

## Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Schadinsekten und Krankheiten an Erdbeeren

Application of microbials to control strawberry pests

**FKZ: 06OE155**

**Projektnehmer:**

Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen  
Institut für Biologischen Pflanzenschutz  
Heinrichstraße 243, 64287 Darmstadt  
Tel.: +49 6151 407-0  
Fax: +49 6151 407-290  
E-Mail: [bi@jki.bund.de](mailto:bi@jki.bund.de)  
Internet: <http://www.jki.bund.de>

**Autoren:**

Bisutti, Isabella Linda; Stephan, Dietrich

Gefördert vom Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz  
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger  
Landwirtschaft (BÖLN)

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen  
Institut für Biologischen Pflanzenschutz  
Heinrichstrasse 243  
64287 Darmstadt

# „Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren Teilprojekt: Bodenbürtige Krankheitserreger“

Schlussbericht zum Forschungsprojekt Nr.06OE155

Berichtszeitraum: 01.01.2009 - 31.12.2011

Verbundprojekte:

Forschungsanstalt Geisenheim Forschungsprojekt Nr. 06OE354: **Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren. Teilprojekt: Graufäule und Echter Mehltau**

Bioland/Föko Forschungsprojekt Nr. 06OE148: **Stärkung der Ertragssicherheit und Rentabilität im biologischen Erdbeeranbau durch eine effektivere Unkrautkontrolle sowie der Regulierung des Erdbeerblütenstechers und verschiedener Wurzelfäulen**

Landwirtschaftskammer NRW Forschungsprojekt Nr. 06OE262: **Verbesserung der Produktionssicherheit und Verlängerung des Angebotszeitraumes durch Anbau von Öko-Erdbeeren im Folientunnel**

## Kurzfassung Deutsch

Im organischen Erdbeeranbau sind bodenbürtiger Krankheiten, z. B. *Verticillium*-Welke und Rhizomfäule, ein wachsendes Problem. Auch im konventionellen Anbau ist eine Bekämpfung der *Verticillium*-Welke nur bedingt möglich, da keine effiziente Pflanzenschutzmittel verfügbar sind.. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob Mikroorganismen zur Regulierung von bodenbürtigen Krankheiten an Erdbeeren verwendet werden können.

Hierfür wurden 98 Mikroorganismen, davon 68 Bakterien und 26 Pilze, in *in vitro* Tests gegen die *Verticillium*-Welke (*V. albo-atrum*, *V. dahliae*), die Rhizomfäule (*Phytophthora cactorum*) und die Rote Wurzelfäule Erreger getestet. In einem mehrstufigen Selektionsprozess wurden von den 98 Mikroorganismen 15 Mikroorganismen für weitere Laborversuche ausgewählt. Als Selektionskriterien wurden u.a. das antagonistische Potential, die Kombinierbarkeit und die Marktverfügbarkeit berücksichtigt.

Die fünfzehn Mikroorganismen, die die vorgegebenen Kriterien erfüllten, wurden in weiteren Kompatibilitätstest getestet. Anschließend wurden vier Mikroorganismen ausgewählt: zwei *Trichoderma* (*T. atroviride* P1 und *T. harzianum* T58), ein entomopathogener Pilz (*Metarhizium anisopliae* Ma43) und ein Bakterium (*Bacillus subtilis* FZB24). Diese Antagonisten wurden in Gewächshaus- und Freilandversuche an zwei Erdbeersorten (Honeoye und Sonata) in mit *V. dahliae* und *P. cactorum* inokulierter Erde getestet.

Weder in Gewächshaus- noch in Freilandversuchen konnten auch nach künstlicher Inokulation des Bodens mit den zwei Pathogenen reproduzierbare Krankheitssymptome hervorgerufen werden. Damit konnte keine klare Aussage zur befallsreduzierenden Wirkung der antagonistischen Mikroorganismen getroffen werden.

Allerdings wurde in Gewächshausversuchen mit *V. dahliae* inokulierter Erde bei der Sorte Honeoye ein positiver Einfluss der Antagonisten auf unterschiedliche Wachstumsparameter beobachtet. Die Ergebnisse zum Einfluss der Antagonisten auf die Mikrosklerotien, die Überdauerungsformen von *V. dahliae*, waren widersprüchlich. Nur in Freilandversuchen wurde eine Reduktion der Mikrosklerotien durch pilzliche Antagonisten erreicht.

Projektbearbeiterin:

Isabella Linda Bisutti

Tel. 06151-407223

E-mail: [Isabella.Bisutti@jki.bund.de](mailto:Isabella.Bisutti@jki.bund.de)

Projektleiter:

Dr. Dietrich Stephan

Tel. 06151-407238

E-mail: [Dietrich.Stephan@jki.bund.de](mailto:Dietrich.Stephan@jki.bund.de)

## Summary

In organic strawberry production soil borne diseases, like *Verticillium* wilt and crown root rot, are an increasing problem. Even in conventional orchards it is not possible to control *Verticillium* wilt because no effective pesticides are available. Therefore, the potential of microbial control of these diseases was investigated.

98 microorganisms, including 68 bacteria and 26 fungi, were screened against *Verticillium* wilt (*V. albo-atrum*, *V. dahliae*), crown root rot (*Phytophthora cactorum*) and red steel agents *in vitro*. Different parameters were considered for the successive selection for the following experiments: first was the capacity of the microorganism to reduce the growth of the pathogens followed by the presence as product on the market and other criteria e.g. growth temperature. Fifteen microorganisms that fulfill most of the criteria were selected for further compatibility tests. The four microorganisms that afterwards were chosen for the successive experiments were two *Trichoderma* (*T. atroviride* P1 and *T. harzianum* T58), one entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae* Ma43) and a bacterium (*Bacillus subtilis* FZB24). These four antagonistic microorganisms were tested in greenhouse and field trials on two different strawberry cultivars (Honeoye and Sonata) in the presence of *V. dahliae* and *P. cactorum* inoculated soil.

In greenhouse and field trials no clear disease symptoms caused by the two pathogens were observed. But in the greenhouse experiments in the presence of *V. dahliae*, a positive influence of the antagonists on different growth parameter of the cv. Honeoye was observed. The results on the control of microsclerotia (MS), produced by *V. dahliae* as persistence bodies, were inconsistent. On the other hand in the field trials a partial reduction of MS concentration was achieved by the fungal antagonists. But no clear positive effects on the plant health for both cultivars (Sonata in the presence of *P. cactorum* and Honeoye of *V. dahliae*) were observed.

Principle investigator:

Isabella Linda Bisutti

Tel. 06151-407223

E-mail: [Isabella.Bisutti@jki.bund.de](mailto:Isabella.Bisutti@jki.bund.de)

Project responsible:

Dr. Dietrich Stephan

Tel. 06151-407238

E-mail: [Dietrich.Stephan@jki.bund.de](mailto:Dietrich.Stephan@jki.bund.de)

## Inhaltsverzeichnis

1	Einführung .....	6
1.1	Gegenstand des Vorhabens.....	6
1.2	Ziele und Aufgabenstellung des Projekts .....	6
1.2.1	Gesamtziel des Vorhabens .....	6
1.2.2	Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen .....	7
1.3	Planung und Ablauf des Projektes.....	7
1.3.1	Labortests zur Wirksamkeit mikrobiologischer Präparate .....	7
1.3.2	Kompatibilität ausgewählter Mikroorganismen bzw. Präparate .....	8
1.3.3	Interaktionen im System "Präparat-Schaderreger-Wirtspflanze".....	8
1.3.4	Wirksamkeit ausgewählter Präparate im Freiland an verschiedenen Sorten.....	9
1.3.5	Erprobung unter Praxisbedingungen .....	9
1.3.6	Chronologischer Arbeitsplan .....	9
1.3.7	Meilensteine.....	10
2	Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	11
3	Material und Methoden .....	14
3.1	Labortests zur Wirksamkeit mikrobiologischer Präparate: Dualkultur .....	14
3.2	Kompatibilitäts-Test ausgewählter Mikroorganismen bzw. Präparate.....	15
3.2.1	<i>In vitro</i> Tests .....	15
3.2.2	<i>In vitro</i> Tests in Kombination zweier Mikroorganismen .....	16
3.2.3	<i>Ad planta</i> Versuche .....	17
3.3	Interaktionen im System "Präparat-Schaderreger-Wirtspflanze" – Gewächshausversuche	17
3.3.1	Versuche in 2010 .....	17
3.3.2	Versuche in 2011 .....	19
3.4	Wirksamkeit ausgewählter Präparate im Freiland.....	20
3.4.1	Freilandversuche in 2010 .....	20
3.4.2	Freilandversuche in 2011 .....	22
3.5	Erprobung unter Praxisbedingungen .....	24
4	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	25
4.1	Labortests zur Wirksamkeit mikrobiologischer Präparate: Dualkultur .....	25
4.2	Kompatibilitäts-Test ausgewählter Mikroorganismen bzw. Präparate.....	27
4.2.1	<i>In vitro</i> Tests .....	27
4.2.2	<i>In vitro</i> Tests zur Kombination zweier Mikroorganismen .....	29
4.2.3	<i>Ad planta</i> Versuche .....	31
4.3	Interaktionen im System "Präparat-Schaderreger-Wirtspflanze" – Gewächshausversuche	33

4.3.1	Versuche in 2010 .....	33
4.3.2	Versuche in 2011 .....	34
4.4	Wirksamkeit ausgewählter Präparate im Freiland .....	35
4.4.1	Freilandversuche in 2010 .....	35
4.4.2	Freilandversuche in 2011 .....	36
4.5	Erprobung unter Praxisbedingungen .....	38
5	Diskussion der Ergebnisse .....	39
6	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse .....	43
7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen .....	44
8	Zusammenfassung .....	46
9	Literaturverzeichnis .....	47
10	Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt .....	50
11	Zusätzliche Aktivitäten .....	52
11.1	Produktion der Pathogene .....	52
11.1.1	Produktion von <i>Phytophthora cactorum</i> .....	52
11.1.2	Produktion von <i>Verticillium dahliae</i> .....	53
11.2	Tests zur <i>Verticillium dahliae</i> Infektion .....	54
11.3	Produktion von <i>Metarhizium anisopliae</i> Ma43 gegen Erdbeerblütenstecher .....	54
11.4	Bestimmung der <i>in vitro</i> Hemmung auf Keimung der MS .....	54
11.4.1	Versuche 2010 .....	54
11.4.2	Versuche 2011 .....	55
11.5	Temperatur-Verläufe .....	56
11.5.1	Antagonisten .....	56
11.5.2	Pathogene .....	57
11.6	Tests mit Erdbeersämlingen .....	58
11.7	Tests mit <i>Pseudomonas</i> .....	59
11.8	Chlorophyllfluoreszenzmessung .....	59
11.9	Beta-Glucanase Messung .....	61
ANHANG	.....	62

## 1 Einführung

### 1.1 Gegenstand des Vorhabens

Gegenstand des Forschungsprojektes ist die Entwicklung von Applikationssystemen für mikrobiologische Präparate, die für eine optimierte Schaderregerregulierung bei Erdbeeren geeignet sind. Im Einzelnen sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- Können bodenbürtige bzw. wurzelinfizierende Krankheitserreger der Erdbeere mit mikrobiologischen Präparaten (Pflanzenstärkungs- und Pflanzenschutzmittel) effektiv reguliert werden?
- Beeinflussen (positiv wie negativ) solche Präparate u.U. das Auftreten anderer Schaderreger?
- Gibt es Wechselwirkungen zwischen den nützlichen Mikroorganismen und können mikrobiologische Präparate so kombiniert werden, dass ein Schaderregerkomplex effektiv reguliert werden kann?

### 1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

#### 1.2.1 Gesamtziel des Vorhabens

Wichtige Krankheitserreger der Erdbeere können im ökologischen Anbau nur sehr begrenzt mit chemischen Pflanzenschutzmitteln bekämpft werden. Neben kulturtechnischen Maßnahmen und einer zielgerichteten Sortenwahl kommt somit dem Einsatz von mikrobiologischen Pflanzenschutz- und Pflanzenstärkungsmitteln eine besondere Bedeutung zu.

In verschiedenen Forschungsprojekten bzw. Forschungszentren (z.B. BLE-Projekt 02OE093 "Biologische Regulierung von bodenbürtigen *Phytophthora*-Krankheiten an Erdbeeren", DBU-Projekt (Az 18940) „*Verticillium*-Welke bei Erdbeere regulieren“ und SafeCrop Centre, San Michele, Trentino, Italien) wurde intensiv unter anderem der Einsatz von Mikroorganismen zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren bearbeitet. Allerdings konzentrierten sich die Arbeiten meist nur auf einen Schaderreger bzw. auf wenige antagonistische Mikroorganismen. Der mögliche Einfluss auf einen Schaderregerkomplex und die Interaktionen verschiedener Mikroorganismen untereinander wurden nicht berücksichtigt.

Allerdings treten meist an Erdbeerkulturen mehrere Schaderreger gleichzeitig auf, so dass auch verschiedene Regulierungsmaßnahmen gleichzeitig durchgeführt werden müssen. Bislang gibt es keine klaren Empfehlungen für einen kombinierten Einsatz von mikrobiellen Antagonisten

einerseits und möglichen Wechselwirkungen mit den verschiedenen Präparaten auf organischer und anorganischer Basis andererseits. Dies wird auch von den Herstellern mikrobiologischer Produkte beklagt (Junge 2008).

Hauptziel des Forschungsprojektes sollte die Entwicklung von Applikationssystemen sein, die für eine optimierte Schaderregerregulierung bei Erdbeeren geeignet sind. Im Teilprojekt „Graufäule und Echter Mehltau“ der Forschungsanstalt Geisenheim wurde sich auf die Blatt- und Fruchtpathogene konzentriert, hingegen wurde sich in diesem Teilprojekt auf die bodenbürtiger und wurzelinfizierender Pathogene beschränkt.

### **1.2.2 Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen**

Wichtiges Hemmnis bei der Umstellung auf den ökologischen Anbau von Erdbeeren und dessen Flächenausweitung ist u.a. die Befürchtung der Obstbauern vor erhöhten Ertragsausfällen durch Krankheiten und Schädlinge. Die Erarbeitung von Konzepten zur Regulierung von Schaderregern kann somit dazu beitragen, die Rahmenbedingungen für eine weitere Stärkung und Ausdehnung des ökologischen Erdbeeranbaus dauerhaft zu verbessern. Das durchgeführte Forschungsprojekt sollte somit einen wichtigen Beitrag in der Ertrags- und Qualitätssicherung im biologischen Erdbeeranbau leisten.

### **1.3 Planung und Ablauf des Projektes**

Das Projekt wurde in Kooperation mit der Forschungsanstalt Geisenheim (FAG) und weiteren Projektpartnern (Bioland, LWK-NRW) durchgeführt. In *in vitro* Tests sollte die Wirksamkeit verschiedener Mikroorganismen gegen vier bodenbürtige Pathogene getestet werden. Anschließend sollte für eine begrenzte Anzahl an Isolaten deren Kompatibilität *ad planta* getestet werden. Sowohl in Gewächshaus- als auch Freilandversuchen sollte die Wirkung der ausgewählten Mikroorganismen geprüft werden.

#### **1.3.1 Labortests zur Wirksamkeit mikrobiologischer Präparate**

Im Dualkultur-Test auf Agarplatten (gegen *Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*, *P. cactorum*) wurden u.a. folgende Mikroorganismen im Laborversuch zur Regulierung der pilzlichen Krankheitserreger getestet:

*Ampelomyces quisqualis* (AQ-10®)

*Bacillus subtilis* (Compendium®, Serenade®, FZB24®, Phytovit WG®)

*B. amyloliquefaciens* (RhizoVital FZB42®)

*B. thuringiensis* (Dipel, Xentari)

*Clonostachys rosea*



*Metschnikowia fructicola* (Shemer®)

*Pseudomonas chlororaphis* (Cedemon®)

*Ps. fluorescens*

*Serratia plymuthica* (Rhizostar®)

*Trichoderma harzianum* (Trianum®, Trichodex®, Trichostar®)

weitere Mikroorganismen oder Präparate, die sich noch in der Entwicklung befinden.

