasser (K) und verdünntem (1:10, 1:100) ‘Rhapynal’, Sorte „Hannibal“, Befallserde Mintra

Zwischen pilliertem und unpilliertem toleranten Saatgut gab hinsichtlich der Replikationshemmung durch ‚Rhapynal‘ keine wesentlichen Unterschiede. Ein Beispiel dieser

Untersuchungen ist in Abbildung 10 dargestellt. Wieder zeigt die Variante 4 (1:100, üN) keine immunstimulierende Wirkung von Rhapynal auf die Sämlinge. Demgegenüber war in der Variante 3 (1:10, üN) 9 WnE die Konzentration der BNYVV-RNA4 und –RNA3 in den behandelten Sämlingen ca. 1000fach geringer als in der Wasserkontrolle.

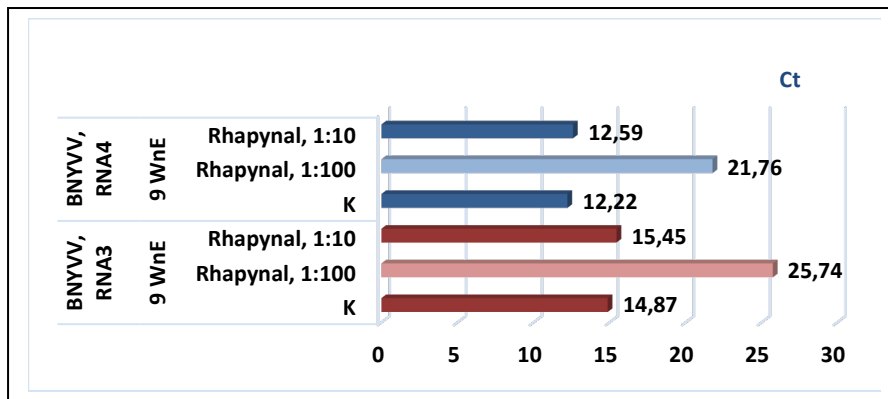


Abb. 10: Quantifizierung der RNA 3 und RNA 4 des BNYVV 9 WnE in Rübenwurzeln nach Inkubation von unpilliertem Saatgut üN in Wasser (K) und in verdünntem (1:10, 1:100) ‘Rhapynal’, Sorte ‘Hannibal’, Befallserte Pithiviers.

Phytotoxizität von Rhapynal und LE

In allen Versuchsvarianten wurde neben der Replikationshemmung auch der Einfluss der Biowirkstoffe auf die Keimungsrate und die Pflanzenentwicklung untersucht. Unverdünnt eingesetzt reduzierten sowohl Rhapynal als auch LE die Keimungsrate bei pilliertem Saatgut schon nach kurzer Einwirkdauer erheblich, bis auf 37% (Variante 1, 15 min) und bis auf 7% (Variante 5, 15 min).

Für Rhapynal führte bereits die 1:1 Verdünnung mit Wasser (Variante 2) zu einer deutlich höheren Keimungsrate. Sie lag nach Inkubation üN bei 70%. Das unpillierte Saatgut reagierte deutlich empfindlicher auf die entsprechenden Behandlungen. So wurde nach üN-Inkubation von unpillierten Samen der Sorte ‘Lisanna’ in 10% LE die Keimung vollständig gehemmt. Demgegenüber keimten unter den gleichen Bedingungen 65% der pillierten Samen.

Für Rhapynal in 1:10 und 1:100 Verdünnung (Variante 3 und 4) sowie für LE als 1:10 Präparat (Variante 5) wurden nach üN-Inkubation keine Unterschiede im Auflaufverhalten der Sorten ‘Lisanna’ und ‘Hannibal’ im Vergleich zur Wasserkontrolle beobachtet. Die Keimungsraten erreichten 100%.

Um phytotoxische Effekte durch die Saatgutbehandlung mit den Biowirkstoffen so weit wie möglich auszuschließen und dennoch eine gute Hemmung der Virusvermehrung zu erzielen, mussten im nächsten Schritt die Parameter Inkubationsdauer und Konzentration des

Biowirkstoffs optimiert werden. Nach umfangreichen Untersuchungen haben sich folgende Kombinationen als optimal erwiesen:

- Rhapynal: 1:5 bis 1:10 Verdünnung in Wasser, 8 h Inkubation der Samen bei RT
- LE: 1:10 Verdünnung in Wasser, 8 h Inkubation bei RT

In der Abbildung 11 werden Ergebnisse für beide Wirkstoffe am Beispiel von „Lisanna“, „Hannibal“ und „MS 133E15250“ exemplarisch für RNA4 als Target für die Konzentrationsbestimmung dargestellt. Die Differenz der ct-Werte der beiden Sorten zur jeweiligen Wasserkontrolle betrug 5 WnE jeweils ca. 5 Einheiten (Faktor 32). Der anfällige Genotyp verhielt sich vergleichbar.

