

Zahra Sabet^{1*}, Jacqueline Franke², Tanja Heise¹

Entwicklung einer innovativen biologischen Strategie gegen Spätfrostschäden im Obst- und Weinbau

¹ Berliner Hochschule für Technik, Luxemburger Straße 10, 13353 Berlin, Deutschland;
z.sabet@fu-berlin.de, tanja.heise@bht-berlin.de

² Hochschule für Technik und Wirtschaft Berlin, Treskowallee 8, 10318 Berlin, Deutschland;
jacqueline.franke@HTW-Berlin.de

* Korrespondenz: Lehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau und Arboristik e. V.,
Obstbau-Versuchsstation Müncheberg (OBVS); obvs@lvga-bb.de



DGG-Proceedings 2025, Vol. 13

Short Communications – Peer Reviewed, Open Access

Deutsche Gartenbauwissenschaftliche Gesellschaft e. V. (DGG)

German Society for Horticultural Science

www.dgg-online.org

Annual Conference DGG and BHGL

26.02.-01.03.2025, Essen, Germany

Entwicklung einer innovativen biologischen Strategie gegen Spätfrostschäden im Obst- und Weinbau

Zahra Sabet¹, Jacqueline Franke², Tanja Heise¹

¹ Berliner Hochschule für Technik, Deutschland

² Hochschule für Technik und Wirtschaft Berlin, Deutschland

Abstract

Spätfröste führen weltweit zu erheblichen Ernteverlusten, verstärkt durch klimabedingte Frühjahrsverschiebungen. Ziel des Projekts INNOFrost ist die Entwicklung eines biologischen Frostschutzes auf Basis natürlich vorkommender eiskernaktiver Bakterien der Klasse II (INA II), die erst bei Temperaturen unter -4 °C Eiskristalle bilden. Diese Bakterien könnten herkömmliche Frostschutzverfahren ökologisch und ökonomisch sinnvoll ergänzen. Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 235 Bakterienisolate aus Pflanzenproben von Obst- und Weinbaukulturen gewonnen, von denen 16 eine Eiskernbildung bei Temperaturen unter -4 °C zeigten. Erste Pathogenitätstests an Erdbeerblättern ergaben keine phytotoxischen oder pathogenen Effekte. Eine molekularbiologische Charakterisierung der relevanten Stämme befindet sich aktuell in der Bearbeitung. Die bisherigen Ergebnisse unterstreichen das Potenzial von INA-II-Bakterien als nachhaltige Alternative zur Spätfrostprävention im Obst- und Weinbau.

1. Einleitung

Spätfrostereignisse verursachen regelmäßig erhebliche Ernteverluste, insbesondere im Obst- und Weinbau. In den Jahren 2017 und 2024 beliefen sich die Verluste europaweit auf mehrere Millionen Euro (Andreas und Kunz 2019; BMEL 2024). Besonders betroffen waren die deutschen Anbaugebiete am Bodensee, an der Mosel und in Rheinhessen. Herkömmliche Schutzmaßnahmen wie Frostberegung, Paraffin-Kerzen oder Windmaschinen sind kostenintensiv, aufwendig und ökologisch bedenklich (Andreas und Kunz 2019).

Ein alternativer Ansatz basiert auf der gezielten Nutzung mikrobieller Prozesse. Bestimmte Bakterien, insbesondere *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola* und *Xanthomonas*, können durch Eisnukleationsproteine (INAP) in ihrer Zellmembran Eiskristalle auf Pflanzenoberflächen initiieren (Lindow 1983; Hirano und Uppur 2000). Während Klasse-I-Stämme bereits bei -1 °C aktiv werden, zeigen Klasse-II-Stämme eine deutliche spätere Eisbildung (-6 bis -10 °C) (Morris et al. 2014; Vali 1995) und gelten daher als potenziell schadlos gegenüber Spätfrost. Frühere biotechnologische Ansätze wie Frostban (ein gentechnisch veränderter „Eis-minus-Stamm“) scheiterten an gesellschaftlicher Akzeptanz (Lindow et al. 1987). Das Projekt INNOFrost verfolgt daher einen natürlichen, nicht gentechnischen Ansatz.