Bei den ausgewählten Mikroorganismen handelt es sich teilweise um solche, die in biologischen Pflanzenschutzmitteln verwendet werden bzw. sich in der Entwicklung befinden. Des Weiteren wurden aber auch Mikroorganismen aus anderen Sammlungen in die Versuche mit einbezogen. Insgesamt wurden in diesen Labortests 98 Isolate untersucht.

### **1.3.2 Kompatibilität ausgewählter Mikroorganismen bzw. Präparate**

In weiteren Untersuchungen sollte geprüft werden, in welcher Form wirksame Präparate untereinander und ggf. mit zugelassenen Pflanzenschutz- bzw. Pflanzenstärkungsmitteln kombinierbar sind. In *in vitro* Tests (Dualkultur) wurde die gegenseitige Hemmung ausgewählter Präparate untersucht und in *ad planta* Versuchen sollten Präparat-Kombinationen auf ihre Wirksamkeit hin geprüft werden.

Die Kombinierbarkeit mikrobiologischer Präparate wurde zunächst *in vitro* geprüft, wobei insbesondere Hemmwirkungen zwischen verschiedenen Mikroorganismen untersucht werden sollten. Hierfür wurden aus den zu testenden Produkten die Mikroorganismen re-isoliert. Das jeweilige Reisolat wurde auf ein geeignetes Nährmedium ausplattiert. Anschließend wurde das zweite Produkt (Mikroorganismus und Formulierung) in verschiedenen Konzentrationen auf das Medium aufgetragen und die Hemmwirkung bestimmt (Hemmhoftest). Darüber hinaus war vorgesehen, auch verschiedene mikrobiologische Präparate, die primär gegen tierische Schaderreger eingesetzt werden (z.B. *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*), in die Untersuchungen einzubeziehen.

Ausgewählte Präparate, insbesondere diejenigen, bei denen im *in vitro* Test Hemmwirkungen beobachtet wurden, sollten *ad planta* in Kombination mit anderen Präparaten zur Regulierung der Zielorganismen (*V. albo-atrum*, *V. dahliae*, *P. fragariae* var. *fragariae*, *P. cactorum*) im Gewächshaus getestet werden.

### **1.3.3 Interaktionen im System "Präparat-Schaderreger-Wirtspflanze"**

In Labor- und Gewächshausversuchen sollte der Einfluss (positiv wie negativ) eines Präparates auf den Schaderreger und bestimmte Begleitschaderreger an der Wirtspflanze untersucht werden. Es war geplant, in enger Kooperation mit dem Projektpartner FAG auch Pflanzen zu

verwenden, die mit den dort selektierten Mikroorganismen bzw. Präparaten gegen Blattpathogene behandelt wurden.

#### **1.3.4 Wirksamkeit ausgewählter Präparate im Freiland an verschiedenen Sorten**

An mehreren Standorten (z.B. Geisenheim; Verbundpartner: Weinsberg, Köln-Auweiler) sollte die Wirksamkeit ausgewählter Präparate bzw. Kombinationen im Freiland untersucht werden. Im Rahmen dieser Versuche sollte neben den bodenbürtigen Krankheitserregern über den Vegetationsverlauf die Pflanzenentwicklung zur Erfassung einer möglichen pflanzenstärkenden Wirkung der Mikroorganismen, Entwicklung weiterer Krankheiten und Schädlinge sowie das Nachernteverhalten dokumentiert werden.

#### **1.3.5 Erprobung unter Praxisbedingungen**

Basierend auf den Ergebnissen der Teilziele 1-4 sollte ein mögliches Applikationsschema für mikrobiologische Produkte erarbeitet und an mehreren Standorten mit unterschiedlichem Schaderregerdruck angewendet werden. Neben dem Ertrag und dem Nachernteverhalten sollte in diesen Versuchen über den Vegetationsverlauf der jeweilige Schaderregerkomplex erfasst werden.

#### **1.3.6 Chronologischer Arbeitsplan**

Das Projekt begann am 01.01.2009 mit vorbereitenden Arbeiten zur Durchführung der Labortests. Im Projektjahr 2009 lag der Schwerpunkt der Arbeiten auf Labortests zur Wirkung und zur Kompatibilität der Mikroorganismen. Im Projektjahr 2010 wurden mit ausgewählten Mikroorganismen Gewächshaus- und Freilandversuche zur Erfassung von Interaktionen im Komplex "Präparat-Schaderreger-Wirtspflanze" angelegt. Im Projektjahr 2011 wurden neben weiteren Laborversuchen die Gewächshaus- und Freilandversuche fortgeführt.

zeitliche Arbeitsplanung	2009				2010				2011			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Wirksamkeitstests (Labor)												
Kompatibilität versch. Mikroorganismen <i>in vitro</i> <i>ad planta</i>												
Interaktionen "Präparat-Schaderreger- Wirtspflanze" (Gewächshausversuche)												
Wirksamkeit - Freilandversuche												
Erprobung unter Praxisbedingungen												
Meilensteine				M1				M2				M3

### 1.3.7 Meilensteine

**M1:** Auswahl von Präparaten für weitere Versuche auf der Basis der Wirksamkeitsprüfungen *in vitro*

**M2:** Bewertung der Kompatibilität ausgewählter Mikroorganismen von Pflanzenschutz- bzw. Stärkungsmittel zur Planung der Gewächshaus- und Freilandversuche

**M3:** Ergebnisse der Freilandversuche zur Erstellung eines Applikationssystems für die abschließende Anwendung in Praxisbetrieben

## 2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Erdbeeren stellen für den Verbraucher nach dem Apfel die beliebteste Frucht der Deutschen dar. Sie sind reich an Inhaltsstoffen sind aber auch leicht verderblich und anfällig für Pilzkrankheiten. Pilzliche Krankheitserreger kommen sowohl an Frucht, am Blatt wie an unterirdischen Pflanzenteilen vor. Mangels wirksamer Alternativen beschränkt sich der ökologische Erdbeeranbau bei der Regulierung von Schaderregern vornehmlich auf pflanzenbauliche Maßnahmen und die Wahl weniger anfälliger Sorten. So wird z.B. versucht, über die Reduktion des organischen Düngereinsatzes oder veränderte Standweiten die Anfälligkeit gegenüber pilzlichen Krankheitserregern zu reduzieren (Zimmer 2008). Grundsätzlich wäre auch der Einsatz von mikrobiologischen Präparaten (BCAs = biocontrol agents) bei Erdbeeren möglich. Zahlreiche kommerzielle und semi-kommerzielle BCAs sind für verschiedene Krankheiten und Schädlinge an Erdbeere verfügbar (Moser *et al.* 2008). In der Praxis wird jedoch eine geringe Akzeptanz der BCAs beobachtet. Einer umfassenden Studie zufolge (Moser *et al.* 2008) sind es vor allem drei Gründe, die dem Einsatz von BCAs aus der Sicht der Anbauer entgegenstehen: i. unzureichende Befalls-Reduzierung, ii. hohe Empfindlichkeit gegenüber Witterungsbedingungen und iii. zeitspezifische Applikation.

Da im vorgesehenen Teilprojekt spezifisch bodenbürtige bzw. wurzelinfizierende Krankheitserreger an Erdbeeren untersucht werden sollten, wird im Folgenden der Stand des Wissens für die biologische Bekämpfung dieser besonders wichtigen Erdbeerkrankheiten näher erläutert.

Die **Verticillium-Welke** (Erreger: *Verticillium albo-atrum* und *V. dahliae*) hat an wirtschaftlicher Bedeutung in den letzten Jahren gewonnen, weil qualitativ hochwertige und ertragsreiche Erdbeersorten stark anfällig sind (Dathe 1994). Die zwei Pilze unterscheiden sich geringfügig, so dass man sie öfter nur einer Art zuordnet. Beide Arten sind bei mehr als 200 verschiedenen dikotyledonen Pflanzen als Erreger bekannt (Fradin und Thomma 2006). *V. dahliae* produziert Mikrosklerotien (MS), die als Überdauerungsformen fungieren und für die Erstinfektion verantwortlich sind. Hinzu kommt, dass diese melanisierten Strukturen mehr als eine Dekade im Boden überleben können. Ihre Keimung und die folgende Wurzelinfektion wird von Wurzelexsudaten stimuliert (Debode *et al.* 2007). Daher ist eine chemische Bekämpfung der *Verticillium-Welke* nahezu ausgeschlossen (Maas 1998; Zimmer 2008). Das typische Schadbild

äußert sich durch Welken und Absterben der äußeren Blätter. Anfällige Sorten sterben ab, während weniger anfällige Sorten mit Ertragsreduktion reagieren (Dathe 1994).

Zur Reduzierung der MS werden Solarisation, chemische Bodenfumigation oder Fruchtfolge praktiziert. Solarisation kann nur in Regionen mit geeigneten klimatischen Bedingungen angewendet werden (Fradin und Thomma 2006). Fruchtfolgen mit kurzer Rotation haben wegen der langen Persistenz der MS im Boden wenig Erfolg (Fradin und Thomma 2006). Die chemische Fumigation ist weder im biologischen noch im konventionellen Anbau möglich. Eine andere anbautechnische Methode, die im biologischen Anbau praktiziert werden könnte, wäre die Untermischung von „grüner Biomasse“, gefolgt von einer Solarisation. Das *Verticillium*-Inokulum konnte mit dieser Methode um 75% reduziert werden (Eikemo *et al.* 2003, Lamers *et al.* 2008). In Indien (Subbarao *et al.* 2007) erbrachte eine Rotation mit Broccoli und Rosenkohl positive Ergebnisse und in der Schweiz wurde durch Einarbeiten von braunen Senfpflanzen in den Boden das MS Vorkommen um 25% reduziert (Michel *et al.* 2006). Neben der Suche nach geeigneten Sorten und anbautechnischen Maßnahmen stellt die mikrobiologische Bekämpfung der *Verticillium*-Welke mit antagonistischen Mikroorganismen eine Alternative dar (Berg *et al.* 2001, Berg *et al.* 2006). Hier kommen besonders pilzliche Antagonisten, Mykorrhiza-Pilzen und antagonistischen Rhizobakterien in Frage (Fradin und Thomma 2006). Als Mikroorganismen mit antagonistischem Potential wurden *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Serratia plymuthica* (Kurze *et al.* 2001) und *Talaromyces flavus* (<http://www.dbu.de/PDF-Files/GGTSPU-styx2.bba.de-27850-1728022-DAT/A-05129.pdf>) identifiziert. Fluoreszierende Pseudomonaden hemmen nicht nur das Wachstum des Pilzes (Erdogan und Benlioglu 2010), sondern eignen sich auch als Antagonisten der MS (Debode *et al.* 2007). *T. flavus* reduzierte sowohl den Krankheitsbefall an Pflanzen als auch die Vitalität der MS (Marois *et al.* 1984). Um die *Verticillium*-Welke regulieren zu können, muss auf ein integriertes Management mit resistenten/robusten Sorten und Anbaupraktiken zur Reduktion der Krankheit zurückgegriffen werden (Erdogan und Benlioglu 2010). Bei Verwendung toleranter Erdbeersorten-Genotypen muss bedacht werden, dass trotz Toleranz der Pilz ins Xylem eindringen kann. Das kann dazu führen, dass im Boden die Mikrosklerotienkonzentration (MS-Konzentration) sogar ansteigt und eine sukzessive Bepflanzung mit anfälligen Sorten nahezu unmöglich wird. Hinzu kommt, dass sich die Resistenz während der langen Vegetationsperiode oder unter verschiedenen Umweltbedingungen je nach Resistenzmechanismus unterschiedlich entfalten kann (Shaw *et al.* 2010).

Die **Rote Wurzelfäule** (Erreger: *Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) ist in allen Anbaugebieten eine gefährliche Erdbeerkrankheit. Aufgrund des Wurzelbefalls bleiben die befallenen Pflanzen im Wuchs zurück, weisen ein gestauchtes Aussehen auf, und bilden wenige wertlose Früchte und schwache Ausläufer. Rattenschwanzsymptome und Rotfärbung des Zentralzylinders der Wurzel sind die wichtigsten Merkmale der Krankheit auf dem Feld. Feuchtigkeit und dichte Böden begünstigen ebenso wie niedrige Bodentemperaturen den Pilz. Die Oosporen können 10-15 Jahre überdauern (Merkblatt nr. 57, 1981).

Die **Rhizomfäule** (Erreger: *Phytophthora cactorum*) wurde in Deutschland zum ersten Mal 1952 beschrieben (Van der Scheer 1971). Dieser Erreger ist inzwischen weit verbreitet und einer der destruktivsten Erdbeer-Pathogene. Die Krankheit tritt sporadisch auf, aber dann ist der Ausfall beachtlich (Porras *et al.* 2007). Hauptinfektionszeit sind die Monate Juli und August. Hohe Temperaturen und Probleme bei der Wasserversorgung fördern die Infektion. Die Schadsymptome zeigen sich vier Wochen nach der Pflanzung oder im Frühjahr nach der Blüte. Oberirdische Pflanzenteile welken, verbräunen und sterben anschließend ab. Im Rhizom sind braune oder rotbraune verfärbte faule Stellen sichtbar. Die Krankheitserreger verbleiben lange Zeit als Sporen (Diasporen/Oosporen und Chlamydosporen) im Boden, Staunässe und hohe Temperaturen begünstigen den Befall. Der Erreger kann auch latent als Infektion auftreten und mit dem Pflanzgut verbreitet werden (Lilja *et al.* 2006; Baht und Brown 2010). Als kulturtechnische Maßnahmen stehen die Verwendung von gesundem Pflanzengut, eine gute Bodendrainage und Pflanzung auf Dämmen zur Verfügung. Die Verwendung von Bion und Chitosan 20 Tage vor der Inokulation des Pathogens, bewirkte eine signifikante Reduktion der Krankheit (Eikemo *et al.* 2003). Die Kombination von Solarisation und *Trichoderma*-Applikation reduzierte die *P. cactorum*-Population im Boden (Porras *et al.* 2007). Auch bei konnte durch Anwendung von *S. plymuthica* eine Wirkung auf *P. cactorum* erzielt werden (Kurze *et al.* 2001). Am Institut für Biologischen Pflanzenschutz des JKI in Darmstadt wurden im Rahmen des BLE-Projekts 02OE093 "Biologische Regulierung von bodenbürtiger *Phytophthora*-Krankheiten an Erdbeeren" gegen die zwei *Phytophthora*-Arten verschiedene Bakterien getestet: *Routella terrigena* (G-584), *B. amyloliquefacies* (G-V1) und *Pseudomonas fluorescens* (2R1-7) erbrachten die besten Ergebnisse (Anandhakumar und Zeller 2008; Kurze *et al.* 2001).

Die **Fußfäule** (Erreger: *Sclerotium rolfsii* Sacc.) an Erdbeere hat ein breites Wirtsspektrum, wobei die langlebigen Sklerotien problematisch sind. In Indien wurden gute Erfolge mit *Trichoderma viride* und Thiram aber auch mit der Solarisation erzielt (Khosla und Kumar 2005; Raj und Shamar 2005).