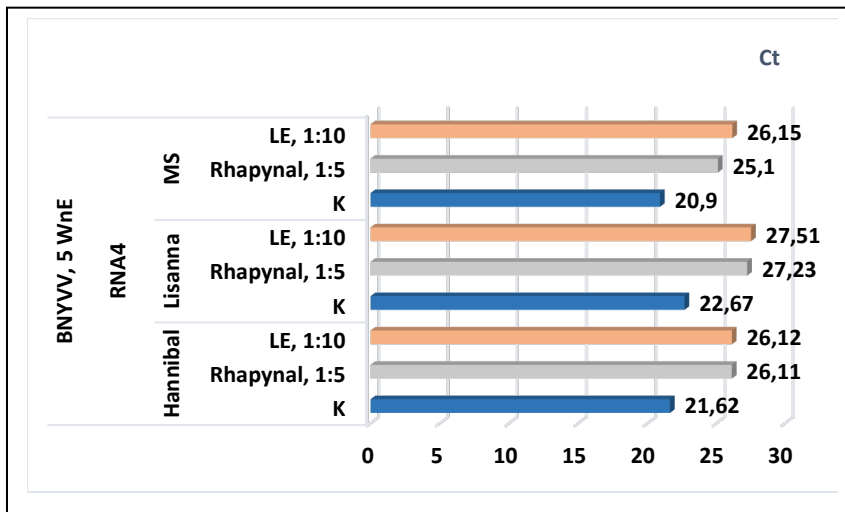


Abb. 11: Quantifizierung der RNA 4 des BNYVV 5 WnE in Rübenwurzeln der Sorten „Lisanna“ und „Hannibal“ sowie des Genotyps „MS133E15250“ nach 8 h Saatgutinkubation in Wasser (K), 1:5 verdünntem ‘Rhapynal’ und 1:10 verdünntem LE, Befallserde Pithiviers.

Winterweizen – Soil-borne wheat mosaic virus (SBWMV) - Polymyxa graminis

Zum Einsatz kamen die SBWMV-anfälligen Sorten „Alcedo“, „Reflection“, „Kamerad“ und „Chevignon“ sowie die resistente Sorte „Cadenza“.

Winterweizensamen der Sorten „Alcedo“ und „Reflection“ wurden vor der Einsaat üN bei RT mit den Biowirkstoffen in folgenden Varianten inkubiert:

1. ‘Rhapynal’ (1:1 mit Wasser verdünnt, 100 g/l)
2. ‘Rhapynal’ (1:10, 20 g/l)
3. ‘Rhapynal’ (1:100, 2 g/l)
4. LE (1:10 mit Wasser verdünnt, 5%, w/v)
5. LE (1:100, 0,5% w/v)

Als Kontrolle dienten üN in Wasser inkubierte Samen (Wasserkontrolle). Das behandelte Saatgut (ca. 30 Körner pro Topf/4 Töpfe pro Variante) wurde in SBWMV-Befallserde vom Standort Elxleben (Deutschland) eingesät.

Die Kultur der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus. Neun, 11, 13 und 14 WnE wurden Weizensämlinge (total 25 bis 30 Sämlinge/Variante) aus den Töpfen entnommen. Aus den gewaschenen Wurzeln wurde für jede Behandlungsvariante plus Wasserkontrolle in drei Wiederholungen die Gesamt-RNA extrahiert. Im nächsten Schritt wurden mit jeder RNA-Isolation zwei RNA2-spezifische cDNA-Präparate synthetisiert (total 6 cDNAs pro Variante). Der Virusnachweis in den Wurzeln erfolgte mittels qualitativer PCR und Biozym RedTaq Mix (Biozym) als Mastermix. Anschließend wurde SBWMV in allen Wurzelproben mittels qPCR in jeweils 3 bis 5 Replikaten auch quantifiziert. Hierfür kam das BioCat SensiFast™ SYBR No-Rox® Kit zum Einsatz.

Nach Behandlung des Saatguts der Sorten „Alcedo“ und „Reflection“ mit ‘Rhapynal’ entsprechend Variante 1 (1:1) konnte auch 9 WnE mittels quantitativer PCR noch kein Virus in den Wurzeln der Sämlinge nachgewiesen werden, während die Pflanzen der Wasserkontrolle stark infiziert waren. Allerdings reduzierte diese Biowirkstoffkonzentration die Keimungsrate um 50%. In den Varianten 2 (1:10) und 3 (1:100) betrug die Keimungsrate jeweils 100%. Die Analyse der Wurzelproben der Variante 2 mittels quantitativer PCR zeigte für „Alcedo“ 9 WnE nur sehr schwache Spuren des Virus, während in den „Reflection“-Wurzeln sowohl nach quantitativer als auch qualitativer PCR kein SBWMV nachweisbar war. Demgegenüber war in der Variante 3 (1:100) die Viruskonzentration 9 WnE gegenüber der jeweiligen Wasserkontrolle für beide Sorten nur etwas geringer (ct-Differenz 2-3) (Abb. 12).

