

Zum Einfluß bakterieller Antagonisten auf Phytophthora-Krankheiten bei Erdbeere und Himbeere

Effects of antagonistic bacteria to Phytophthora diseases on strawberry and raspberry

Astrid Mende, Sylvia Helfert und W. Zeller

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft

Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Schwabenheimer Straße 101, 69221 Dossenheim

1. Einleitung

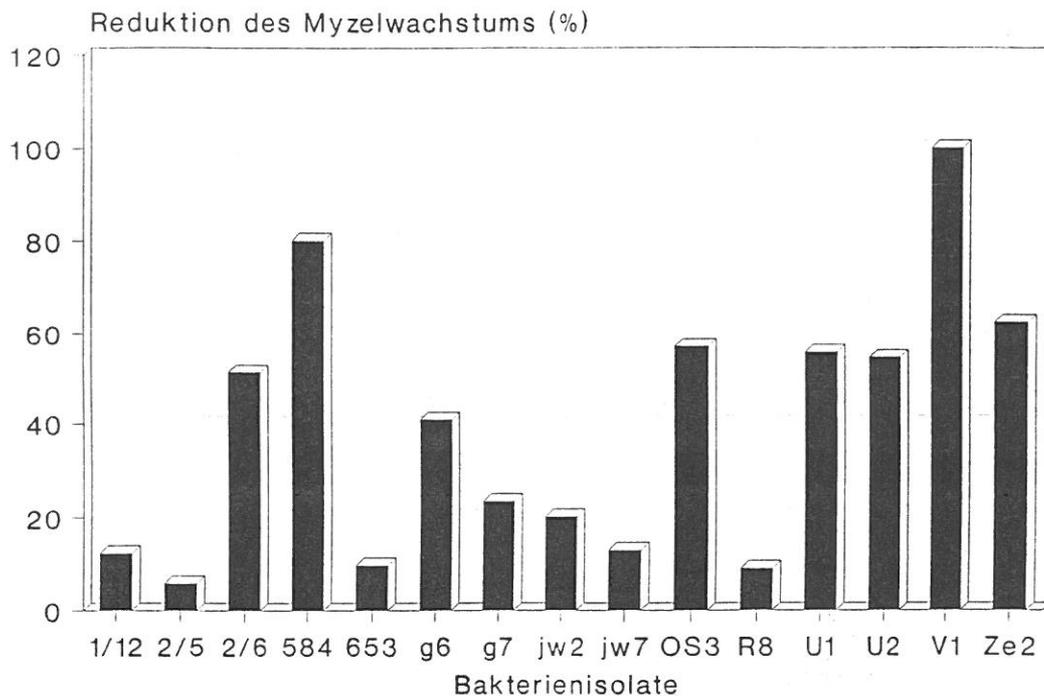
Durch Phytophthora-Arten hervorgerufene bodenbürtige Pilzkrankheiten sind im Obstbau schwer bekämpfbar und gefährden durch das Auftreten neuer Spezies an Erdbeere und Himbeere den Anbau dieser Kulturen in starkem Maße. Da z.Z. nur bei der Erdbeere mit dem systemischen Oomyceten-spezifischen Fungizid Alumiumfosetyl ein Mittel zur Bekämpfung zur Verfügung steht, jedoch im Himbeeranbau nicht, wurden von uns Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung dieser bodenbürtigen Pilzkrankheiten im Obstbau aufgenommen, um damit diese Lücke zu schließen.

Ausgehend von bakteriellen Antagonisten, die bereits gegenüber der Kragenfäule des Apfels (*Phytophthora cactorum*) eine Wirkung gezeigt hatten (Sauer and Zeller, 1992), wurden diese und andere Bakterien aus der Gattung *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter* und *Pseudomonas* in den nachfolgenden Untersuchungen auch auf ihre antagonistische Aktivität gegen Phytophthora-Arten an Erdbeere und Himbeere überprüft. Dies erfolgte zunächst *in vitro* und anschließend unter Gewächshausbedingungen an der Wirtspflanze. Außerdem wurde als weiteres Kriterium für den Antagonismus das Besiedlungsverhalten auf der Wurzeloberfläche der Wirtspflanze herangezogen.