### 3 Material und Methoden

98 Mikroorganismen wurden aus verschiedenen Quellen bezogen, wobei 26 Pilze (*Trichoderma harzianum* T39 stammte von zwei verschiedenen Ursprüngen) und 68 Bakterien (*Serratia plymuthica* HRO-C48 stammte auch aus zwei verschiedenen Ursprüngen und *Streptomyces albidoflavus* 1W1 wurde auf zwei verschiedene Nährmedien gezogen) in die Untersuchungen einbezogen wurden. Von den getesteten Mikroorganismen sind 27 als Produkt auf dem Markt (siehe Anhang Tabelle 11) oder in der Entwicklung

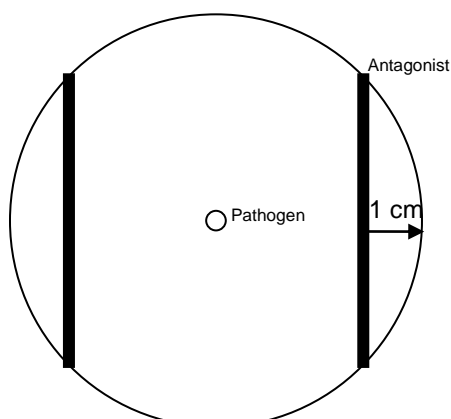
Die Herkunft der vier Pathogene wird in Tabelle 1 angegeben. Da sich im Nachhinein herausstellte, dass das zugesendete Isolat *P. fragariae* var. *fragariae* verunreinigt war, wurde der Quarantänerreger *P. fragariae* var. *fragariae* vom JKI in Braunschweig neu bezogen (am 25.01.2010) und erneut gegen 98 Antagonisten getestet.

**Tabelle 1: Liste der Pathogene und deren Ursprung**

Pathogen		Herkunft
<i>Verticillium dahliae</i> E107/98	Erdbeere (Elsanta) 1998	Herr Heitmann (FH Osnabrück)
<i>Verticillium albo-atrum</i>	k.A.	Herr Schwarz (BLfL)
<i>Phytophthora cactorum</i>	k.A.	Frau Sylla (FAG)
<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>fragariae</i> BBA 11/94-KO19	Erdbeere (Elsanta) 1994	Frau Dr. Werres (JKI-Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst)

Die pilzlichen Antagonisten wurden routinemäßig auf den Agarmedien MPA, OMA und PDA bei 25 °C auf Platten kultiviert. Die bakteriellen Antagonisten wurden entsprechend ihrer Nährstoffbedürfnisse auf TSA bzw. GYM bei 25 °C auf Agarmedium kultiviert. Die Pathogene wurden auf V8 Agarplatten bei 20 °C routinemäßig kultiviert.

#### 3.1 Labortests zur Wirksamkeit mikrobiologischer Präparate: Dualkultur

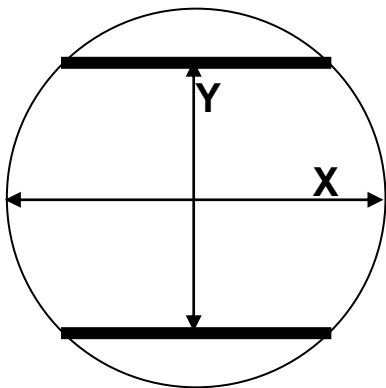


Vom peripheren Bereich des Myzels (von den obengenannten phytopathogenen Pilzen) wurden mit Hilfe eines Korkbohrers Agarscheiben (Durchmesser 5 mm) ausgestochen und in der Mitte einer V8 Platte positioniert. In einem Abstand von 1,0 cm, gemessen vom Rand der Petrischale,

wurden rechts und links zwei parallele Striche des zu untersuchenden Antagonisten (Bakterien und Pilze) von einem Rand der Petrischale zum nächsten ausgestrichen.

Die Platten wurden anschließend bei 20 °C im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung erfolgte sobald das Myzel des phytopathogenen Pilzes in den Kontrollplatten (ohne Antagonist) den Rand der Petrischale erreicht hatte.

Auswertung:



Berechnung der durchschnittlichen Reduktion in Prozent:

$$\frac{\text{Kontrolle} - \text{Behandelt}}{\text{Kontrolle}} \times 100$$

Kontrolle = Myzelwachstum des Pathogens ohne Antagonist

Behandelt = Myzelwachstum des Pathogens mit Antagonist

Myzelwachstum = Mittelwert von X+Y

(Anandhakumar und Zeller, 2008)

### 3.2 Kompatibilitäts-Test ausgewählter Mikroorganismen bzw. Präparate

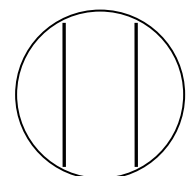
Basierend auf den Ergebnissen des Kapitel 3.1 wurden 15 Mikroorganismen ausgewählt und ihre Kompatibilität *in vitro* untersucht. Im folgenden Schritt wurden von den 15 Mikroorganismen vier selektiert, und ihre Kompatibilität nach Mischung geprüft.

#### 3.2.1 *In vitro* Tests

Zuvor wurden die pilzlichen Antagonisten auf den Agarmedien MPA, OMA und PDA bei 25 °C angezogen, die bakteriellen Antagonisten in Erlenmayer Kolben mit TSB Medium auf einem Horizontalschüttler (Novotron, Infors, CH) bei 25 °C und 150 UPM kultiviert. Die Versuche zur Kompatibilität wurden anschließend auf V8-Agarmedium durchgeführt.

#### -Pilzlicher und bakterielle Antagonist gegen pilzliche Antagonisten

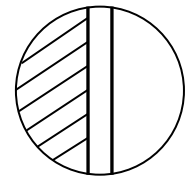
Die beiden Antagonisten wurden jeweils 3 cm vom Rand der Petrischale (links/rechts) mit der Impföse ausgestrichen.





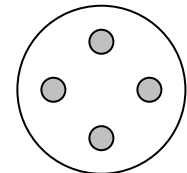
### -Bakterieller Antagonist gegen pilzliche Antagonisten

50 µL bakterieller Antagonist wurde auf der Hälfte der Petrischale mit dem Drigalski-Spatel ausplattiert. Der pilzliche Antagonist wurde wie oben beschrieben ausgestrichen.



### -Bakterieller Antagonist gegen bakterielle und pilzliche Antagonisten

Ein Antagonist wurde auf der gesamten Platte ausplattiert (100 µL) und der zweite Antagonist über vier Tropfen (je 15 µL) auf der Platte ausgebracht.



Für die Bonitur wurde die Bildung von Hemmhöfen bonitiert.

### 3.2.2 *In vitro* Tests in Kombination zweier Mikroorganismen

Die Pilze wurden von der Agarplatte abgeschwemmt und auf eine Konzentration von  $10^5$  Konidien/mL eingestellt, das Bakterium wurde einen Tag in TSB Medium bei 25 °C und 150 rpm fermentiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen zentrifugiert und das Pellet in 50 mL physiologischer Lösung (0,9% NaCl) resuspendiert. In einem ersten Versuch wurden 100 µL der Antagonisten auf einer Seite einer PDA Agarplatte ausplattiert (zwei Antagonisten pro Platte) und nach 5 Tagen das Wachstum gemessen. In einem zweiten Versuch wurden die Antagonisten in verschiedenen Verhältnissen, (siehe Tabelle 2) gemischt. Danach wurden 100 µL der Antagonisten-Suspension oder deren Mischung in 96 well Mikrotiterplatten bei 24 °C inkubiert. Anschließend wurde das Wachstum der Antagonisten über einen Zeitraum von acht Tagen mittels Bestimmung der optischen Dichte bestimmt. In einem weiteren Versuch wurde noch PDB (90 µL Antagonisten-Suspension mit 10 µL PDB gemischt) als Nährmedium zugegeben.

Tabelle 2: Mischungsverhältnis der verschiedenen Antagonisten

Bezeichnung	<i>B. subtilis</i> FZB24	<i>T. atroviride</i> P1	<i>T. harzianum</i> T58	<i>M. anisopliae</i> Ma43
P		100%		
T			100%	
F	100%			
M				100%
X	25%	25%	25%	25%
P+T		50%	50%	
P+F	50%	50%		
P+M		50%		50%
T+F	50%		50%	
T+M			50%	50%
F+M	50%			50%
P+T+F	33%	33%	33%	
P+T+M		33%	33%	33%
P+F+M	33%	33%		33%
T+F+M	33%		33%	33%

### **3.2.3 Ad planta Versuche**

Versuche zur Kombinierbarkeit wurden in die Versuche zur Wirksamkeit der antagonistischen Mikroorganismen integriert. So konnte eine praxisnahe Testung erfolgen und es musste nicht nur auf *in vitro* Versuche zurückgegriffen werden. Während das Feld 1 nicht künstlich mit Pathogenen inokuliert wurde, wurde Feld 2 während der Pflanzung sowohl mit *P. cactorum* als auch mit *V. dahliae* inokuliert. Die entsprechenden Methoden sind in Kapitel 3.4.1 beschrieben.

Im Jahr 2011 wurden Kompatibilitätsversuche mit Erdbeersämlingen durchgeführt. Dazu wurden Erdbeersamen der cv. Rügen auf feuchtes Handtuchpapier in einer Gerda Schale mit Wasser zum Keimen gebracht. Danach wurden die zwei Wochen alten Sämlinge auf 1 %igem Wasseragar in 24 well Mikrotiterplatten überführt und 10 µL der Antagonisten-Suspension bzw. deren Mischungen dazugegeben. Nach einer Monat Inkubation bei 20 °C und 16/8 h Beleuchtung wurde der prozentuale Anteil gestorbener Pflanzen bonitiert.

### **3.3 Interaktionen im System "Präparat-Schaderreger-Wirtspflanze" – Gewächshausversuche**

Die Erdbeerpflanzen wurden als Frigo-Pflanzen bezogen. Nach dem Kauf wurden diese bis zur Pflanzung im Kühlraum bei 4 °C gelagert. Für die Versuche mit *V. dahliae* wurde die Sorte Honeoye und für Versuche mit *P. cactorum* die Sorte Sonata verwendet (die jeweilige Sorte wird laut Sortenbeschreibung als sehr empfindlich für die jeweilige Krankheit angegeben).

#### **3.3.1 Versuche in 2010**

##### **3.3.1.1 Vorbereitung der Antagonisten**

*T. atroviride* P1 und *T. harzianum* T58 wurden im Mini-Feststoff-Fermenter auf Hafer für 10 Tage bei 25 °C im Dunkeln fermentiert. Danach wurden die Konidien mit einer wässrigen Suspension von Tween 80 (0,01%) abgeschwemmt und eine Konzentration von 10<sup>5</sup> Konidien/mL eingestellt. Um eine gleiche Konidienqualität sicherzustellen, wurde für jede Behandlung frisch produziert. *M. anisopliae* Ma43 wurde im Prophyta-Laborfeststoff-Fermenter auf einem 5:1 Reis-Hafer-Gemisch für 14 Tage bei 25 °C im Dunkeln fermentiert. Die Körner wurden mit einer Maschenweite von 150 µm gesiebt und als Konidienpulver im Kühlschrank bei 5 °C gelagert. Für die Versuche wurden diese mit Tween 80 (0,1%) auf 10<sup>5</sup> Konidien/mL eingestellt.

FZB24® wurde als RhizoPlus® (*B. subtilis*-FZB24) von der Firma ABITEP bezogen und entsprechend der Produktinformationen verwendet.

Es wurde ein Gemisch aus den vier Antagonisten mit jeweils 25% der Aufwandmenge hergestellt.

### **3.3.1.2 Vorbereitung der Pathogene**

Zur Produktion von MS wurde *V. dahliae* ca. eine Woche in einem Flüssigmedium (CD) bei 25 °C und 150 rpm kultiviert. Mit dieser Vorkultur wurde ein Quarzsand-Roggenmehl-Gemisch angeimpft und für 4 bis 6 Wochen bei 20 °C im Dunkeln bebrütet (Heitmann, pers. Mitteilung). Die entstandene MS/Sand Mischung wurde anschließend getrocknet und durch ein 1 mm Sieb gesiebt. Für die Versuche wurde dieses Gemisch noch auf 1:1000 mit Sand verdünnt.

### **3.3.1.3 Vorbereitung der Gewächshaus-Versuche**

1 kg Pflanzerde wurde mit 10 g *V. dahliae* MS/Sand Mischung vermengt und in die Pflanztöpfe gegeben. Dies entspricht einer Konzentration von 10 MS pro g Boden. Die Wurzeln der Erdbeerpflanzen (cv. Honeoye) wurden durch eine Tauchbehandlung 15 Minuten in der Antagonisten-Suspension vorbehandelt und anschließend gepflanzt. Für jede Behandlung wurden 6 Töpfe vorbereitet. Alle 14 Tage (4 malige Applikation) wurde zusätzlich eine Gießbehandlung mit 250 mL Antagonisten-Suspension ( $10^5$  Konidien/ml) pro Pflanze durchgeführt. FZB24® wurde in einer Konzentration entsprechend der Produktbeschreibung eingesetzt. Der Versuch wurde bei 20 °C Bodentemperatur und einen Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 Stunden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch visuelle Bewertung des Rhizombefalls nach Befallsklassen (0-3) sowie der Bestimmung der MS-Konzentration im Substrat mit Hilfe der Nasssiebmethode (nach Neubauer und Heitmann, 2011).



Abbildung 1: Befallsklassen für Rhizombefall. Von links nach rechts: 0 (nicht infiziert), 1, 2 und 3

Es wurden folgende drei Wiederholungen angesetzt:

Wdh 1	Angesetzt am 18.11.2010	Ausgewertet am 21.04.2011
Wdh 2	Angesetzt am 02.12.2010	Ausgewertet am 05.05.2011
Wdh 3	Angesetzt am 16.12.2010	Ausgewertet am 19.05.2011

### **3.3.2 Versuche in 2011**

#### **3.3.2.1 Vorbereitung der Antagonisten**

Die Antagonisten wurden wie für die Versuche in 2010 angezogen (siehe Kapitel 3.3.1.1). Allerdings wurden diese zu Beginn der Versuche produziert und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Routinemäßig wurde die Keimfähigkeit bestimmt. Für die Versuche wurde eine Konzentration von  $10^5$  keimfähige Konidien /mL eingestellt.

#### **3.3.2.2 Vorbereitung der Pathogene**

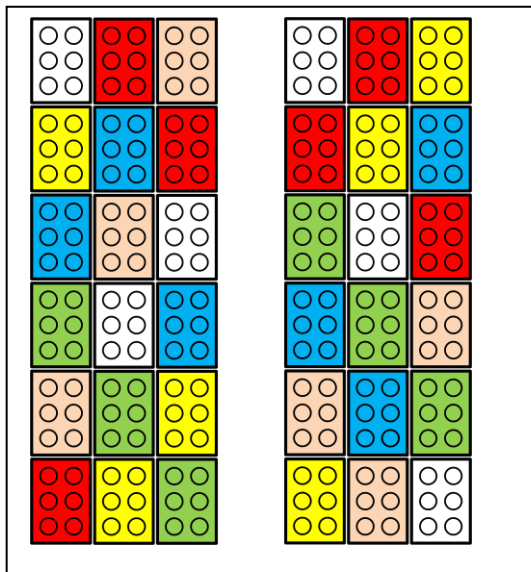
Im Gegensatz zu den Versuchen in 2010 wurden in 2011 zur Inokulation mit *V. dahliae* nicht MS sondern Konidien verwendet, da sich diese schneller produzieren lassen. Hierfür wurde *V. dahliae* ca. eine Woche bei 20 °C auf dem Horizontalschüttler in CD Flüssigmedium angezogen. Die Konzentration wurde auf  $10^5$  Konidien/mL eingestellt.

*P. cactorum* wurde auf Roggen- $\beta$  Sitosterol-Agar für 14 Tage bei 20 °C kultiviert und bis zur Verwendung bei 15 °C gelagert und vor Anwendung mit sterilem 0,01% Tween 80 abgeschwemmt und auf eine Konzentration von  $10^5$  Sporen/mL eingestellt.