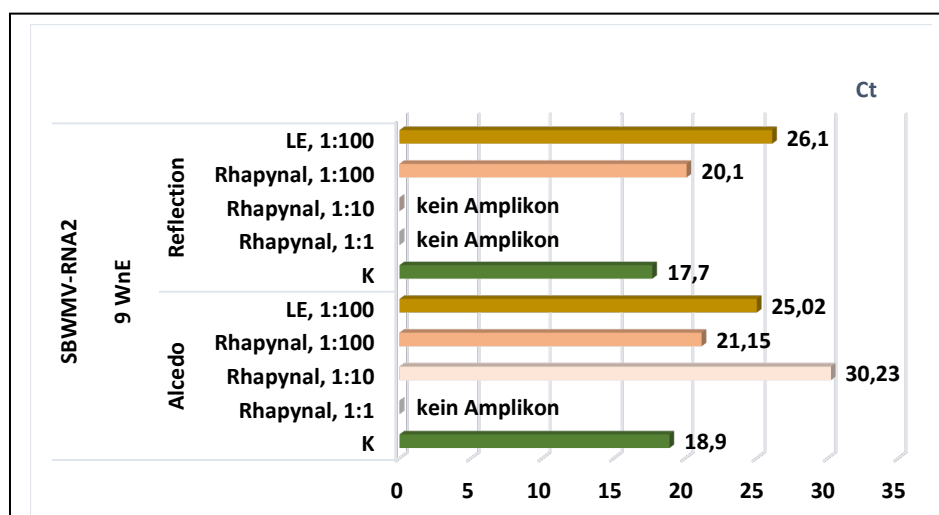


Abb. 12: Quantifizierung der SBWMV-RNA2 in Weizenwurzeln nach Saatgutinkubation üN in Wasser (K), ‘Rhapynal’ (1:1, 1:10, 1:100 verdünnt) und LE (1:100) 9 WnE, Sorten „Alcedo“ und „Reflection“.

Die Behandlung von Saatgut der Sorten „Alcedo“ und „Reflection“ mit LE (Variante 4; 1:10) bewirkte eine totale Keimungshemmung sowohl in SBWMV-haltiger als auch in virusfreier Einheitserde. Im Unterschied hierzu war in der Variante 5 (LE, 1:100) kein negativer Effekt auf Keimung und Pflanzenentwicklung zu beobachten. Die Viruskonzentration in den Wurzeln beider Weizensorten wurde 9 WnE ermittelt. Hierfür wurde wiederum das Fragment der RNA2 amplifiziert. Zu diesem Zeitpunkt war der ct-Wert in der LE-Variante von „Alcedo“ 7 Einheiten (Zyklen) höher als in der Wasserkontrolle. Für die Sämlinge der Sorte „Reflection“ betrug der Unterschied zur Wasserkontrolle sogar 9 Einheiten (Abb. 12).

Um Behandlungsparameter zu optimieren, wurde in einem weiteren Experiment der virushemmende Effekt von ‘Rhapynal’ in 1:10 und 1:50 Verdünnung auf die Sorten „Reflection“, „Kamerad“ und „Chevignon“ bestimmt. Die Inkubationszeit betrug wiederum 9 h. Die Ergebnisse für „Chevignon“ 11 WnE (Δ ct 11 Einheiten) und 14 WnE (Δ ct 4,5 Einheiten) belegen eine starke Hemmung der SBWMV-Vermehrung nach Saatgutbehandlung mit 1:10 verdünntem ‘Rhapynal’ (Abb. 13). Im Agarosegel waren 11 WnE nur Spuren des Amplikons zu sehen (Abb. 14).