2. Material und Methoden

2.1 Antagonisten - Screening *in vitro*

Zunächst wurden 15 der von Sauer and Zeller (1992) beschriebenen Bakterienisolate gegen verschiedene Stämme der Phytophthora-Arten in Dualkulturen überprüft. Dazu wurden die Bakterien 2 cm vom Rand einer Petrischale auf Potato Dextrose-Agar (PDA) oder Bohnenmehl-Agar (BMA) ausgebracht und bei 24 ° C kultiviert. Nach 2 Tagen wurde von jedem Pilzisolat je ein Mycelstück von 5mm Durchmesser im Abstand von ca. 5,5 cm zu den Bakterien auf die Platte geimpft und diese bei 18 ° C für 1-2 Wochen weiter kultiviert. Regelmäßig wurden die Myzeldurchmesser vermessen und daraus die relative Reduktion des Myzelwachstums berechnet. Repräsentativ für die Ergebnisse mit den verschiedenen Phytophthora-Stämmen ist in Abb. 1 die Wirkung gegenüber *P. fragariae* var. *rubi* wiedergegeben.

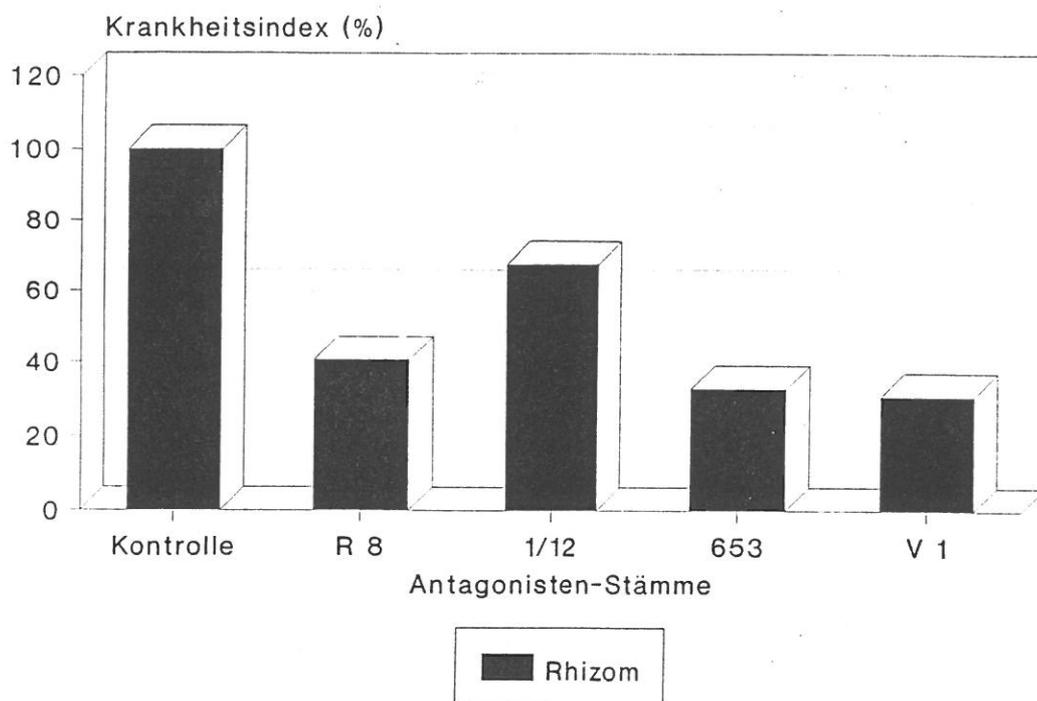


Bonitur: nach 11 Tagen

Abb. 1: Effekt von 15 Bakterienisolaten auf das Myzelwachstum von *Phytophthora fragariae* var. *rubi* in vitro

2.2 Gewächshausversuche zur Bekämpfung der Rhizomfäule (*Phytophthora cactorum*)

4 Bakterienisolate mit guter Wirkung in vitro wurden anschließend für Gewächshausversuche zur Bekämpfung der Rhizomfäule (*Phytophthora cactorum*) an Erdbeerpflanzen herangezogen. Die Isolate wurden in Schüttelkulturen über Nacht vermehrt und in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in 0,6 %iger NaCl-Lösung eingesetzt. Die Wurzeln jeder Pflanze wurde dabei 5 Minuten in 100 ml Suspension getaucht und anschließend sofort getopft. Das Substrat wurde vorher mit 2 Vol.% des *Phytophthora*-Erregers angereichert. Als Inokulum zeigte ein Vermiculit-Weizenkleie-Gemisch die besten Erfolge. Nach dem Topfen wurden die Pflanzen sofort gewässert und während des Versuchsbeginns für Staunässe gesorgt, da nur unter diesen Bedingungen Zoosporen für eine Infektion gebildet werden. Die Pflanzen wurden für die Dauer des Versuches in Klimakammern bei 20 ° C, 75 % Luftfeuchte sowie 30000 Lux gehalten. Als Kontrollen wurden unbehandelte, nur in Kochsalzlösung getauchte Pflanzen verwendet, von denen ein Teil als infizierte Kontrolle in Erreger-haltiges, der andere Teil in unbehandeltes Substrat getopft wurde.