#### **3.3.2.3 Vorbereitung der Gewächshausversuche**

Die Erdbeerpflanzen wurden durch eine Tauchbehandlung 15 Minuten in der Antagonisten-Suspension vorbehandelt. Anschließend wurden sie in Null-Erde gepflanzt, nachdem 1 mL Pathogen-Suspension auf die Wurzel pipettiert wurde. Für jede Behandlung wurden 6 Töpfe vorbereitet. Alle 14 Tage (4 malige Applikation) wurde zusätzlich eine Gießbehandlung mit 250 mL Antagonisten-Suspension ( $10^5$  Konidien/mL) pro Pflanze durchgeführt. FZB24® wurde in einer Konzentration entsprechend der Produktbeschreibung eingesetzt. Der Versuch wurde bei 20 °C Bodentemperatur und mit einem Tag/Nacht Rhythmus von 16/8 Stunden durchgeführt (Abbildung 2). Bei Bedarf wurde bewässert und zweimal mit Compo® Naturabell Pflanzendünger, der für ökologischen Landbau geeignet ist, gedüngt.

Folgende Parameter wurden erfasst: Pflanzenfrischgewicht; Länge und Frisch- bzw. Trockengewicht der Wurzeln, Anzahl der Blätter, Blattoberfläche (mit einer Schablone und in 7 Klassen unterteilt) sowie Aussehen; Anzahl Blattstängel sowie deren Länge und Aussehen; Frisch- und Trockengewicht von Blättern und Stängel; Anzahl und Frisch- bzw. Trockengewicht von Ablegern und Gewicht und Aussehen des Rhizoms. Um die Bildung von MS zu erfassen wurden zusätzlich Bodenproben von den mit *V. dahliae* inokulierten Pflanzen genommen und getrocknet.



Rot: Kontrolle  
 Blau: FZB24®  
 Rosa: *T. atroviride* P1  
 Grün: *T. harzianum* T58  
 Gelb: *M. anisopliae* Ma43  
 Weiß: Mixture

Von links nach rechts

- 1: Wdh 2; cv. Sonata; Pathogen: *P. cactorum*
- 2: Wdh 3; cv. Sonata; Pathogen: *P. cactorum*
- 3: Wdh 3; cv. Honeoye; Pathogen: *V. dahliae*
- 4: Wdh 1; cv. Sonata; Pathogen: *P. cactorum*
- 5: Wdh 2; cv. Honeoye; Pathogen: *V. dahliae*
- 6: Wdh 1; cv. Honeoye; Pathogen: *V. dahliae*

Abbildung 2: Versuchsaufbau der Gewächshausversuche

Wdh 1	Angesetzt am 29.06.2011	Ausgewertet am 26.10.2011
Wdh 2	Angesetzt am 13.07.2011	Ausgewertet am 09.11.2011
Wdh 3	Angesetzt am 27.07.2011	Ausgewertet am 23.11.2011

### 3.4 Wirksamkeit ausgewählter Präparate im Freiland

#### 3.4.1 Freilandversuche in 2010

In 2010 wurden zwei Versuche auf den Versuchsfeldern des Instituts vorbereitet (Abbildung 4). Auf den Flächen wurden zusätzlich Bodentemperatur und Niederschlag erfasst. Die Antagonisten wurden wie in Kapitel 3.3.1.1 und *V. dahliae* wie in Kapitel 3.3.1.2 beschrieben vorbereitet; *P. cactorum* wurde auf Roggen-Sitosterol-Agar kultiviert, mit 0,01% Tween 80 abgeschwemmt und auf eine Konzentration von  $10^5$  Sporen/mL eingestellt. Für Versuche zur Wirksamkeit ausgewählter Antagonisten im Freiland wurden zu unterschiedlichen Terminen zwei Felder vorbereitet.

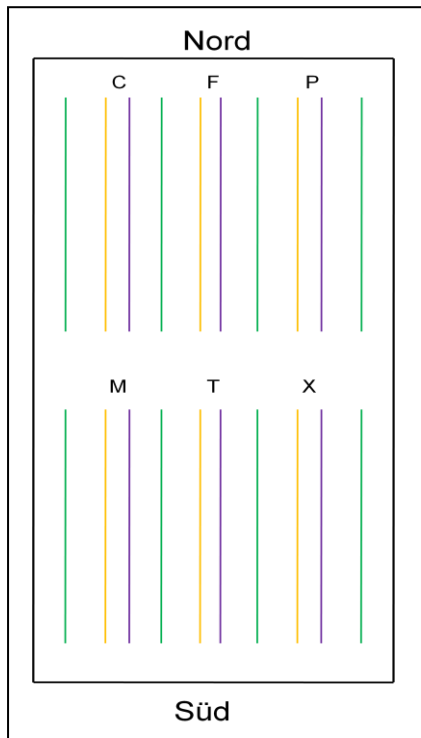
Feld 1: Der Standort wurde gewählt, weil auf dieser Parzelle schon in der Vergangenheit Versuche mit *P. cactorum* durchgeführt wurden und somit davon ausgegangen wurde, dass *P. cactorum* natürlich im Boden vorkommt. Die Versuchspflanzen wurden vor Auspflanzung für 15 Minuten in die jeweilige Antagonisten-Suspension getaucht. Als Kontrolle diente Leitungswasser. Nach Pflanzung erfolgte bei jeder Parzelle alle 14 Tage über einen Zeitraum von acht Wochen eine Gießbehandlung mit 10 L Antagonisten-Suspension je Parzelle ( $10^5$  Konidien/mL). Bei Bedarf wurde die gesamte Versuchsfläche mit Leitungswasser beregnet. Auf dieser Fläche wurde die Bodentemperatur in 10 und 20 cm Tiefe gemessen. Die Auswertung

erfolgte nach einem Jahr. Hierfür wurde anhand der unten aufgeführten Boniturskala die Vitalität von jeder Pflanze (n= 25 bis 30 Pflanzen pro Variante) visuell erfasst. Mit Hilfe der Nasssiebung wurde die MS-Konzentration des Krankheitserregers *V. dahliae* im Boden zu Versuchsbeginn erfasst (nach Neubauer und Heitmann, 2011). Da davon ausgegangen werden kann, dass sich der Wirkungsmechanismus der einzelnen Mikroorganismen unterscheiden, sollte über eine Mixture-Variante geprüft werden, ob diese im Vergleich zur Behandlung mit einem Antagonisten eine erhöhte Pflanzenvitalität erbringt. Zusätzlich sollten über diese Behandlung Hinweise einer Kompatibilität erhalten werden.



Abbildung 3: Boniturskala zur Erfassung der Vitalität: 1 (links) bis 5 (rechts), 1= vital bis 5= tot

Feld 2: Die Versuchspflanzen wurden vor Pflanzung für 15 Minuten in der Antagonisten-Suspension getaucht. Als Kontrolle diente Leitungswasser. Um sicherzustellen, dass die Krankheitserreger auch wirklich in der Parzelle vorhanden sind, wurde zusätzlich eine künstliche Pathogen-Inokulation durchgeführt. Die MS von *V. dahliae* wurden mit Quarzsand vermischt und anschließend in den Pflanzgraben gestreut. Es wurde mit Konzentrationen inokuliert, die auch für die Topfversuche im Gewächshaus verwendet wurden. Für *P. cactorum* wurden 10 L der Suspension pro Variante in den Pflanzgraben gegossen. Wie auf Feld 1 erfolgte bei jeder Parzelle alle 14 Tage über einen Zeitraum von acht Wochen eine Gießbehandlung mit 10 L Antagonisten-Suspension je Parzelle. Bei Bedarf wurde mit Leitungswasser bewässert. Die Auswertung erfolgte nach neun Monaten indem die Vitalität der Pflanze bonitiert wurde. Zusätzlich wurden zur Bestimmung der MS-Konzentration an zwei verschiedenen Zeitpunkten (im Herbst und im nächsten Frühling) Bodenproben genommen.



Grün: nicht behandelt

Violett: Honeoye

Orange: Sonata

C: Kontrolle

F: FZB24®

P: *T. atroviride* P1

T: *T. harzianum* T58

M: *M. anisopliae* Ma43

X: Mixture

Feld 1: Angesetzt am 16.06.2010

Ausgewertet vom 09 bis 14.06.2011

Feld 2: Angesetzt am 06.09.2010

Ausgewertet vom 23 bis 25.05.2011

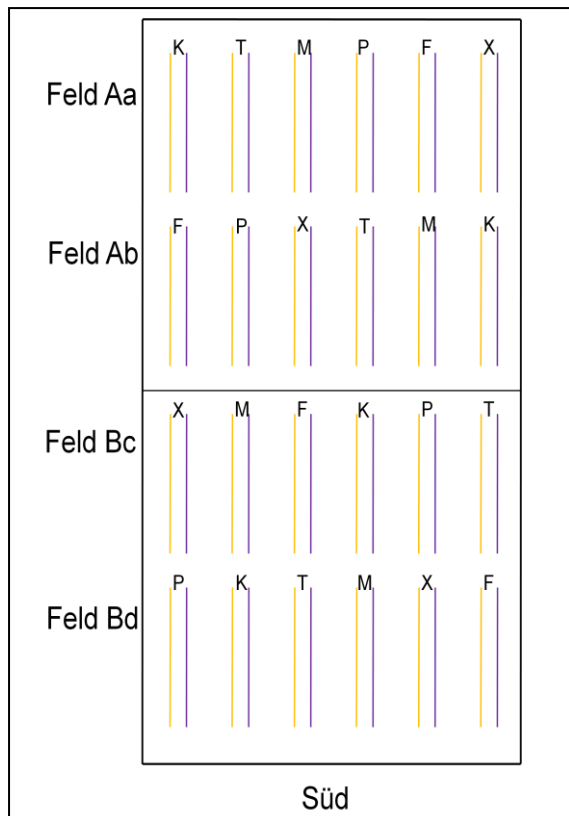
Abbildung 4: Versuchsaufbau Feld 1 und Feld 2 (2010)

### 3.4.2 Freilandversuche in 2011

Für die Freilandversuche 2011 wurde wie in 2010 vorgegangen, wobei sich die Felder A und B dahingehend unterschieden, dass im Feld A (a und b) die Pilze mit  $10^5$  keimfähigen Sporen/mL und FZB24® nach Gebrauchsanweisung ausgebracht wurden und im Feld B (c und d) eine zehnfach höhere Konzentration verwendet wurde (Abbildung 5).

Die Antagonisten und Pathogene wurden wie in Kapitel 3.3.2.1 und 3.3.2.2 beschrieben hergestellt. *P. cactorum* wurde auf Roggen-Sitosterol-Agar kultiviert, mit sterilem 0,01% Tween 80 abgeschwemmt und auf eine Konzentration von  $10^5$  Sporen/mL eingestellt.

Die Versuchspflanzen (15 Pflanzen pro Wiederholung mit 2 Wiederholungen pro Aufwandmenge) wurden vor Pflanzung für 15 Minuten in der Antagonisten-Suspension getaucht. Als Kontrolle diente Leitungswasser. Zusätzlich wurde eine künstliche Pathogen-Inokulation durchgeführt. Die MS von *V. dahliae* wurden mit Quarzsand vermischt und anschließend in den Pflanzgraben gestreut. Für *P. cactorum* wurde 1 mL der Suspension auf die Wurzel gegeben.



Violett: Honeoye

Orange: Sonata

C: Kontrolle

F: FZB24®

P: *T. atroviride* P1

T: *T. harzianum* T58

M: *M. anisopliae* Ma43

X: Mixture

Feld A            Angesetzt am 29.06.2011

Feld B            Angesetzt am 14.07.2011

Abbildung 5: Versuchsaufbau der Freilandversuche 2011

Wie auf Feld 1 und 2 (im Jahr 2010) erfolgte bei jeder Parzelle alle 14 Tage über einen Zeitraum von acht Wochen eine Gießbehandlung mit 10 L Antagonisten-Suspension je Parzelle. Bei Bedarf wurde mit Leitungswasser bewässert. Die Auswertung folgte nach ein, zwei und sechs Monaten. Nach einem Monat wurde das Wachstum (Abbildung 6) und die Anzahl der blühenden und/oder fruchttragenden Pflanzen, nach zwei Monaten die fruchttragenden Pflanzen und nach sechs Monaten (Winter 2011) die Vitalität der Pflanzen bonitiert.



Abbildung 6: Boniturschema zur Erfassung des Wachstums: Boniturnote 1 (große Pflanze), 2 (normal), 3 (kleine Pflanze) und 4 (sehr kleine Pflanze). Boniturnote 5 tote Pflanze



### **3.5 Erprobung unter Praxisbedingungen**

Für Versuche im Rahmen des BÖL Projektes 06OE148 wurde der *M. anisopliae*-Stamm Ma43 zur Anwendung gegen den Erdbeerblütenstecher am JKI produziert und für Versuche bereitgestellt. Zur Regulierung der *Verticillium*-Welke wurde im oben aufgeführten Projekt das Produkt Trichostar (*T. harzianum* T58) getestet. Beide Mikroorganismen hatten im Labor gegen *V. dahliae* gute Resultate erzielt. Um die eventuelle Wirkung des Stamms von *M. anisopliae* Ma43 auf *V. dahliae* zu prüfen, wurde zusätzlich für den Projektpartner Bodenproben nach *V. dahliae* MS getestet. In der Projektphase wurden keine weiteren Versuche unter Praxisbedingungen durchgeführt.

## 4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

### 4.1 Labortests zur Wirksamkeit mikrobiologischer Präparate: Dualkultur

Die detaillierten Ergebnisse der Labortests sind im Anhang aufgeführt. Insgesamt wurden 98 Mikroorganismen verglichen. In Abbildung 7 und Abbildung 8 sind die Ergebnisse der 25 wirksamsten Mikroorganismen der Dual-Kulturen mit den vier Pathogenen dargestellt.