Ziel ist es, geeignete Bakterienstämme aus natürlichen Quellen zu isolieren, hinsichtlich ihrer Eiskernaktivität und Pathogenität zu charakterisieren und deren Einsatzpotenzial als biologisches Frostschutzmittel in Labor- und Freilandversuchen zu erproben.

2. Material und Methoden

Probenahme

Das Pflanzenmaterial wurde im Frühjahr 2021 (Rheinland-Pfalz) und 2024 (Brandenburg, OBVS Müncheberg) aus Obst- und Weinbauanlagen entnommen. In Müncheberg erfolgte die Probenentnahme sowohl vor als auch nach Frostereignissen. Die Auswahl der Standorte erfolgte unter Berücksichtigung des erhöhten Risikos für Spätfröste. Es wurden ausschließlich oberirdische, grüne Pflanzenteile wie Blätter, Blüten und Knospen gesammelt und je nach Standort und Sorte weiterverarbeitet (siehe Tabelle 1 und Abbildung 1 A, B).

Tabelle1: Übersicht über die gesammelten Pflanzenproben von 2021 und 2014.

Probenahme-Datum	Standort	Pflanzenname	Sorte
10.04.24 / 25.04.24	Müncheberg	Apfel (<i>Malus domestica</i>)	Gala Alvina (Bio.)
10.04.24 / 25.04.24	Müncheberg	Apfel (<i>Malus domestica</i>)	Gala Alvina (Konv.)
10.04.24 / 25.04.24	Müncheberg	Birne (<i>Pyrus communis</i>)	Conference
10.04.24 / 25.04.24	Müncheberg	Kirsche (<i>Prunus avium</i>)	Kordia
05.05.21	Rheinland-Pfalz	Apfel (<i>Malus domestica</i>)	Elstar
05.05.21	Rheinland-Pfalz	Kirsche (<i>Prunus avium</i>)	Kordia
05.05.21	Rheinland-Pfalz	Aprikose (<i>Prunus armeniaca</i>)	—
05.05.21	Rheinland-Pfalz	Pflaume (<i>Prunus domestica</i>)	—
05.05.21	Rheinland-Pfalz	Weinrebe (<i>Vitis vinifera</i>)	Riesling
05.05.21	Rheinland-Pfalz	Weinrebe (<i>Vitis vinifera</i>)	Dornfelder

Legende:

Bio. = biologischer Anbau gemäß EU-Öko-Verordnung

Konv. = konventioneller Anbau unter Einsatz synthetischer Pflanzenschutz- und Düngemittel

Isolierung und Vorselektion von INA-Bakterien

Die Isolierung der epiphytischen Bakterien erfolgte nach dem Verfahren von Lindow et al. (1982) auf Nährstoffagar (NA + 2,5 % v/v Glycerin; NAG) sowie King's B Medium. Die Vorselektion auf Eiskernaktivität wurde mit der Replica-Freezing-Methode bei -8 °C durchgeführt (Lindow et al. 1978), basierend auf der Replica-Plating-Technik nach Lederberg und Lederberg (1952). Dabei wurden Bakterienkolonien von den Nährmedien mit einem sterilen, leinentuchbedeckten Stempel auf eine auf -8 °C temperierte Eisplatte übertragen. Bereiche mit erkennbarer Eiskristallbildung wurden als Indikator für Eiskernaktivität gewertet. Material aus den Eisbildungszonen wurde entnommen, in NAG-Medium angereichert und zur Gewinnung reiner Kulturen bei -20 °C aufbewahrt. Diese Reinkulturen bildeten die Grundlage für nachfolgende Analysen.