Bonitur: 4 Wochen p.i.

R 8 *Pseudomonas fluorescens*
 1/12 *Enterobacter agglomerans*
 653 *Agrobacterium radiobacter*
 V 1 *Bacillus licheniformis*

Abb. 2: Effekt von 4 ausgewählten Bakterienisolaten auf die Reduktion der Rhizomfäule (*Phytophthora cactorum*) an Erdbeerpflanzen

2.3 Untersuchungen zur Kolonisierung der Wurzeloberfläche

Zum Verhalten der antagonistischen Bakterien auf den Wurzeloberflächen der Wirtspflanzen wurde zunächst das Isolat 584 von *Pseudomonas fluorescens* ausgewählt. Um den Antagonisten über den Versuchszeitraum kontinuierlich nachweisen zu können, wurde zuvor eine Resistenz gegenüber Rifampicin (50 ppm) induziert. Wurzeln von Himbeerpflanzen wurden für 5 min. in die Bakteriensuspension des Isolates (5×10^6 Zellen/ml) getaucht, anschließend getopft und für die Reisolierung folgendermaßen aufbereitet:

je 1 g Wurzelmaterial wurde in 50 ml 0,6 %iger NaCl-Lösung für 30 Minuten gerührt und anschließend eine Verdünnungsreihe hergestellt. Danach wurden je 100 μ l auf Rifampicin-haltigem Nutrient-Agar (NA) ausplattiert und nach 2 Tagen ausgezählt. Gleichzeitig wurde an unbehandelten Pflanzen die normale Besiedlungsdichte auf gleiche Weise auf unbehandeltem NA-Agar ermittelt.

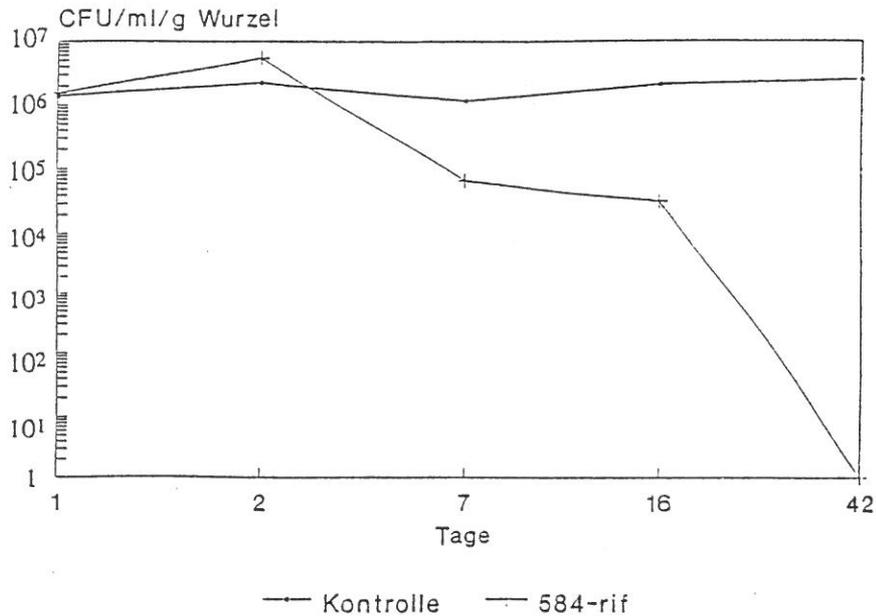


Abb. 3: Reisolierung des Rifampicin-resistenten Isolates 584 von *Pseudomonas fluorescens* an Himbeerwurzeln