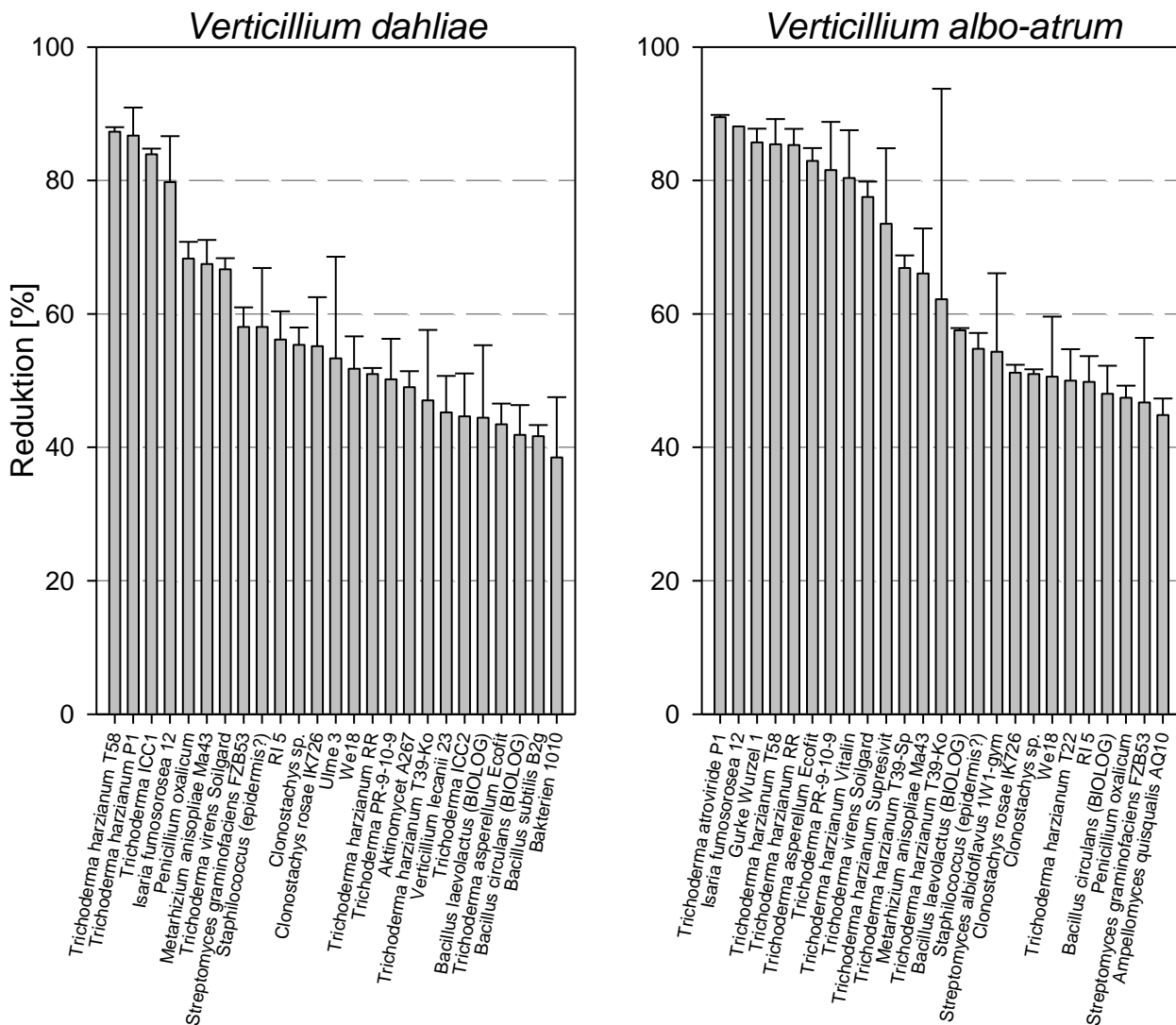


Abbildung 7: Hemmende Wirkung potentieller Antagonisten gegen *Verticillium* sp. in Dualkultur. Mittelwert und Standardabweichung (Fehlerbalken) aus drei zeitlich unabhängigen Wiederholungen

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sich das antagonistische Potential der einzelnen Mikroorganismen in diesem Testsystem sehr stark unterscheidet. Nur ca. 20% der untersuchten Isolate konnten eine Wachstumshemmung von bis zu 50% erzielen. Versuche mit *V. dahliae* und *P. cactorum* verliefen ähnlich, auch wenn die Reduktion geringfügig niedriger ausfiel. Bei *P. fragariae* var. *fragariae* zeigte die überwiegende Zahl an Antagonisten eine Hemmwirkung von über 90%. Besonders der Pilz *Trichoderma* spp. erwies sich gegen alle vier untersuchten

Pathogene als besonders wirksam. Die detaillierten Ergebnisse der Labortests sind im Anhang aufgeführt.

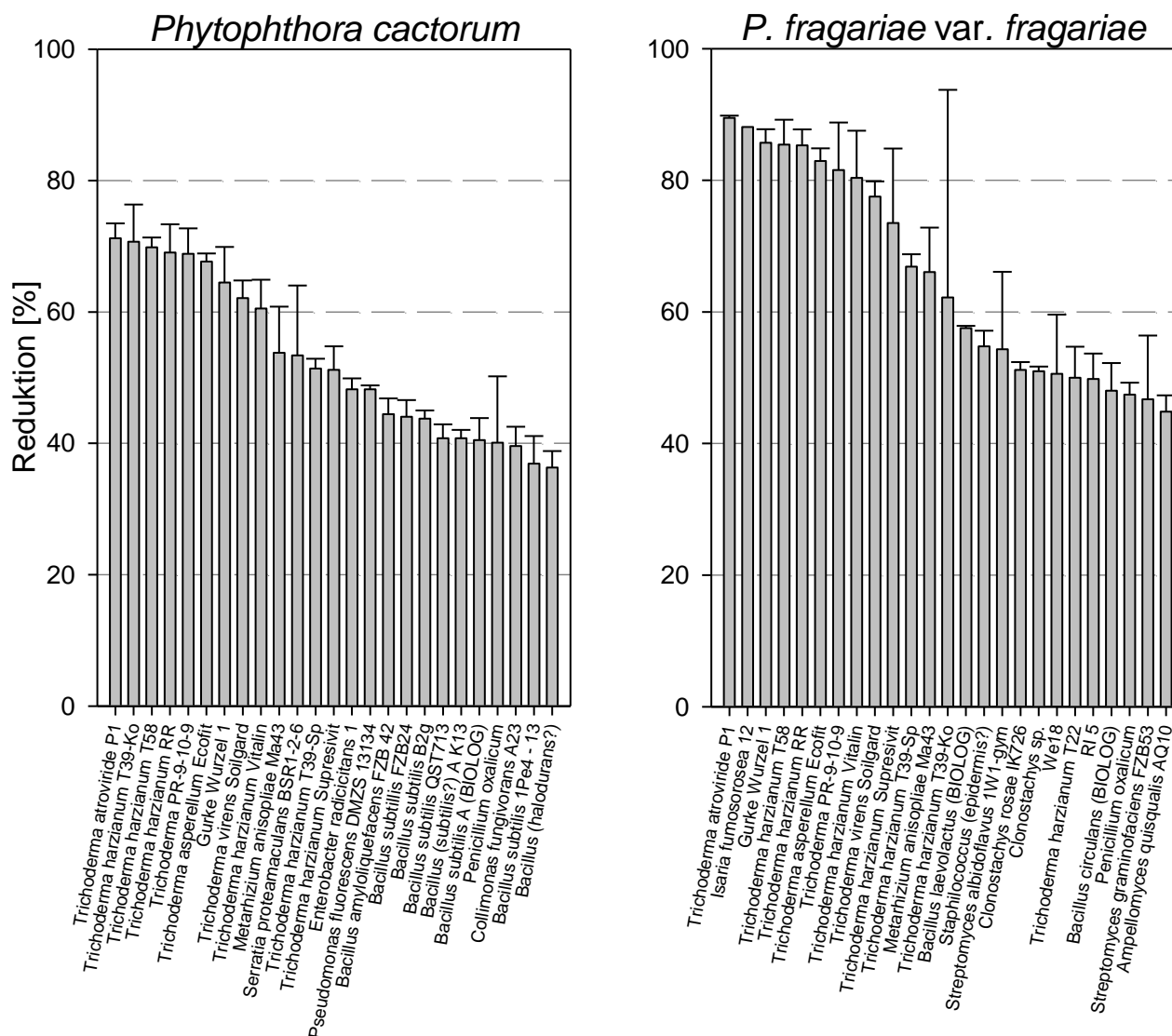


Abbildung 8: Hemmende Wirkung potentieller Antagonisten gegen *Phytophthora* sp. in Dualkultur. Mittelwert und Standardabweichung (Fehlerbalken) aus drei zeitlich unabhängigen Wiederholungen

Von diesen Ergebnissen ausgehend, wurden 15 Isolate für weitere Untersuchungen ausgewählt. Hierfür wurden die 15 wirksamsten Isolate, die mindestens gegen zwei Pathogene eine Wirkung zeigten (ausschließlich pilzliche Antagonisten) sowie bakterielle Antagonisten, die als Produkt verfügbar sind und laut Produzent eine *ad planta* Wirkung gegen die Gattung *Verticillium* aufwiesen, selektiert. Zusätzlich wurde das Isolat *Pseudomonas fluorescens* Pf153 mit in die Untersuchungen aufgenommen, da dieser Organismus in den letzten Jahren intensiv am Institut untersucht wurde.

Tabelle 3: Ausgewählte Mikroorganismen und deren Hemmwirkung gegen die Phytopathogene

	Ordnungszahl*			
	<i>V. dahliae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>
<b>Antagonist</b>				
<i>Bacillus amyloliquefacens</i> FZB42	37	35	16	4
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	40	30	17	21
<i>Clonostachys rosae</i> IK726	12	17	89	19
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma43	6	12	10	1
<i>Isaria fumosorosea</i> 12	4	2	98	4
<i>Penicillium oxalicum</i>	5	23	22	12
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf153	79	82	39	3
<i>Serratia plymuthica</i> HRO-C48	36	59	48	1
<i>Trichoderma asperellum</i>	22	6	6	1
<i>Trichoderma atroviride</i> P1	2	1	1	1
<i>Trichoderma harzianum</i> T39	18	13	2	1
<i>Trichoderma harzianum</i> T58	1	4	3	1
<i>Trichoderma</i> PR-9-10-9	16	7	5	10
<i>Trichoderma virens</i>	7	9	8	1
<i>Trichoderma harzianum</i> RR	15	5	4	1

\*Die Hemmwirkung aller getesteten Mikroorganismen wurde für jeden Krankheitserreger der Größe nach sortiert, der am besten Wirksame bekam die Ordnungszahl 1 der mit der geringsten Hemmung die Zahl 98. In grüner Schrift sind die für weitere Versuche ausgewählten Mikroorganismen geschrieben.

## 4.2 Kompatibilitäts-Test ausgewählter Mikroorganismen bzw. Präparate

### 4.2.1 *In vitro* Tests

Für die Kompatibilitätstest wurden Isolate verwendet, die gegen die zwei bedeutenderen Pathogene *V. dahliae* und *P. cactorum* eine hemmende Wirkung aufwiesen, d.h. 15 Kandidaten (4 Bakterien und 11 Pilze) wurden untersucht, von denen 7 als Produkte auf den Markt erhältlich sind. In Abbildung 9 sind beispielhaft die Dualkulturen zum Teil mit deutlichen Hemmzonen dargestellt.

Diese Versuche waren allerdings nur über eine visuelle Bonitur auswertbar, quantifizierbare Daten konnten nicht ermittelt werden. Die Ergebnisse ergaben (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**), dass die zwei untersuchten *Bacillus*-Stämme gerade pilzliche Antagonisten hemmten, pilzliche Antagonisten beeinflussten sich in manchen Fällen. Bei Bakterien vs Bakterien waren nur Hemmungen zwischen *Ps. fluorescens* Pf153 und *Serratia plymuthica* HRO-C48 nachweisbar. Im Fall Bakterien vs Pilz waren Hemmungen sichtbar. Wurde das Bakterium ausplattiert und der Pilz punktuell auf den Agar appliziert, bildete der antagonistische Pilz eine Kolonie. In manchen Fällen waren auch Hemmhöfe zu erkennen (z.B.

bei *T. virens* aus Soilguard reisoliert) oder der Pilz breitete sich wie ein Rasen aus (*T. harzianum* T39 aus Trichodex reisoliert).

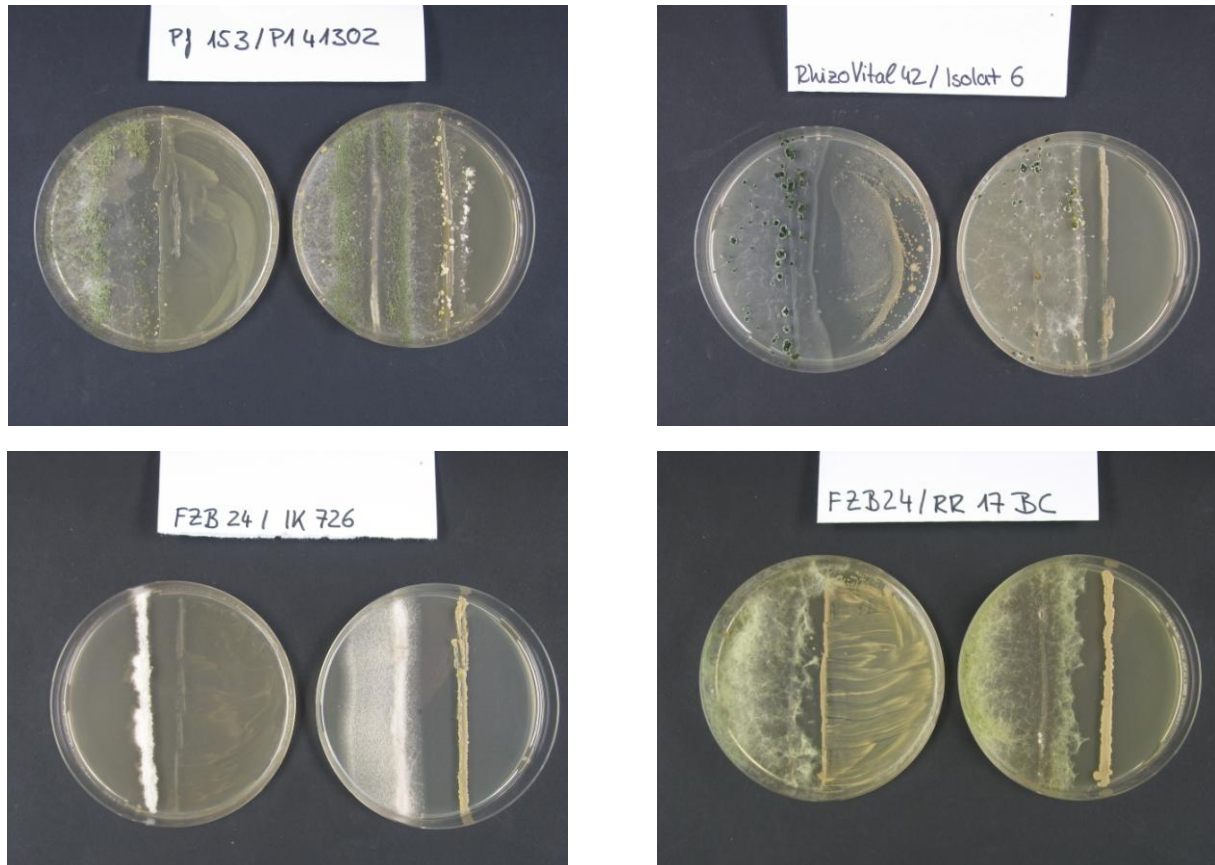


Abbildung 9: *In vitro* Kompatibilitätsuntersuchungen verschiedener potentieller Antagonisten. Auf jeder Petrischale sind zwei unterschiedliche Isolate aufgetragen. In Abhängigkeit von den Isolaten ist eine hemmende Wirkung sichtbar. Bakterien wurden entweder flächig (links) oder strichförmig (rechts) ausplattiert.

Tabelle 4: Untersuchungen zur Verträglichkeit von 15 ausgewählten Mikroorganismen (- = keine Hemmung, + = Wachstum mit geringer Hemmzone zwischen den Isolaten, ++ = mindestens ein Isolat ist im Wachstum gehemmt). In grüner Schrift sind die für weitere Versuche ausgewählten Mikroorganismen geschrieben.

<i>Bacillus amyloliquefacens</i> FZB42																		
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	-																	
<i>Clonostachys rosae</i> IK726	+	++																
<i>Isaria fumosorosea</i> 12	+	+	+															
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma43	+	++	+	+														
<i>Penicillium oxalicum</i>	-	++	-	-	-													
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf153	-	-	n.a.	+	+	+												
<i>Serratia plymuthica</i> HRO-C48	-	-	-	-	-	-	++											
<i>Trichoderma asperellum</i>	++	+	n.a.	-	-	-	-	+										
<i>Trichoderma atroviride</i> P1	+	+	-	+	-	-	-	+	-									
<i>Trichoderma harzianum</i> RR 17BC	-	-	+	-	+	n.a.	-	-	n.a.	+								
<i>Trichoderma harzianum</i> T39	++	+	-	+	-	-	-	+	-	-								
<i>Trichoderma harzianum</i> T58	-	+	+	+	+	n.a.	++	++	-	-	+	+						
<i>Trichoderma</i> PR-9-10-9	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	n.a.					
<i>Trichoderma virens</i>	++	+	n.a.	+	+	-	-	-	-	-	+	-	n.a.	-				
	<i>Bacillus amyloliquefacens</i> FZB42	<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	<i>Clonostachys rosae</i> IK726	<i>Isaria fumosorosea</i> 12	<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma43	<i>Penicillium oxalicum</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf153	<i>Serratia plymuthica</i> HRO-C48	<i>Trichoderma asperellum</i>	<i>Trichoderma atroviride</i> P1	<i>Trichoderma harzianum</i> RR 17BC	<i>Trichoderma harzianum</i> T39	<i>Trichoderma harzianum</i> T58	<i>Trichoderma</i> PR-9-10-9	<i>Trichoderma virens</i>			

#### 4.2.2 In vitro Tests zur Kombination zweier Mikroorganismen

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurden für diese Versuche vier Antagonisten ausgewählt:

- Isolat *T. atroviride* P1, da es gegen alle getesteten Pathogene am besten wirkte,
- *T. harzianum* T58 (Trichostar), das eine sehr gute Wirkung zeigte und als Produkt verfügbar ist,
- *B. subtilis* FZB24 (Rhizo Plus®), als bakterieller Antagonist mit geringstem Einfluss auf pilzliche Antagonisten,
- *M. anisopliae* Ma43, als insektenpathogener Pilz mit Wirkung gegen die Phytopathogene. *M. anisopliae* Ma43 wird laut Hersteller (Novozyme) demnächst als Produkt verfügbar sein und soll in Versuche zur Bekämpfung des Erdbeerblütenstecher getestet werden.