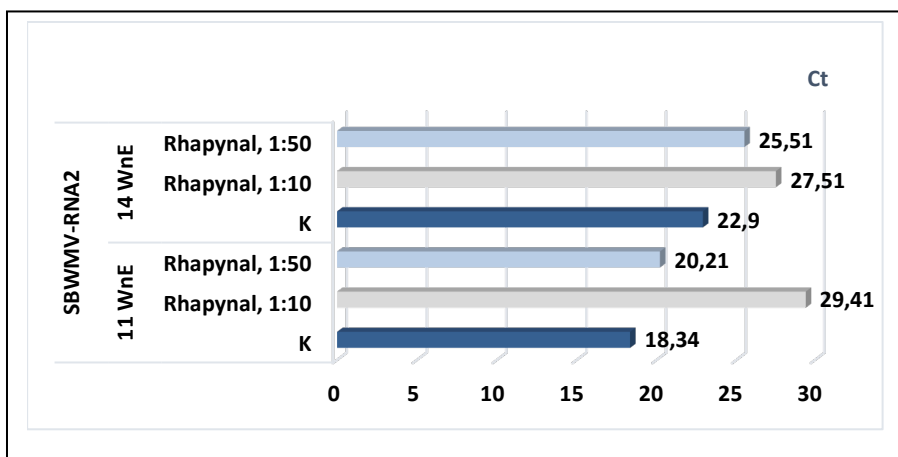


Abb. 13: Quantifizierung der SBWMV-RNA2 in Weizenwurzeln nach 9 h Saatgutinkubation in Wasser (K) und in verdünntem ‘Rhapynal’ (1:10, 1:50) 11 WnE und 14 WnE, Sorte „Chevignon“.

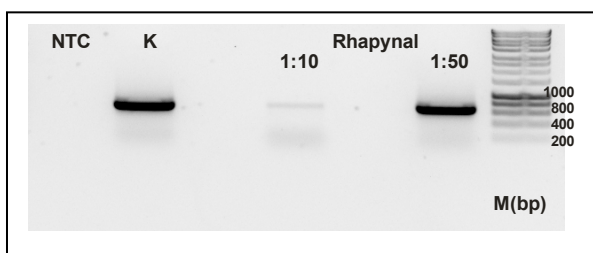


Abb. 14: Elektrophoretische Kontrolle nach qPCR für SBWMV-RNA2 11 WnE in Weizenwurzeln nach 9 h Saatgutinkubation in Wasser (K) und verdünntem ‘Rhapynal’ (1:10, 1:50), Sorte „Chevignon“, NTC –no template control.

Für die Sorten „Reflection“ und „Kamerad“ wurden 11 WnE unter diesen Bedingungen keine Amplifikationsprodukte erhalten (Abb. 15, 16). Die 1:50 Verdünnung des ‘Rhapynal’ hatte eine deutlich geringere Hemmwirkung.

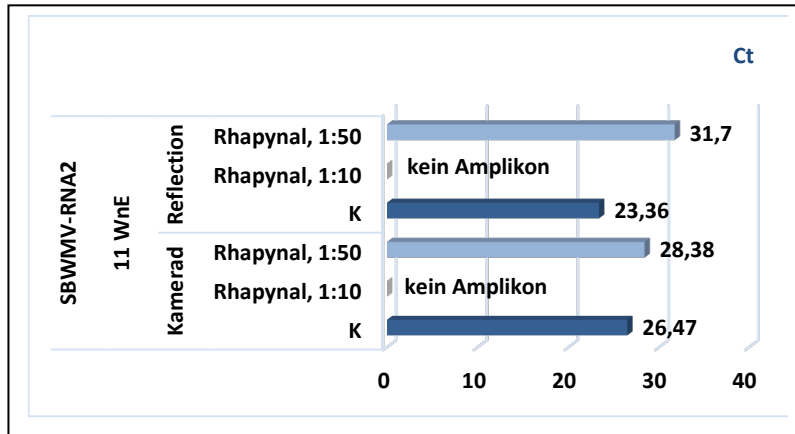


Abb. 15: Quantifizierung der SBWMV-RNA2 11 WnE in Weizenwurzeln nach 9 h Saatgutinkubation in Wasser (K) und in verdünntem ‘Rhapynal’ (1:10, 1:50), Sorten „Kamerad“ und „Reflection“.