Bestimmung der Eiskernbildungsaktivität (Droplet-Freezing-Methode)

Die Eiskernaktivität wurde mittels Droplet-Freezing Methode nach Vali (1971), modifiziert durch Lindow et al. (1982), quantifiziert. Positivkontrollen (*P. syringae* pv. *morsprunorum*, DSM 50302) und Negativkontrollen (Steril destilliertes Wasser) wurden parallel geführt. Von jeder Suspension wurden zehn Tropfen à 10 µL (10⁴ Zellen/mL) auf eine Eisplatte aufgetragen (Abb. 1 D). Die Tropfen wurden schrittweise abgekühlt (0 °C bis -10 °C) und auf Eiskristallbildung beobachtet. Die am niedrigsten gefrorenen Tropfen wurden in Nährmedium überführt und weiterkultiviert.

Pathogenitätstest an Erdbeerblättern

Die Pathogenität ausgewählter INA-Bakterien wurde mittels Blattscheibentests nach Brinkmann (2002) untersucht. Die Inokulation von Erdbeerblättern erfolgte mit 20 μ L Bakterien-suspension und bei der Kontrolle mit Nährmedium (NAG) pro Blattscheibe (Abb. 1 E). Die Inokulation erfolgte zentral auf jedem Blattsegment. Alle Versuche wurden unter sterilen Bedingungen in einer Cleanbench durchgeführt. Arbeitsmaterialien wurden durch Autoklavieren (Gitterformen, Filter, Pipettenspitzen, Glaswaren) sterilisiert.

Molekularbiologische Analysen

Für Bakterienstämme mit hoher INA-Aktivität wurde die genomische DNA (gDNA) mittels eines kommerziellen Extraktionskits isoliert. Die Qualität und Quantität der gDNA wurde mit einem Qubit-Fluorometer (Quantifizierung), einem Tecan-Mikroplattenleser (Reinheit) sowie durch Pulsed-Field-Gelelektrophorese (Fragmentlänge) überprüft. Anschließend erfolgte eine Long-Read-Sequenzierung mittels MinION-Sequenzierer (Oxford Nanopore Technologies) unter Verwendung des Rapid Barcoding Kits (Abb. 1 F).