In ersten Versuchen mit den vier selektierten Mikroorganismen (*B. subtilis* FZB24, *T. atroviride* P1, *T. harzianum* T58, *M. anisopliae* Ma43) hemmte *B. subtilis* FZB24 deutlich *M. anisopliae* Ma43, weniger deutlich *T. atroviride* P1 und *T. harzianum* T58. Die drei Pilze zeigten keine Hemmzonen sondern wuchsen ineinander.

Anhand der optischen Dichte wurde das Wachstum der Mikroorganismen in Flüssigkultur untersucht. Diese nicht wiederholten Versuche lassen vermuten, dass die Etablierung der Mikroorganismen wesentlich von der Nährstoffverfügbarkeit abhängig ist. Wurden Nährstoffe dem Medium zugegeben (Abbildung 10), konnte gerade für *T. harzianum* T58 ein erhöhtes Wachstum beobachtet werden. Weiterhin konnte eine erhöhte optische Dichte und somit ein Mikroorganismenwachstum in Flüssigkultur ohne zusätzliche Nährstoffe gerade bei Kombinationen mit *B. subtilis* FZB24 beobachtet werden, nicht aber für die pilzlichen Antagonisten (Abbildung 11).

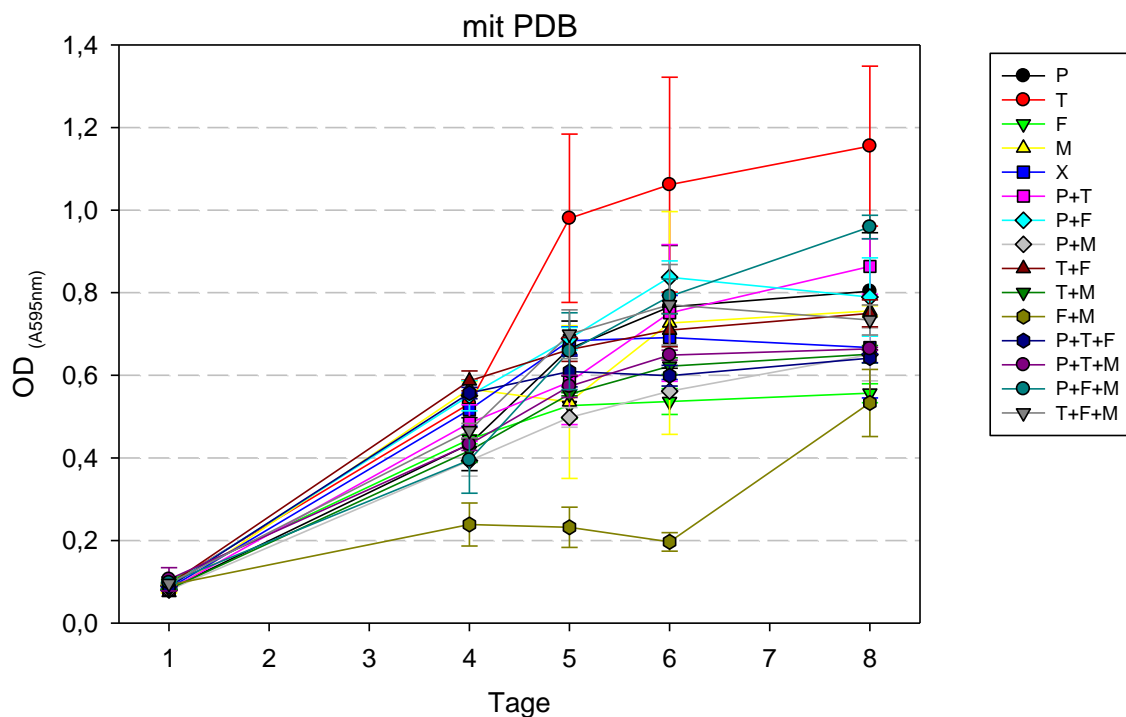


Abbildung 10: Wachstum ausgewählter Mikroorganismen in mit PDB angereicherten Flüssigkultur, alleine oder in Kombination

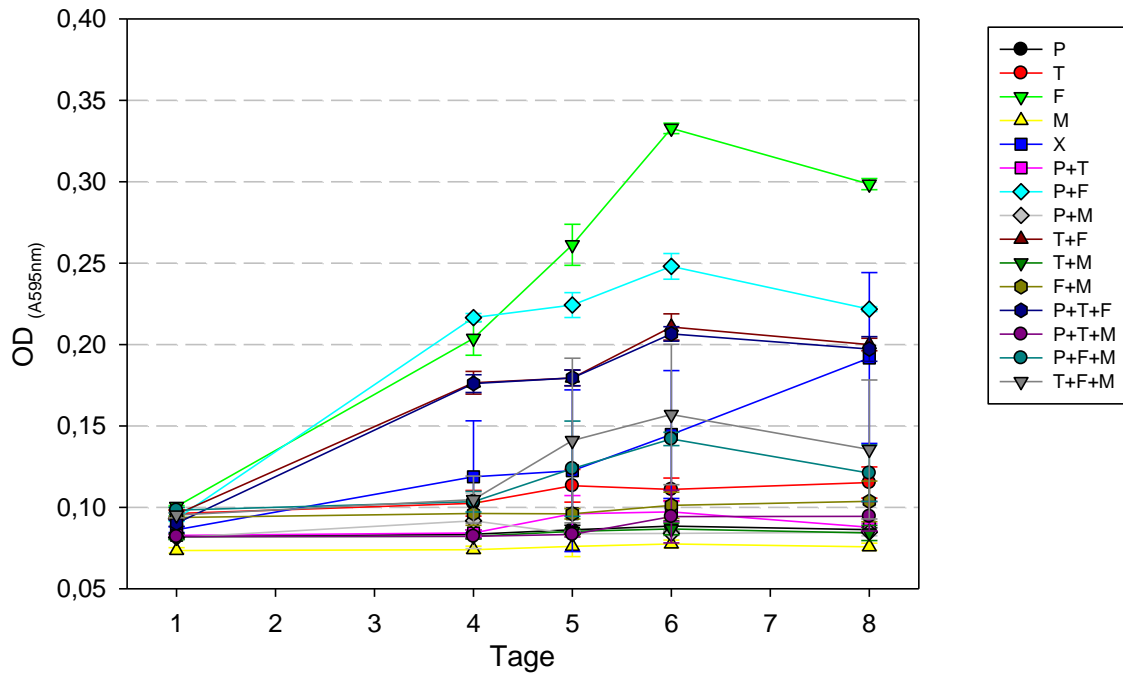


Abbildung 11: Wachstum ausgewählter Mikroorganismen in Flüssigkultur, alleine oder in Kombination

#### 4.2.3 Ad planta Versuche

Um die Wirksamkeit der vier ausgewählten Mikroorganismen und der Mischung zu vergleichen, wurden auf dem Versuchsfeld des Instituts in 2010 zwei verschiedene Versuche angelegt. Für die Versuche wurden zwei unterschiedliche Erdbeersorten mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber *V. dahliae* und *P. cactorum* verwendet. Abbildung 12 verdeutlicht, dass der natürliche Infektionsdruck nicht ausreichte, um einen sichtbaren Befall in der Kontrolle hervorzurufen. Die Versuche zeigen aber, dass nach Anwendung der Mixture in beiden Feldern die Anzahl der Pflanzen der Boniturnote 1 mit der Kontrolle vergleichbar war. Es ist somit nicht mit einer negativen Wirkung der Mixture auf die Pflanzengesundheit zu rechnen.



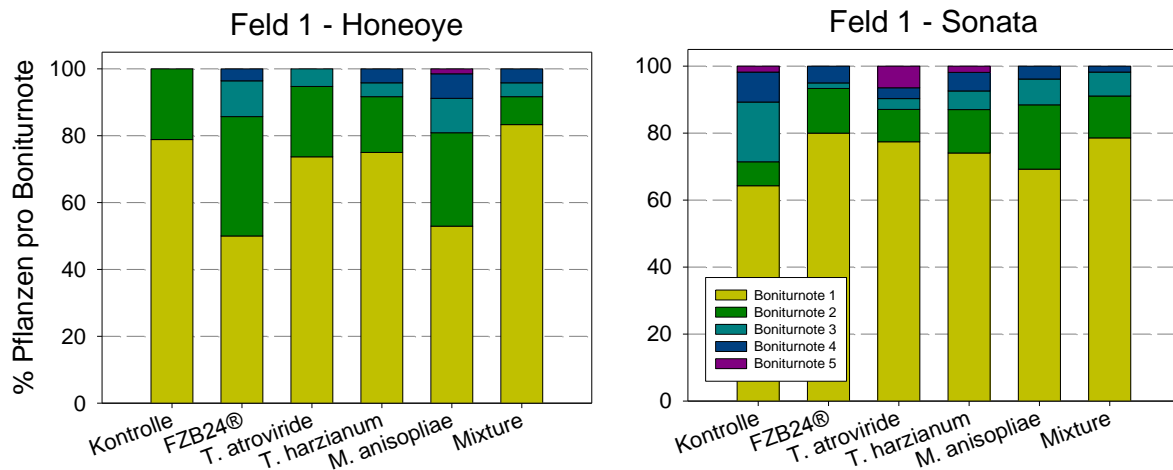


Abbildung 12: Visuelle Bonitur der Erdbeerpflanzen nach Behandlung mit verschiedenen Mikroorganismen ein Jahr nach Pflanzung

Abbildung 13 verdeutlicht, dass ein negativer Einfluss der ausgewählten Produkte auf Erdbeersämlinge bei alleiniger Anwendung unwahrscheinlich ist. Es starben nach Anwendung der Produkte weniger als 5% der Pflanzen ab. Auffällig war, dass bei Anwendung von *M. anisopliae* Ma43 in Kombination mit FZB24® 33% der Sämlinge abstarben.

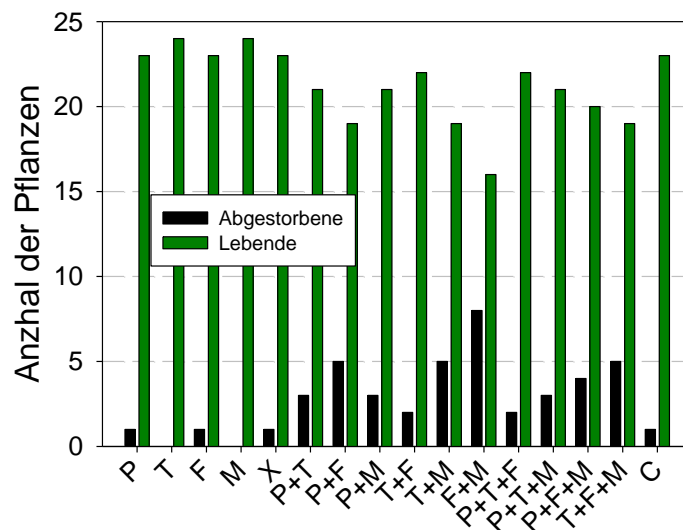


Abbildung 13: Einfluss der Antagonisten alleine oder in Kombination auf Erdbeersämlinge (P= *T. atroviride* P1, T= *T. harzianum* T58, M= *M. anisopliae* Ma43, F= FZB24®, X= Mixture, C= Kontrolle)

### 4.3 Interaktionen im System "Präparat-Schaderreger-Wirtspflanze" – Gewächshausversuche

Zur Untersuchung der Interaktionen im System "Präparat-Schaderreger-Wirtspflanze" wurden in 2010 Versuche mit *V. dahliae* und 2011 Versuche mit *V. dahliae* und *P. cactorum* im Gewächshaus durchgeführt.

#### 4.3.1 Versuche in 2010

Abbildung 14 zeigt, dass sich die MS-Konzentrationen im Boden der drei Wiederholungen deutlich voneinander unterscheiden. Schon in der Kontrolle wies die dritte Wiederholung eine deutlich niedrigere Konzentration an MS auf und für FZB24® konnte nur in der dritten Wiederholung eine deutliche Wirkung beobachtet werden.

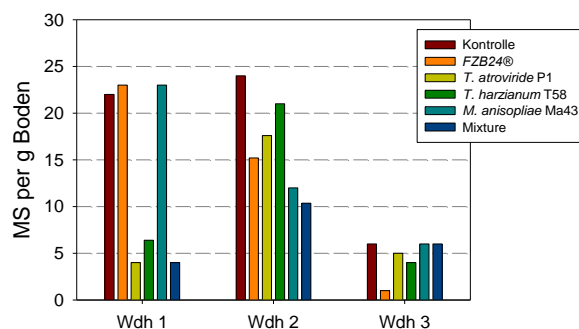


Abbildung 14: MS-Konzentration nach Applikation der Antagonisten zu Versuchsende. Der Versuch wurde zeitlich unabhängig dreimal durchgeführt.

Wurde der Rhizombefall bonitiert (Tabelle 5), so konnte nur in der Mixture-Variante eine Reduktion auf 33% Befall beobachtet werden. Wurden der Modalwert der Auswertung zugrunde gelegt, so wiesen die Behandlungen mit Mixture und *T. harzianum* T58 einen Modal von 1 auf und unterschieden sich deutlich von der Kontrolle und dem FZB24®.

Tabelle 5: Rhizombefall nach Inokulation mit *V. dahliae* und Behandlung ausgewählter Antagonisten im Gewächshaus

Behandlung	Wdh* 1	Wdh 2	Wdh 3	MW	Modal	% Werte ≥ 2
Kontrolle	0,5	2,5	2,1	1,7	3	56
FZB24®	2,3	1,3	2,0	1,9	3	61
<i>T. atroviride</i> P1	1,2	1,9	2,0	1,7	2	56
<i>T. harzianum</i> T58	0,7	2,5	1,7	1,6	1	44
<i>M. anisopliae</i> Ma43	0,9	2,2	2,5	1,9	3	61
Mixture	1,0	1,0	2,5	1,4	1	33

\* Pro Wiederholung wurde der Mittelwert aus sechs Pflanzen berechnet. Der Rhizombefall wurde vier Boniturstufen zugeordnet.

#### 4.3.2 Versuche in 2011

In den Gewächshausversuchen von 2011 zeigte sich, dass tendenziell in der Kontrolle die Wachstumsparameter am niedrigsten waren. Wurde mit *V. dahliae* inokuliert (Tabelle 6), deuten die Ergebnisse darauf hin, dass trotz einer Kontrollmortalität von nur 17% ein geringeres Wachstum zu beobachten war bzw. durch die Antagonisten eine Erhöhung hervorgerufen wurde. So konnte für *T. harzianum* T58 der höchste Biomassenanstieg und Wurzellänge beobachtet werden. Die Trockenmasse der Wurzeln war allerdings bei P1 am höchsten.