3. Ergebnisse und Diskussion

Insgesamt konnte von allen eingesetzten Bakterienisolaten eine Reduktion im Myzelwachstum gegenüber den unterschiedlichen Phytophthora-Arten *in vitro* (Dualkultur) nachgewiesen werden (Abb. 1). Das Bakterienisolat mit der höchsten wachstumshemmenden Aktivität war V1, ein Isolat von *Bacillus licheniformis*. Die Hemmwirkung gegenüber dem Pilzisolat von *Phytophthora fragariae* var. *rubi* betrug hier 100 % im Vergleich zur Kontrolle. In mikroskopischen Untersuchungen konnten durch den Einfluß der Isolate deutliche Hyphenveränderungen in Form von Verzweigungen, verdickten Septen, blasigen Aufblähungen oder einer gehäuften Bildung von Mikrokonidienträgern festgestellt werden. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Tests war die Reduktion der Rhizomfäule an den Erdbeerpflanzen im Gewächshaus durch die Antagonisten weniger stark ausgeprägt. Es konnte hier von den vier eingesetzten Bakterienisolaten eine Schutzwirkung von 35-70 % erreicht werden, wobei das Isolat V 1 mit einem Krankheitsindex von 31 % wiederum den besten Effekt zeigte (Abb. 2). Da die Auswertung des Pflanzenmaterials erst nach einer Zeitspanne von 4 Wochen erfolgte, kann damit bei einmaliger Behandlung der Wurzeln jedoch von einer relativ langen Schutzwirkung ausgegangen werden.

Um einen Anhaltspunkt zur Dauer der Schutzwirkung zu erhalten, wurde von einem der effektiven Antagonisten, Isolat 584 von *Pseudomonas fluorescens*, das Besiedlungsverhalten auf der Wurzeloberfläche von Himbeere über einen Zeitraum von 42 Tagen verfolgt. Nach dem Tauchen der Wurzeln in eine Suspension des Isolates von ca. 5×10^6 Zellen/ml war nach 2 Tagen eine starke Stimulation des Bakterienwachstums auf mehr als 300 % der Gesamtzellzahl

der Kontrolle nachzuweisen. Im Anschluß daran erfolgte dann eine deutliche Reduktion in der Konzentration des Antagonisten bis auf $6,9 \times 10^4$ Zellen/ml pro g Wurzel bis zum 7. Tag, die nahezu auf dem gleichen Niveau bis 16 Tage p.i. vorhanden waren. Es kann aus diesen ersten Befunden daher geschlossen werden, daß die antagonistischen Bakterienisolate Wurzeln von Himbeere und Erdbeere zu kolonisieren vermögen und bis zu einer Dauer von ca. 2 Wochen eine Schutzwirkung gegen pilzliche Pathogene erreicht werden kann, was auch aus Ergebnissen von anderen Autoren bei Saatgutbehandlung hervorgeht (Keels and Schippers, 1983). Erste eigene Untersuchungen an weiteren Bakterienisolaten deuten in die gleiche Richtung. Ausgehend von diesen ersten Ergebnissen lassen sich von einigen der überprüften Bakterienisolate Ansatzpunkte für eine antagonistische Wirkung gegenüber den Phytophthora-Krankheiten zunächst an Erdbeere nachweisen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob auf der Basis des Antagonismus ein praxisreifes Verfahren für die schwer zu bekämpfenden bodenbürtigen Schaderreger im Obstbau entwickelt werden kann.

4. Summary

Studies on biocontrol of several diseases caused by *Phytophthora* species on raspberry and strawberry with antagonistic bacteria were undertaken in vitro and under controlled conditions in climatic chambers. 15 bacterial isolates of different genera were tested in dual culture tests in vitro. Most of these isolates reduced the mycelial growth of the pathogens until 100 %. The best effect was induced by an isolate of *Bacillus licheniformis*. Rifampicin resistant isolates of *Pseudomonas fluorescens* have been used to monitor their survival on the roots of raspberries. Over a period of 16 days the antagonistic isolate could be reisolated in a concentration of 10^4 CFU/ml. Four of the most effective isolates were chosen for an control experiment with strawberry plants against *Phytophthora cactorum*. The roots were dipped in a suspension of the antagonistic isolates and planted in an infested soil with *P. cactorum*. The 4 isolates reduced both the infection and damage of strawberry roots caused by the pathogen until 70 %.

5. Literatur

- Cook, R.J. and Baker, K.F., 1983.* The nature and practice of biological control of plant pathogens. Am. Phytopatholog. Soc., St. Paul. 539pp.
- Geels, F.P. and Schippers, B., 1983.* Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. Phytopath. Z.108: 193-206.
- Sauer, H. and Zeller, W., 1992:* Biological control of collar rot in apple (*Phytophthora cactorum*) by bacteria of soil and bark. Acta Phytopath. et Entomol. Hungar. 27: 571-575.
- Weller, D.M., 1988.* Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopathol. 26:379-407.