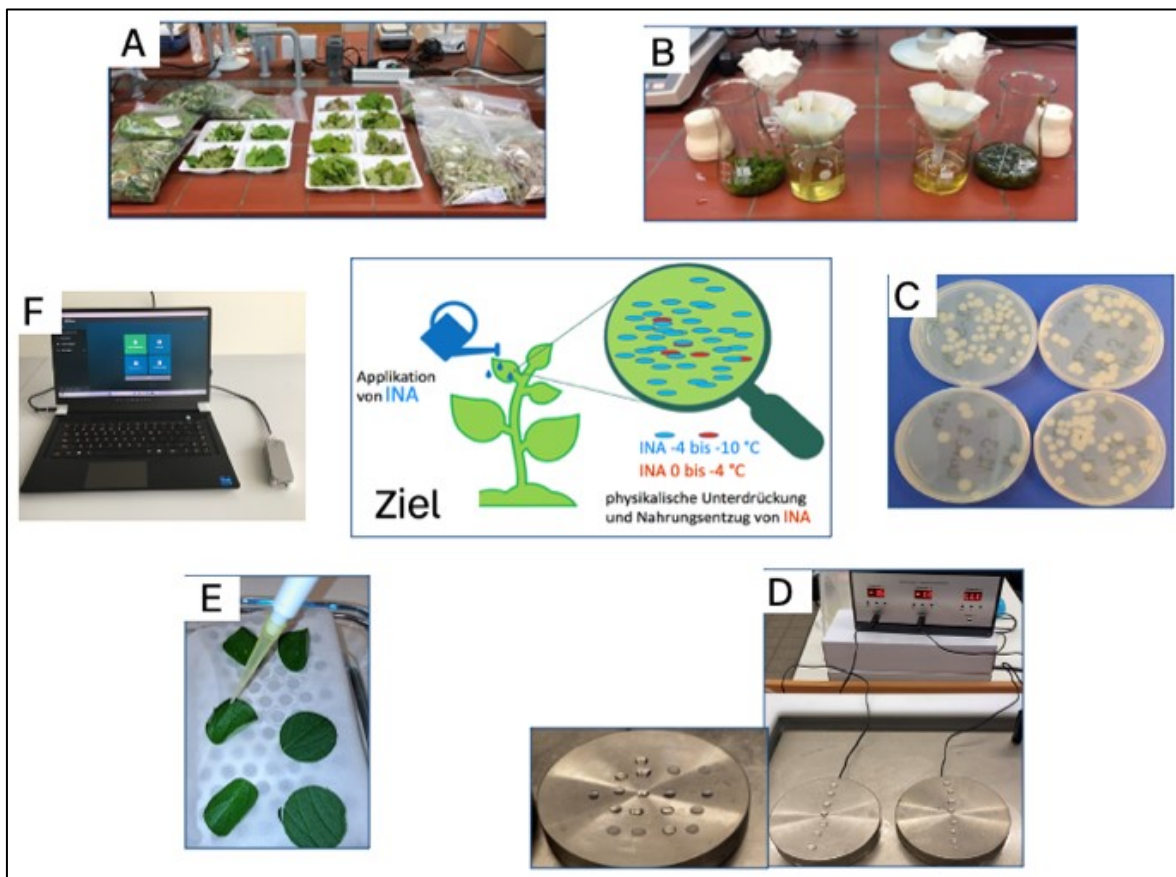


Abbildung 1: Übersicht des Arbeitsablaufs von der Probenentnahme bis zur molekularbiologischen Analyse. A: Probenentnahme von Blättern während der Spätfrostperiode; B: Isolierung von epiphytischen Bakterien; C: Vorselektion durch Replica-Freezing-Methode bei -8 °C; D: Klassifizierung durch Droplet-Freezing-Methode (-0 °C bis -10 °C); E: Pathogenitätstest an Erdbeerblättern; F: DNA-Extraktion und Qualitätskontrolle

3. Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen des INNOFrost-Projekts wurden insgesamt 235 Bakterienisolate aus pflanzlichem Oberflächenmaterial aus Rheinland-Pfalz (2021) und Brandenburg (2024) gewonnen und mittels Replica-Freezing-Methode vorselektiert (Lindow et al. 1978). Anschließend erfolgte eine Klassifikation der Eiskernaktivität durch die Droplet-Freezing-Methode (Lindow et al. 1978, Vali 1971), wobei 16 Stämme im Temperaturbereich zwischen -4 °C und -8 °C eine Eiskernbildung zeigten. Diese Ergebnisse weisen auf eine Zugehörigkeit zur Klasse II (INA II) hin, deren Vertreter typischerweise erst bei niedrigeren Temperaturen aktiv werden und damit unter Spätfrostbedingungen als potenzielle biologische Pflanzenschutzmittel gelten (Turner et al. 1990).

Die Einordnung als INA II basiert auf dem differenzierten Temperaturspektrum der Eisnukleation. Wie Lukas et al. (2022) zeigen, wird die Eisnukleationsaktivität maßgeblich durch die Aggregationsform und die funktionelle Einbettung der Ice-Nucleation-Proteine (INPs) in die Bakterienmembran bestimmt. Diese Erkenntnisse spiegeln sich auch in den Ergebnissen des Projekts wider. Die visuell erfassten Gefriertemperaturen der Tropfen zeigten eine gewisse Streuung, was die Limitationen der Methode unterstreicht. Um die Aussagekraft zu erhöhen, wurde ergänzend eine objektive Temperaturmessung mit Datenloggern (Typ-K-Thermoelemente, PCE-T 1200) eingeführt. Erste Validierungen mit definierten NaCl-Verdünnungen bestätigten die Zuverlässigkeit dieser Methode zur Erfassung des exakten Gefrierzeitpunkts anhand der freigesetzten Kristallisationswärme. Eine vergleichende Messung der 16 als INA-Stämme identifizierten Bakterien-Isolate (Droplet-Freezing) sind in Planung.