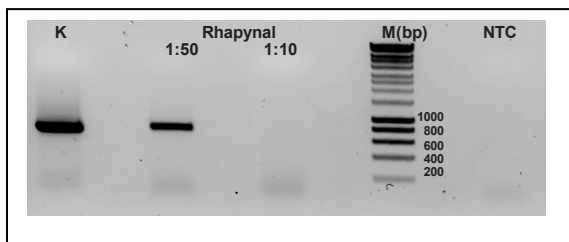
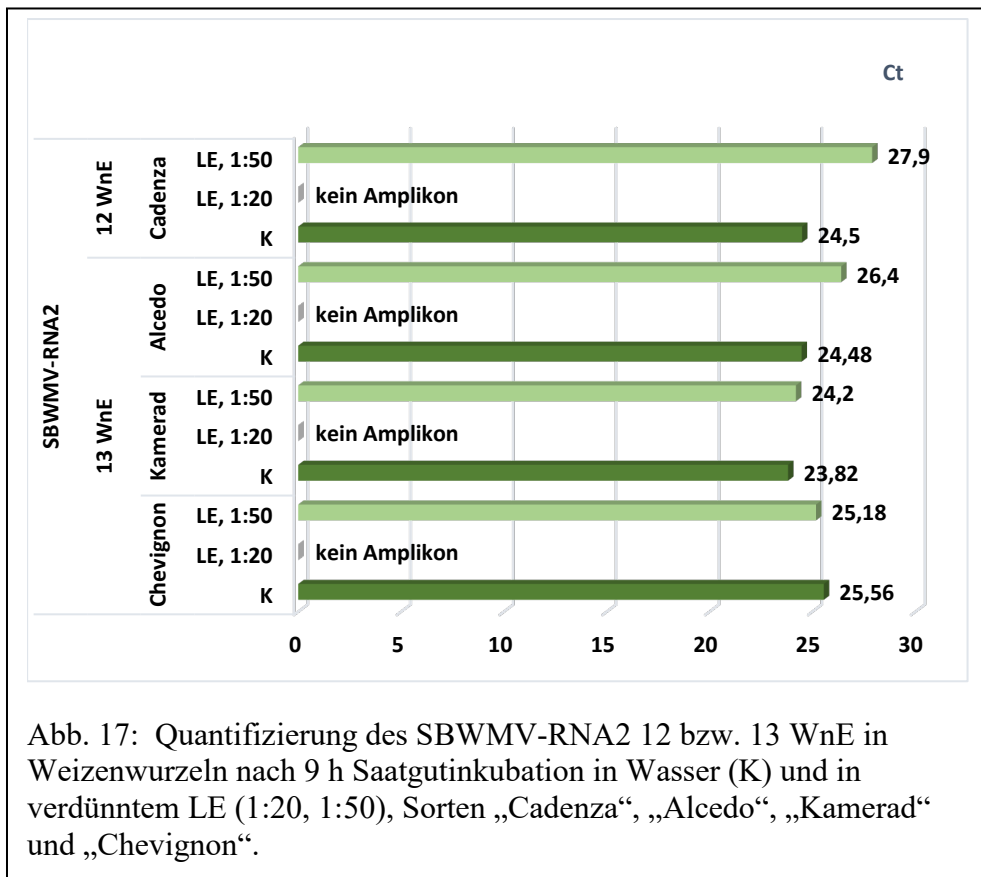


Abb. 16: Elektrophoretische Kontrolle nach qPCR für SBWMV-RNA2 11 WnE in Weizenwurzeln nach 9 h Saatgutinkubation in Wasser (K) und verdünntem ‘Rhapynal’ (1:10, 1:50), Sorte „Chevignon“. NTC – no template control.

In einem weiteren Experiment wurde Saatgut der Sorten „Alcedo“, „Reflection“, „Chevignon“, „Kamerad“ und „Cadenza“ 9 h in verdünntem LE (1:20, 1:50) sowie in Wasser (Wasserkontrolle) inkubiert. 12 WnE („Cadenza“) und 13 WnE (alle anderen Sorten) wurde die Viruskonzentration bestimmt (Abb. 17). Mittels qPCR waren bei der 1:20 Verdünnung keine PCR-Produkte nachweisbar, 1:50 verdünntes LE hatte demgegenüber nur einen geringen virushemmenden Effekt.

Damit haben sich die Verdünnungen 1:10 für ‘Rhapynal’ und 1:20 für LE mit 9 h Saatgutinkubation bei RT als optimal zur Hemmung der SBWMV-Vermehrung in den Weizensämlingen erwiesen, ohne negative Effekte auf Keimungsrate und Pflanzenentwicklung.



Pflanzenentwicklung nach Behandlung mit den Bio-Stoffen

Zusätzlich zum Arbeitsprogramm wurde in der Machbarkeitsstudie sowohl bei Zuckerrübe als auch Winterweizen mit Untersuchungen zum Auflaufverhalten und zur Pflanzenentwicklung nach Saatgutbehandlung mit den beiden Biowirkstoffen begonnen. Dazu wurde das Rübensaatgut 8 h jeweils in ‘Rhapynal’ (1:5 Verdünnung) bzw. LE (1:10) und das Weizensaatgut 9 h jeweils in ‘Rhapynal’ (1:10 Verdünnung) bzw. LE (1:20) inkubiert und mit der entsprechenden Wasserkontrolle in Befallserde eingesät. Die Rübensämlinge wuchsen in einer Klimakammer, der Weizen im Gewächshaus. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (WnE) wurden jeweils 5 Pflanzen gezogen und die Wachstumsrate der Sämlinge sowie ihr Habitus/Erscheinungsbild bonitiert. Hierfür wurden die Blattmasse sowie Wurzelparameter ermittelt. Als Parameter der Wurzelentwicklung diente bei der Rübe die Trockenmasse und Länge der Wurzel, beim Weizen waren es Trockenmasse, Länge und Dichte des Wurzelsystems. Alle Messwerte wurden gemittelt.