Die Versuche mit Inokulation von *P. cactorum* (Tabelle 7) fielen allerdings nicht eindeutig aus. Es konnte trotz künstlicher Inokulation keine Mortalität in der Kontrolle hervorgerufen werden. Auch konnte durch Anwendung der Mikroorganismen keine klare Steigerung des Wachstums erzielt werden. So konnte der niedrigste Biomassenanstieg für den insektenpathogenen Pilz Ma43 beobachtet werden.

Tabelle 6: Gewächshausversuche zur Wirkung verschiedener Antagonisten gegen *Verticillium dahliae* an Erdbeere

Behandlung	% Tote Pflanzen n=18	% Biomasse- anstieg	Aus- läufer	Pflanzen pro Ausläufer	Pflanzen Höhe (cm)	Trocken Masse Blätter (g)	Wurzel Länge (cm)	Trocken Masse Wurzeln (g)
Kontrolle	17	<b>51 (±12)</b>	<b>0,9</b>	<b>1,4</b>	<b>15,5 (± 4,6)</b>	<b>3,1 (± 1,6)</b>	<b>22,0 (± 4,9)</b>	<b>0,6 (± 0,5)</b>
FZB24®	6	63 (± 9)	<b>1,7</b>	<b>3,2</b>	18,3 (± 1,9)	4,7 (± 1,9)	26,3 (± 2,8)	1,1 (± 0,7)
<i>T. atroviride</i> P1	11	62 (± 9)	<b>0,9</b>	<b>1,2</b>	16,8 (± 2,8)	4,1 (± 1,6)	24,5 (± 7,5)	<b>1,2 (± 0,9)</b>
<i>T. harzianum</i> T58	0	<b>69 (± 6)</b>	<b>1,7</b>	2,8	19,1 (± 2,8)	4,8 (± 1,2)	<b>30,0 (± 4,3)</b>	0,9 (± 0,5)
<i>M. anisopliae</i> Ma43	0	64 (± 4)	1,3	2,6	<b>19,3 (± 2,1)</b>	<b>5,1 (± 1,8)</b>	27,5 (± 6,6)	0,9 (± 0,6)
Mixture	6	62 (± 4)	1,4	2,5	18,8 (± 2,5)	4,2 (± 1,7)	25,6 (± 4,7)	<b>0,6 (± 0,5)</b>

Mittelwert aus drei zeitlich unabhängigen Versuchen mit je sechs Pflanzen

Tabelle 7: Gewächshausversuche zur Wirkung verschiedener Antagonisten gegen *Phytophthora cactorum* an Erdbeere

Behandlung	% Tote Pflanzen n=18	% Biomasse- anstieg	Aus- läufer	Pflanzen pro Ausläufer	Pflanzen Höhe (cm)	Trocken Masse Blätter (g)	Wurzel Länge (cm)	Trocken Masse Wurzeln (g)
Kontrolle	0	<b>66 (± 6)</b>	1,5	2,1	23,5 (± 2,7)	3,9 (± 1,5)	27,4 (± 4,6)	0,8 (± 0,5)
FZB24®	6	65 (± 6)	1,9	2,6	<b>23,8 (± 4,3)</b>	<b>4,7 (± 2,1)</b>	27,5 (± 3,5)	0,8 (± 0,6)
<i>T. atroviride</i> P1	6	65 (± 4)	1,4	2,1	22,5 (± 3,3)	4,6 (± 2,1)	27,4 (± 4,9)	0,8 (± 0,3)
<i>T. harzianum</i> T58	0	<b>66 (± 2)</b>	<b>2,1</b>	<b>2,9</b>	23,1 (± 2,9)	4,1 (± 2,0)	<b>26,1 (± 4,1)</b>	0,7 (± 0,5)
<i>M. anisopliae</i> Ma43	6	<b>59 (±11)</b>	1,4	1,9	<b>19,9 (± 5,4)</b>	4,4 (± 3,0)	26,5 (± 5,7)	1,3 (± 1,8)
Mixture	0	60 (± 3)	<b>1,2</b>	<b>1,8</b>	22,5 (± 3,0)	<b>3,6 (± 1,6)</b>	<b>28,3 (± 4,3)</b>	0,8 (± 0,5)

Mittelwert aus drei zeitlich unabhängigen Versuchen mit je sechs Pflanzen

## 4.4 Wirksamkeit ausgewählter Präparate im Freiland

### 4.4.1 Freilandversuche in 2010

In diesen Freilandversuchen wurde mit beiden bodenbürtigen Pathogenen inokuliert und anschließend die Erdbeerpflanzen mit den ausgewählten Mikroorganismen behandelt. Die auf *V. dahliae* empfindlich reagierende Sorte Honeoye zeigte im Vergleich zu der Sorte Sonata in der Kontrolle und allen Behandlungen - außer der *M. anisopliae* Behandlung - eine niedrigere Anzahl Pflanzen in der Boniturnote 1. Bei beiden Versuchen war der Anteil der Boniturnote 1 nach Anwendung von *M. anisopliae* Ma43 am höchsten, hingegen bei Anwendung der Mixture war der Anteil am niedrigsten. Es war überraschend, dass trotz künstlicher Inokulation des Bodens mit den Krankheitserregern der Anteil der Pflanzen in der Boniturnote 1 mit 52% bzw. 89,3% sehr hoch war. Nur durch die Anwendung des insektenpathogenen Pilzes *M. anisopliae* Ma43 wurde bei der Sorte Honeoye der Anteil mit 85,2 deutlich erhöht.

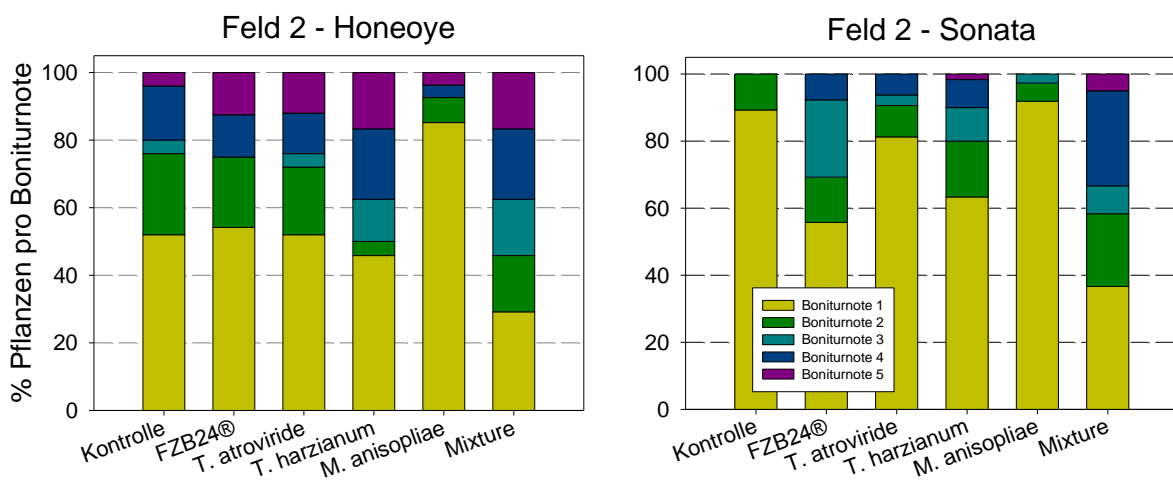


Abbildung 15: Visuelle Bonitur der Erdbeerpflanzen nach Behandlung mit verschiedenen Mikroorganismen neun Monate nach Pflanzung, das Versuchsfeld wurde künstlich mit *V. dahliae* und *P. cactorum* inokuliert.

Zu Versuchsbeginn wurde das Feld beprobt und eine MS-Konzentration von 5,2 MS pro Gramm Boden bestimmt. Aufgrund dieser niedrigen Konzentration wurde mit frisch produzierten MS künstlich inokuliert. Nach der letzten Behandlung (ca. 2,5 Monaten nach Pflanzung) und nach fünf Monaten wurden erneut Bodenproben gezogen und die MS-Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl an MS im Frühling in der Kontrolle um 85% und in den Behandlungen um 76-98% reduziert wurde. Wurde die Reduktion auf die Kontrolle bezogen so wies die Mixture-Behandlung mit einer Reduktion um 86% die besten Ergebnisse auf. Bei FZB24® konnte keine Reduktion beobachtet werden, bei den drei pilzlichen Antagonisten schwankte die Reduktion zwischen 37% (*M. anisopliae* Ma43) und 67% (*T. atroviride* P1).

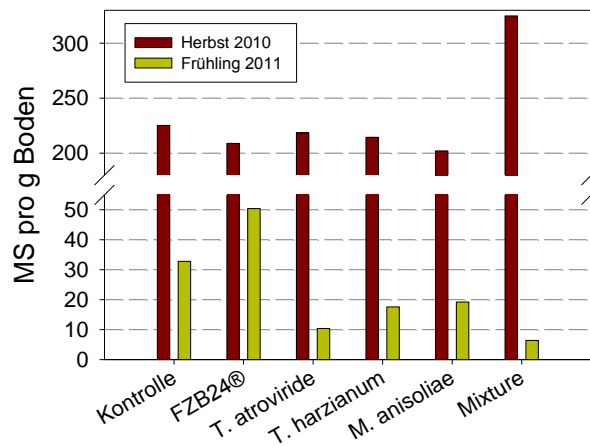


Abbildung 16: Konzentration an MS im Boden drei Monate und ein Jahr nach Pflanzung und Behandlung

#### 4.4.2 Freilandversuche in 2011

Wurde mit *V. dahliae* künstlich inokuliert zeigte sich bei Behandlung mit FZB24® und *M. anisopliae* Ma43 eine geringfügig erhöhte Anzahl an Blüten und Früchten (Abbildung 17, links). Bei 10fach erhöhter Aufwandmenge konnte gerade die Anzahl roter Früchte gegenüber der Kontrolle nach Anwendung von FZB24®, *M. anisopliae* Ma43 und der Mixture erhöht werden. Für die zwei Trichoderma-Stämme konnte kein positiver Effekt beobachtet werden. Wurde mit *P. cactorum* künstlich inokuliert so konnte nur nach einem Monat die Anzahl Blüten in den Varianten FZB24®, *T. harzianum* T58 und *M. anisopliae* Ma43 leicht erhöht werden. Die Anzahl roter Früchte konnte nur durch eine 10fach erhöhte Aufwandmenge der Mixture-Behandlung erreicht werden (Abbildung 17, rechts).

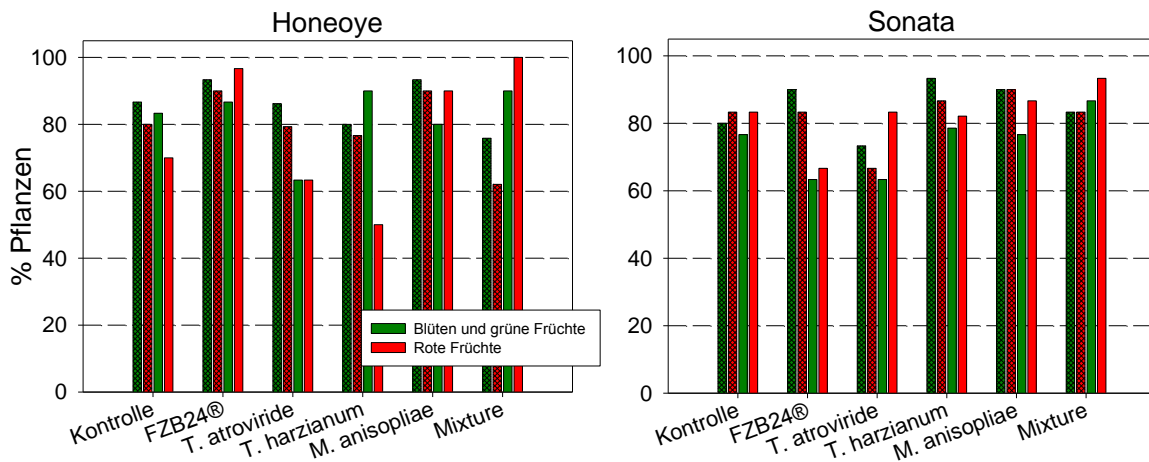


Abbildung 17: Einfluss der Aufwandmenge (einfach=gestreift, 10x=ohne) einen (grün) und zwei Monate (rot) nach Pflanzung und Behandlung mit verschiedenen Antagonisten, links: Sorte Honeoye, rechts: Sorte Sonata

Wurde das Pflanzenwachstum entsprechend des Boniturschemas bestimmt, so konnte für die mit *V. dahliae* inokulierte Sorte Honeoye nur ein leichter Effekt bei der 10fachen Aufwandmenge beobachtet werden (Abbildung 18). Diese Effekte lassen sich aber nicht statistisch absichern. Für die mit *P. cactorum* inokulierte Sorte Sonata konnten keine klaren Effekte der Behandlungen beobachtet werden (Abbildung 19).

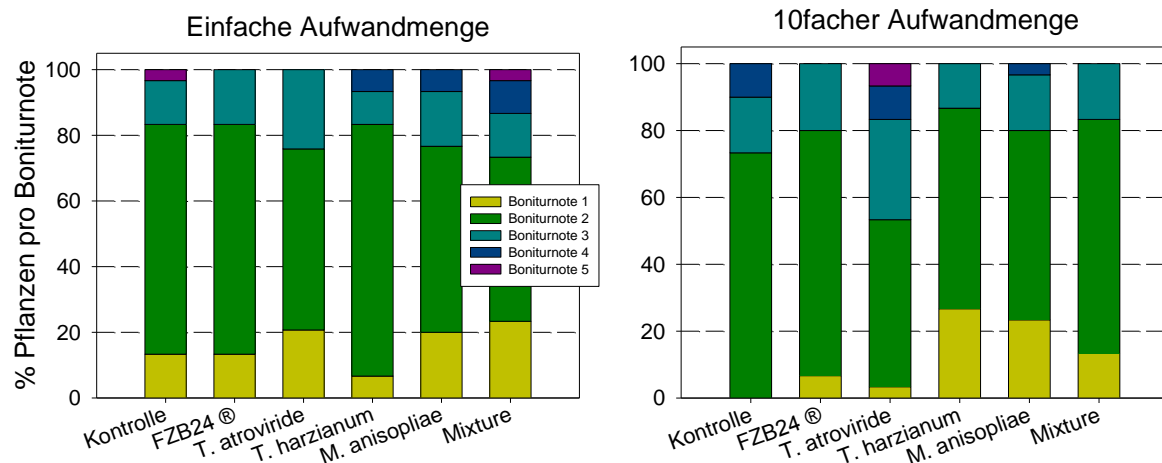


Abbildung 18: Visuelle Bonitur der Erdbeerpflanzen (Sorte Honeoye) nach Behandlung mit verschiedenen Mikroorganismen einen Monat nach Pflanzung und künstlicher Inokulation mit *V. dahliae*

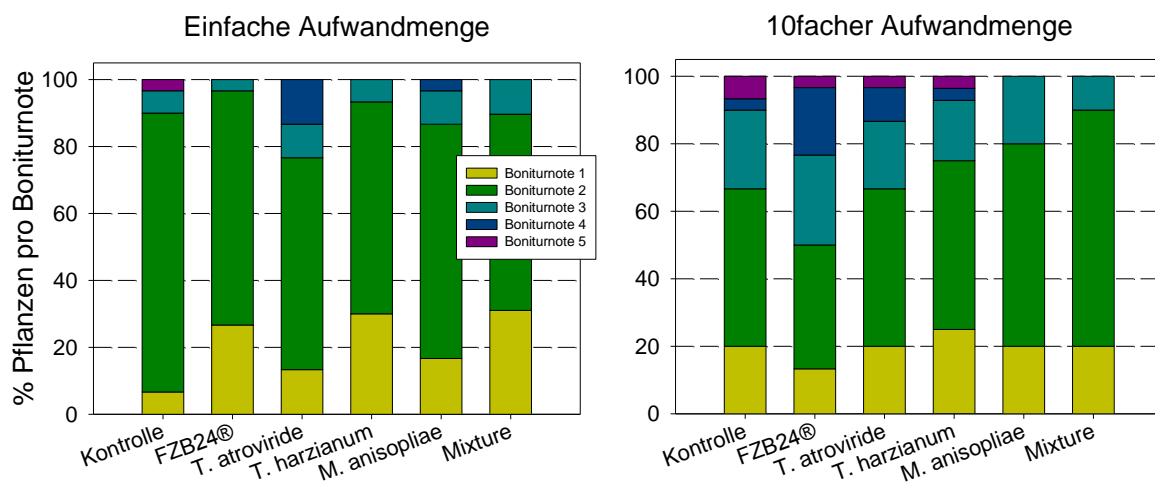


Abbildung 19: Visuelle Bonitur der Erdbeerpflanzen (Sorte Sonata) nach Behandlung mit verschiedenen Mikroorganismen einen Monat nach Pflanzung und künstlicher Inokulation mit *P. cactorum*

Wurde die MS-Konzentration im Boden bestimmt, konnte nur bei der 10fachen Aufwandmenge tendenziell eine geringere MS-Konzentration nach Applikation von FZB24®, *T. harzianum* T58 und *M. anisopliae* Ma43 beobachtet werden (Abbildung 20).