Zur Abschätzung der Phytopathogenität der identifizierten INA-Isolate wurde ein standardisierter Blattscheibentest an Erdbeerpflanzen durchgeführt. Keines der getesteten Isolate zeigte innerhalb von vier Tagen spezifische Symptome wie Nekrosen, Chlorosen oder Gewebeaufbruch. Die gelegentlich beobachteten Randverfärbungen entsprachen bekannten Artefakten mechanischer Verletzungen beim Scheibenschnitt (Brinkmann 2002). Eine erhöhte Anfälligkeit für opportunistische Sekundärinfektionen konnte in Einzelfällen beobachtet werden, war aber nicht auf die inokulierten Bakterien zurückzuführen. Diese Ergebnisse bestätigen die bisherige Einschätzung, dass die getesteten INA-II-Stämme keine pathogenen Effekte aufweisen.

Von den 16 eiskernaktiven Stämmen wurden 12 einer weiterführenden molekular-biologischen Analyse unterzogen. Die extrahierte genomische DNA wies ausreichende Konzentration ($2,2\text{-}3,0\text{ ng}/\mu\text{L}$) und Integrität auf (Fragmentgröße $> 30\text{ kbp}$), um für Long-Read-Sequenzierungen mittels Oxford Nanopore (MinION) verwendet zu werden. Die bioinformatische Analyse zur taxonomischen Einordnung ist derzeit in Entwicklung und wird durch eine eigene Pipeline unterstützt. Bereits jetzt deutet sich an, dass die untersuchten Stämme gramnegative und auch grampositive Vertreter umfassen. Das ist ein Hinweis auf die mikrobielle Diversität funktionaler INA-Stämme (Failor et al. 2022, Schwidetzky et al. 2023).

4. Schlussfolgerung

Die bisherigen Ergebnisse des INNOFrost-Projekts zeigen, dass natürlich vorkommende INA-II-Bakterien ein hohes Potenzial als biologische Frostschutzmittel im Obst- und Weinbau besitzen. Ihre Eiskernaktivität setzt erst bei Temperaturen zwischen -4 °C und -8 °C ein, wodurch sie bei typischen Spätfrostbedingungen voraussichtlich keine Schäden durch

Spätfrost verursachen, im Gegensatz zu pathogenen INA-I-Stämmen wie *Pseudomonas syringae*, die bereits knapp unter dem Gefrierpunkt aktiv werden. Zugleich zeigten die untersuchten Isolate keine phytopathogenen Effekte, was ihre Umweltverträglichkeit weiter unterstreicht.

Die Ergebnisse verdeutlichen jedoch auch die methodischen Herausforderungen bei der Erfassung der Eiskernaktivität. Während der häufig eingesetzte Droplet-Freezing-Test eine schnelle visuelle Selektion erlaubt, ist er anfällig für Störungen durch Oberflächeneffekte und zeigt eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit. Die im Projekt etablierte Temperaturfühler-Messung mit Datenloggern bietet hingegen eine objektive, quantitativ präzisere Bestimmung der Gefriertemperaturen und wird künftig als Referenzmethode zur Isolatscharakterisierung herangezogen.

Derzeit laufen weitere Versuche zur Untersuchung der Frostwirkung an lebenden Pflanzen, insbesondere an Erdbeerpflanzen unter kontrollierten Bedingungen. Parallel dazu wird die genomische Charakterisierung der vielversprechendsten Isolate weitergeführt, um deren biologische Eigenschaften umfassend zu verstehen und ihr Anwendungspotenzial zu validieren.