Die positiven Effekte der Biowirkstoffe wurden schon in der frühen Phase der Wurzelentwicklung sichtbar. So war die Wurzel trockenmasse von Rübenpflanzen der BNYVV-toleranten Sorten „Lisanna“ und „Hannibal“ sowie des anfälligen Genotypes „MS133E15250“ 6 WnE in Erde aus Mintraching deutlich größer als in der jeweiligen Wasserkontrolle. Nach ‘Rhapynal’-Behandlung war sie 1,5-2fach erhöht, in der LE-Variante war das Bild ähnlich (Abb.18).

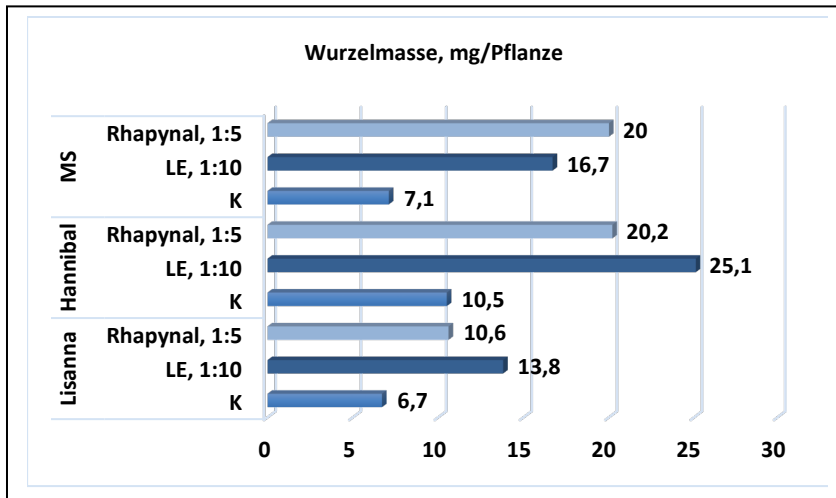


Abb. 18: Wurzel trockenmasse von Zuckerrübenpflanzen 6 WnE nach 8 h Saatgutinkubation in Wasser (K), verdünntem ‘Rhapynal’ (1:5) und in LE (1:10).

Die Biowirkstoffe führen auch zu längeren Rübenwurzeln. Die Abbildungen 19 und 20 zeigen exemplarisch Sämlinge von „MS33E15250“ und „Hannibal“ nach Inkubation des Saatguts mit ‘Rhapynal’ bzw. LE 9 WnE im Vergleich zur Wasserkontrolle. Die Einsaat war in Erde aus Pithiviers erfolgt.



Abb. 19: Wurzellänge von Rübensämlingen („MS133E15250“) 9 WnE nach 8 h Saatgutinkubation in Wasser (K), verdünntem LE (1:10, P1) und ‘Rhapynal’ (1:5, P2).



Abb. 20: Wurzellänge von Rübensämlingen („Hannibal“) 9 WnE nach 8 h Saatgutinkubation in Wasser (K) und verdünntem ‘Rhapynal’ (1:5, P).

Neben längeren Wurzeln bildeten die Pflanzen auch mehr Blattmasse. Diese wurde 14 WnE, 20 WnE, 24 WnE und 29 WnE ermittelt und mit der jeweiligen Wasserkontrolle verglichen. Abbildung 21 und 22 und zeigen die Ergebnisse für „Lisanna“ und „Hannibal“ nach Saatgutbehandlung mit 1:10 verdünntem LE bzw. ‘Rhapynal’ (1:5). Abbildung 23 enthält die Ergebnisse für „MS133E15250“.

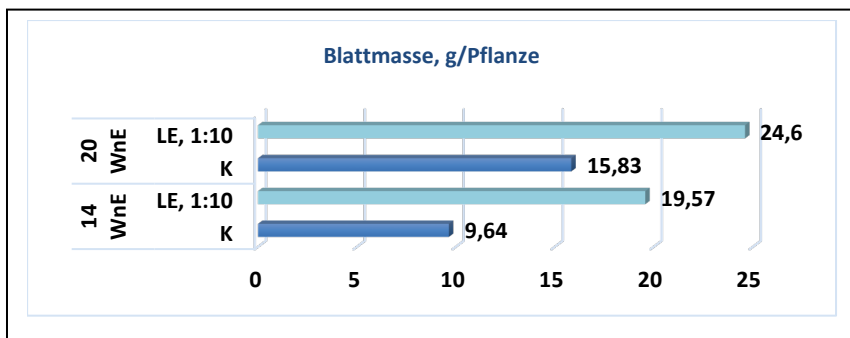


Abb. 21: Blattmasse von Rübenpflanzen der Sorten „Hannibal“ (14 WnE) und „Lisanna“ (20 WnE) nach 8 h Saatgutinkubation in Wasser (K) und in LE (1:10).