Insgesamt deuten die bisherigen Befunde darauf hin, dass selektierte INA-II-Stämme, in Kombination mit einer belastbaren Messmethodik, einen vielversprechenden Ansatz für die Entwicklung ökologisch verträglicher Schutzstrategien gegen Spätfrost darstellen.

Danksagung

Wir danken der Lehr- und Versuchsanstalt für Gartenbau und Arboristik e. V., insbesondere der Obstbau-Versuchsstation Müncheberg (OBVS), sowie dem Institut für Angewandte Forschung Berlin (IFAF Berlin) für die finanzielle und fachliche Unterstützung des Projekts.

Literatur

Andreas K und Kunz A (2019) Spätfrostereignisse im Obstbau und deren wirtschaftliche Auswirkungen: Analyse der Frostschäden 2017. Zeitschrift für Agrarökonomie 68 (2): 45-60

BMEL – Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2024) Özdemir zu Frosthilfen: EU-Kommission muss Ungleichbehandlung beenden. Online verfügbar unter: <https://www.bmel.de/SharedDocs/Archiv/Pressemitteilungen/2024/074-frosthilfen.html> (Zugriff am 06.05.2025)

Brinkmann O (2002) Wirkung von Abwehrproteinen auf phytopathogene Pilze und ihre Resistenzwirkung in transgenen Kartoffeln und Tabakpflanzen. Inaugural-Dissertation, Universität Bonn

Failor KC, Liu H, Llontop MEM, LeBlanc S, Eckshtain-Levi N, Sharma P, Reed A, Yang S, Tian L, Lefevre CT, Menguy N (2022) Ice nucleation in a Gram-positive bacterium isolated from precipitation depends on a polyketide synthase and non-ribosomal peptide synthetase. The ISME Journal 16 (3): 890-897. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01140-4>

- Hirano SS, Upper CD (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* — a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (3): 624-653
- Lederberg J, Lederberg EM (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology* 63 (3): 399-406
- Lindow SE (1983) The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annual Review of Phytopathology* 21 (1): 363-384
- Lindow SE, Arny DC, Upper CD (1978) Development of the freezing nucleation assay for detection of ice nucleation active bacteria. *Phytopathology* 68: 523-527
- Lindow SE, Arny DC, Upper CD (1982). Bacterial Ice Nucleus: A Factor in Frost Injury to Plants. *Plant Physiology* 70 (4): 1084-1089
- Lindow, SE, Arny, DC, Upper, CD (1987) *Erwinia herbicola*: A Bacterial Ice Nucleus Active in Increasing Frost Injury to Corn. *Phytopathology* 68: 523-527
- Lukas M, Schwidetzky R, Eufemio RJ, Bonn M, Meister, K (2022) Toward understanding bacterial ice nucleation. *The Journal of Physical Chemistry B* 126 (9): 1861-1867. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c09342>
- Morris CE, Sands DC, Glaux C, Samsatly J, Asaad S, Moukahel AR, Gonçalves FLT, Bigg EK (2014) Ice nucleation active bacteria and the role of biological particles in cloud formation and precipitation. *BioScience* 64 (4): 243-256
- Schwidetzky R, de Almeida Ribeiro I, Bothen N, Backes AT, DeVries AL, Bonn M, Fröhlich-Nowoisky J, Molinero V, Meister, K (2023) Functional aggregation of cell-free proteins enables fungal ice nucleation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120 (46). <https://doi.org/10.1073/pnas.2303243120>
- Turner MA, Arellano F, Kozloff LM (1990) Three separate classes of bacterial ice nucleation structures. *Journal of Bacteriology* 172 (5): 2521-2526
- Vali G (1971) Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. *Journal of the Atmospheric Sciences* 28 (3): 402-409
- Vali G (1995) Principles of ice nucleation. In *Biogenic Ice Nuclei and Their Effects on the Atmosphere and Agriculture* (pp. 1-28). Cooperative Institute for Research in the Atmosphere (CIRA), Colorado State University, Fort Collins