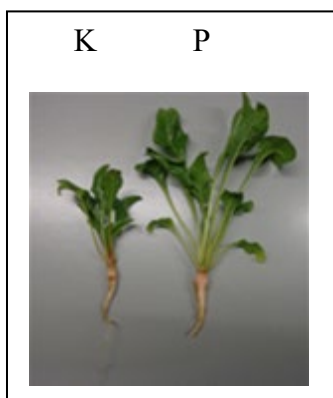


Abb. 22: Habitus von Rübenpflanzen der Sorte „Lisanna“ 24 WnE nach 8 h Saatgutinkubation in Wasser (K) und ‘Rhapynal’ (1:5, P).

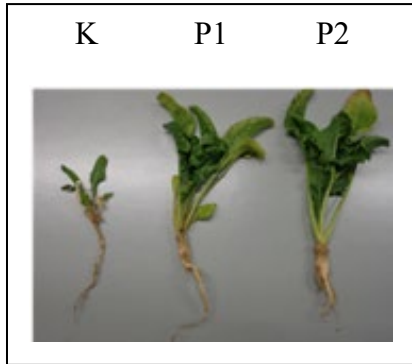


Abb. 23: Habitus von Rübenpflanzen des Genotyps „MS133E15250“ 24 WnE nach 8 h Saatgutinkubation in Wasser (K), LE (1:10, P1) und ‘Rhapynal’(1:5, P2).

Zum Ende der Wachstumsversuche 29 WnE zeigte sich ein deutlich positiver Effekt in den Behandlungsvarianten gegenüber den Wasserkontrollen (Abb. 24). Wiederum bildeten Rübenpflanzen, die sich aus behandelten Saatgut entwickelt hatten, kräftigere Wurzelsysteme sowie eine größere Körper- und Blattmasse.



Abb. 24: Habitus von Rübenpflanzen der Sorte „Hannibal“ 29 WnE nach 8 h Saatgutinkubation in Wasser (K), und LE (1:10, P).

Die Inkubation von Winterweizensaatgut mit den Biowirkstoffen zeigte ähnliche Wirkung wie für die Rübe. Alle eingesetzten Sorten bildeten eine größere Wurzelmasse (Abb. 25) und längere Wurzeln als die Wasserkontrollen.

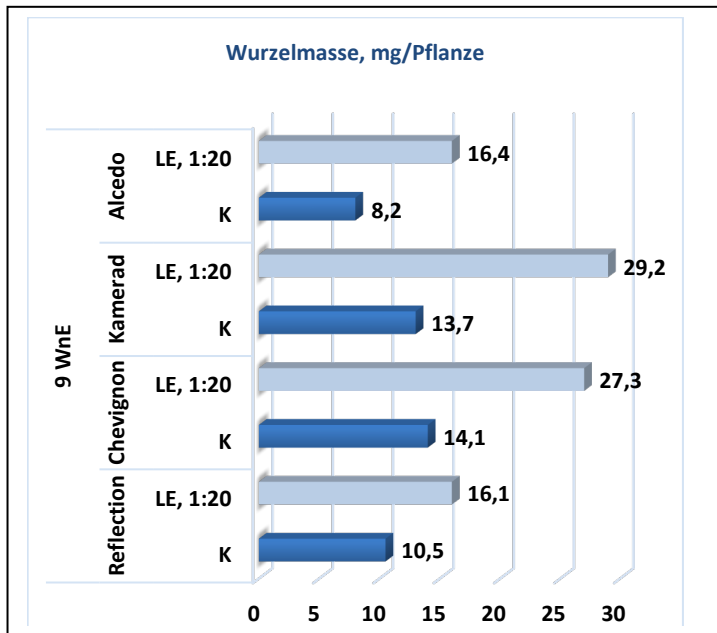


Abb. 25: Wurzeltrockenmasse von Weizensämlingen der Sorten „Alcedo“, „Kamerad“, „Chevignon“ und „Reflection“ 9 WnE nach 9 h Saatgutinkubation in Wasser (K) und verdünntem LE (1:20).

Ab 7 WnE wurden die Unterschiede in der Wurzellänge sichtbar und diese Tendenz setzte sich mit der weiteren Pflanzenentwicklung fort. Die Abbildungen 26 und 27 zeigen exemplarisch die Ergebnisse für die Sorten „Reflection“ und „Chevignon“ 7 WnE und Saatgutinkubation mit ‘Rhapynal’ (1:10) bzw. LE (1:20).



Abb. 26: Wurzellänge von Weizensämlingen („Reflection“) 7 WnE nach 9 h Saatgutinkubation in Wasser (K) und verdünntem ‘Rhapynal’ (1:10, P).

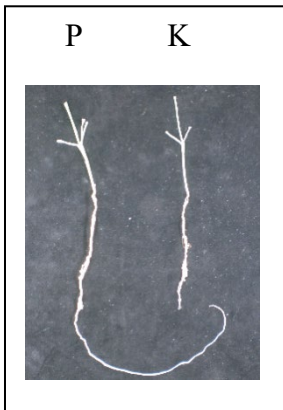


Abb. 27: Wurzellänge von Weizensämlingen („Chevignon“) 7 WnE nach 9 h Saatgutinkubation in Wasser (K) und verdünntem LE (1:20, P).

Abbildung 28 zeigt die Situation für „Reflection“ 9 WnE. Auch 14 WnE hatten die behandelten Weizenpflanzen noch längere Wurzeln als die Wasserkontrollen.

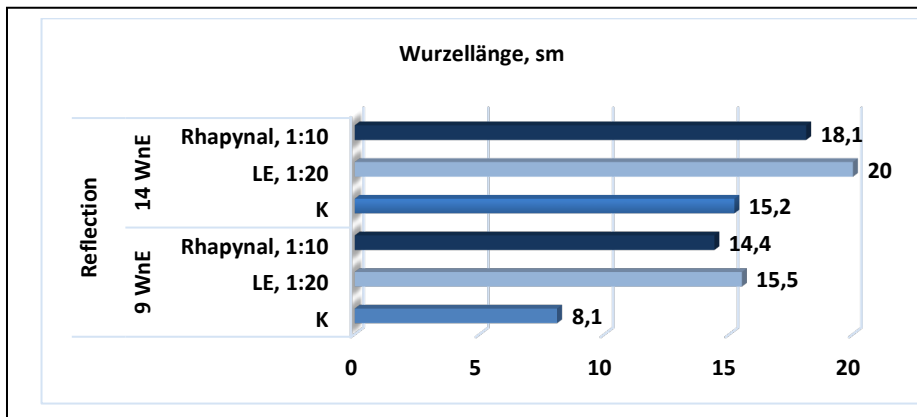


Abb. 28: Wurzellänge von Weizensämlingen („Reflection“) 9 WnE und 14 WnE nach 9 h Saatgutinkubation in Wasser (K), verdünntem LE (1:20) und ‚Rhapynal‘ (1:10).

Abbildung 29 zeigt für „Chevignon“ den Vergleich der Wurzelichten zwischen den Pflanzen nach Saatgutbehandlung mit ‚Rhapynal‘ (1:10) bzw. LE (1:20) und der Wasserkontrolle.

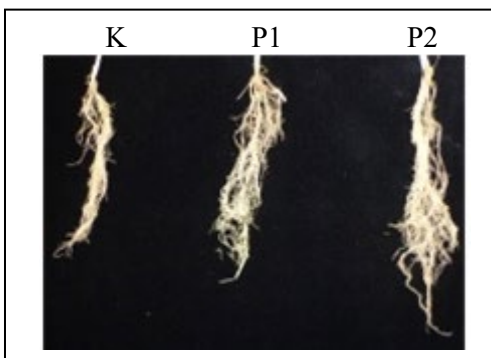


Abb. 29: Wurzelhabitus von Weizensämlingen („Chevignon“) 20 WnE nach 9 h Saatgutinkubation in Wasser (K), verdünntem LE (1:20, P1) und ‚Rhapynal‘ (1:10, P2).

Die bisher in der Machbarkeitsstudie unter kontrollierten Bedingungen (Gewächshaus, Klimakammer) erzielten Ergebnisse zeigen sehr überzeugend, dass mit Hilfe der beiden Biowirkstoffe eine deutliche zeitliche Verzögerung der Vermehrung des BNYVV in Rübensämlingen, des SBWMV in Winterweizenpflanzen erreicht werden kann. Sollten sich dieser Schutzeffekt unter Freilandbedingungen bestätigen, wäre das von großer wirtschaftlicher Relevanz, da erfahrungsgemäß gerade Frühinfektionen zu einem hohen Schadmaß und damit substantiellen Ertrags- und Qualitätseinbußen führen. Gleichzeitig würde damit auch ein tragfähiges Fundament für die nachfolgende Erforschung der replikationshemmenden Wirkmechanismen von ‘Rhapynal’ und Süßholzextrakt in den Pflanzen geschaffen werden. Die Kenntnis dieser Mechanismen könnte neue Optionen zur weiteren Steigerung der Wirkeffektivität in den genannten Pathosystemen ermöglichen. Außerdem läge nahe, die Schutzwirkung der beiden Biowirkstoffe bei weiteren, ebenfalls durch bodenbürtige Viren bedrohten Kulturarten (Gerste, Roggen, Triticale) zu erforschen.