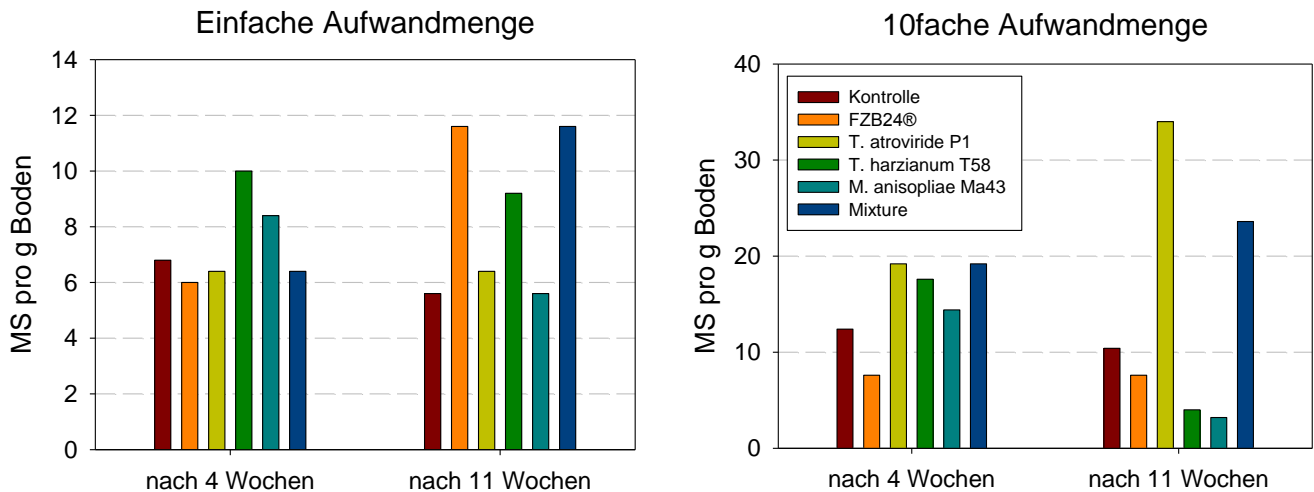


Abbildung 20: Konzentration an MS in Boden nach Anwendung verschiedener Antagonisten, links: einfache Aufwandmenge, rechts: 10fache Aufwandmenge

#### 4.5 Erprobung unter Praxisbedingungen

Aufgrund eigener Labor-Ergebnisse wurde das Produkt Trichostar (*T. harzianum* T58) für Freilandversuche des BÖL Projektes 06OE148 empfohlen und angewendet. Die Versuchsauswertung erfolgte von dem Projektpartner Bioland/Föko. Für die Versuche gegen den Erdbeerblütenstecher wurde der Stamm *M. anisopliae* Ma43 produziert und für die Versuche bereitgestellt.

## 5 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen des Projektes sollte die Integration von Mikroorganismen zur Bekämpfung eines Schaderregerkomplexes untersucht werden. Hierfür wurden im Teilprojekt 06OE354 Blatt- und Fruchtpathogene und am JKI, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Bodenpathogene untersucht. Im Verbundprojekt 06OE148 wurden u.a. Mikroorganismen im Freiland gegen den Erdbeerblütenstecher und gegen die *Verticillium*-Welke getestet.

Um eine große Anzahl von Mikroorganismen vergleichen zu können, wurde deren antagonistisches Potential in *in vitro* Tests geprüft, obwohl davon ausgegangen wird, dass die Ergebnisse stark durch den Versuchsaufbau (z.B. Medienwahl, Temperatur) beeinflusst werden und eine Übertragbarkeit auf die Wirkung im Feld nicht zwingend gewährleistet sein muss. In einem ersten *in vitro* Screening wurden am JKI 98 Mikroorganismen gegen vier Pathogene getestet. Es zeigte sich, dass *T. atroviride* P1 gefolgt von *T. harzianum* T58 gegen alle Pathogene sehr gut hemmend wirkten. Aber auch der insektenpathogene Pilz *M. anisopliae* Ma43 wies eine überraschend hohe Hemmwirkung auf. Im Teilprojekt 06OE354 wurde eine ähnliche Anzahl an Antagonisten gegen Frucht- und Blattpathogene getestet und im ersten Teil der Blattscheibentests erzielten *T. harzianum* T58, *Enterobacter radicincitans* und *M. anisopliae* Ma43 eine signifikante Reduktion des Mehltaubefalls. Auch wiesen *T. harzianum* T58 und *M. anisopliae* Ma43 einen hohen bis mittleren Wirkungsgrad gegen *Botrytis cinerea* auf. Somit konnten Isolate identifiziert werden, die sowohl gegen Blattpathogene (Projektpartner FAG) als auch bodenbürtige Pathogene eine *in vitro* Wirkung aufwiesen. In den *in vitro* Versuchen zeigte sich allerdings auch, dass bakterielle Antagonisten auf die getesteten Phytopathogene nur gering hemmend wirkten. Möglicherweise können relevante Stoffwechselprodukte in dem verwendeten V8 Medium nicht in ausreichender Menge produziert werden. Hinzu kommt, dass in dem verwendeten System Bakterien die Petrischale langsamer als Pilze besiedelten.

Um die Anzahl an Antagonisten für die weiteren Versuche einzuschränken, wurde nur mit den wirksamsten pilzlichen Antagonisten sowie mit den wirksamsten und als Produkt verfügbaren bakteriellen Antagonisten weitergearbeitet. Ursprünglich sollte als weiteres Selektionskriterium das Wachstum bei 37 °C (Körpertemperatur des Menschen) mit herangezogen werden. Da sich aber zeigte, dass die überwiegende Anzahl an Mikroorganismen, die in Produkten verwendet werden, bei 37 °C wachsen, wurde dieses Selektionskriterium verworfen.



Wurde die Kompatibilität der 15 ausgewählten Mikroorganismen *in vitro* geprüft, zeigte sich, dass beim Vergleich unterschiedlicher Methoden (verschiedene Dualkulturen, Wachstum) die Ergebnisse unterschiedlich ausfielen. Tendenziell konnte allerdings zwischen Bakterien keine Hemmung beobachtet werden. Bakterien hemmten pilzliche Mikroorganismen, wobei *Trichoderma* sp. nur schwach gehemmt wurde. Wurde die Kompatibilität pilzlicher Mikroorganismen verglichen, so zeigte sich hier keine eindeutige Hemmung. Die Versuche lassen vermuten, dass bei einer gleichzeitigen Ausbringung von *B. subtilis* FZB24 und den selektierten Pilzen (*T. atroviride* P1, *T. harzianum* T58, *M. anisopliae* Ma43) eine Hemmung der Pilze durch *B. subtilis* FZB24 stattfinden könnte und, dass die Pilze sich untereinander nicht hemmen aber bei der Besiedlung von Nischen im Wettbewerb stehen. Im Verbundprojekt 06OE354 wurden in zwei Gewächshausversuchen zur Wirkung der mikrobiologischen Präparate AQ10®WG (*Ampelomyces quisqualis*), Trichostar® (*T. harzianum* T58) und FZB24®fl (*B. subtilis* FZB24) signifikante Wirkungen gegenüber dem Echtem Mehltau, jedoch keine Wechselwirkungen durch die gemeinsame Applikation von verschiedenen Antagonisten nachgewiesen.

Um neben den zeitlich sehr aufwändigen Pflanzenversuchen noch weitere Ergebnisse zu erzielen, wurde das von Berg *et al.* (2001) entwickelte Verfahren mit Erdbeersämlingen etabliert. Versuche in diesem System ergaben, dass die Anzahl abgestorbener Sämlinge im Vergleich zur Kontrolle bei manchen Mikroorganismenkombinationen leicht erhöht war, allerdings nicht bei dem Gemisch aller vier Mikroorganismen. Weitere Untersuchungen müssten durchgeführt werden, um diese Ergebnisse eindeutig interpretieren zu können. In Freilandversuchen konnte bestätigt werden, dass die Mixture bei beiden getesteten Erdbeersorten keinen negativen Einfluss auf die Erdbeerpflanzen hatte. Weitere Mikroorganismenkombinationen konnten allerdings im Freiland nicht getestet werden.

Zur Erfassung der Interaktionen im System Präparat-Schaderreger-Wirtspflanze wurden Versuche im Gewächshaus mit vier Mikroorganismen (*B. subtilis* FZB24, *T. atroviride* P1, *T. harzianum* T58, *M. anisopliae* Ma43) und ihrer Mixture, zwei Schaderregern (*V. dahliae*, *P. cactorum*) und zwei Sorten (Honeoye, Sonata) durchgeführt. In diesen Versuchen stach keiner der vier Mikroorganismen besonders heraus. Wurden verschiedene Wachstumsparameter erfasst, riefen die verwendeten Mikroorganismen unterschiedliche Effekte bei den Erdbeerpflanzen hervor. Die Analyseergebnisse der MS-Konzentration im Boden wiesen so große Schwankungen zwischen den Wiederholungen auf, dass eine Interpretation der Ergebnisse nicht

möglich ist. Auch konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen MS-Konzentration und Rhizombefall beobachtet werden. In diesen Versuchen konnten die getesteten Mikroorganismen und ihre Mixture nur einen tendenziellen Effekt erbringen.

Wurden die vier ausgewählten Mikroorganismen sowie deren Gemisch im Freiland getestet, konnte auch hier keine klare Wirkung festgestellt werden. Trotz hoher MS-Inokulationen konnte in der Kontrolle nur eine Mortalität von 4% erzielt werden. Bei den Behandlungen lag diese zwischen 4% (*M. anisopliae* Ma43) und 17% (Mixture und *T. harzianum* T58). Obwohl die Anzahl der MS im Boden nach der Anwendung der pilzlichen Produkte deutlich abnahm, konnte außer für *M. anisopliae* Ma43 kein Anstieg der Anzahl Erdbeerpflanzen in der Boniturklasse 1 festgestellt werden. Dieser Anstieg bei *M. anisopliae* Ma43 kann u.U. darauf zurückzuführen sein, dass im Versuchsfeld bei Rodung des Feldes ein hoher Befall an Engerlingen festgestellt wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass der insektenpathogene Pilz *M. anisopliae* Ma43 die Engerlinge negativ beeinflusst hat. Allerdings konnte im Verbundprojekt 06OE148 durch eine Anwendung von *M. anisopliae* Ma43 keine erhoffte Verringerung der durch den Erdbeerblütenstecher *Anthonomus rubi* verursachten Abbissrate erzielt werden, jedoch wurde nur in dieser Variante eine signifikante Erhöhung der Erntemenge erreicht. Es ist also nicht auszuschließen, dass *M. anisopliae* Ma43 neben seiner insektenpathogenen Wirkung auch eine pflanzenstärkende Wirkung hat. Derzeit ist *M. anisopliae* Ma43 nicht in Deutschland zugelassen, allerdings ist laut der Firma Novozymes Biologicals Inc. das auf diesem Isolat basierende Produkt Met52 Granular bereits in neun europäischen Ländern zugelassen, eine spritzbare Formulierung ist in den USA bereits zugelassen und wird für Europa angestrebt. Dies bedeutet, dass in naher Zukunft ein auf diesem am JKI isolierten Isolat basierendes Produkt auch auf dem deutschen Markt verfügbar sein wird.

Wie auch im Verbundprojekt 06OE148 konnte kein klarer Zusammenhang zwischen MS-Konzentrationen im Boden und einer *Verticillium*-Welke beobachtet werden. In den eigenen Gewächshaus- und Freilandversuchen wurden in den Versuchswiederholungen hohe MS-Schwankungen erfasst, die sich aber nicht in der Symptomausprägung widerspiegelten. Dies galt auch für Freilandversuche mit einfacher und 10facher Aufwandmenge, in denen kein klarer Zusammenhang zwischen MS-Konzentration im Boden und der Boniturklassenverteilung gesehen werden konnte.

Im Verbundprojekt 06OE148 wurden neben der Biofumigation die drei Pflanzenstärkungsmittel RhizoVital®42, RhizoStar® und Promot®WP auf ihren Einfluss auf den *Verticillium*-Befall auf zwei

verschiedenen Standorten verglichen (siehe Schlussbericht Projekt 06OE148). So konnte in der Promot®WP-Variante auf dem einen Standort die Anzahl „normal entwickelter Pflanzen“ erhöht und die Anzahl an Symptompflanzen verringert werden, hingegen wurde durch die Anwendung von RhizoVital®42 im Bereich „mit Biofumigation“ die höchste Gesamternte erzielt. Auf einem lehmig-sandigen Standort konnte hingegen in der Promot®WP-Variante im Bereich „mit Biofumigation“ der höchste Gesamtertrag erzielt werden. Die eigenen Ergebnisse und die Ergebnisse der Verbundprojektpartner lassen vermuten, dass die Wirkung antagonistischer Mikroorganismen unter anderem stark von Standortfaktoren abhängt. Auch deuten eigene, zusätzliche Versuche an, dass die Nährstoffverfügbarkeit von Bedeutung ist.

Weiterhin ist die Bodentemperatur sowohl für die Entwicklung des Krankheitserregers als auch für die Entwicklung des Antagonisten von großer Bedeutung. Wurden die optimalen Wachstumstemperatur der drei Pathogene (*V. dahliae*, *V. albo-atrum*, *P. cactorum*) ermittelt, so lagen diese bei 20-25 °C. Im Gegensatz zu *V. dahliae*, der auch sehr gut bei 30 °C wuchs, zeigt *V. albo-atrum* bei 30 °C kein Wachstum. Diese Ergebnisse stimmen mit den Informationen von Klosterman et al. (2009) überein. Die optimalen Wachstumstemperaturen der vier ausgewählten Antagonisten lagen zwischen 20 °C und 30 °C, wobei auffällig war, dass die *Trichoderma* Isolate auch bei 10 °C noch ein gutes Wachstum aufwiesen. Die Messungen der Bodentemperatur während der Versuche in 2010 und 2011 ergaben, dass im Sommer im Wurzelbereich Bodentemperaturen von ca. 15 °C bis 28 °C vorlagen, im Herbst/Winter diese auf bis 1 °C abfielen und ab März stetig bis auf 23 °C anstiegen. Folglich war die Bodentemperatur sowohl für die Pathogene als auch für die Antagonisten im Frühjahr/Sommer optimal. Zusätzlich traten im August/September 2010/2011 hohe Niederschläge auf, so dass günstige Bedingungen für eine Infektion mit *P. cactorum* vorlagen (Abbildungen 27 bis 30).

## 6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die bisher erzielten Ergebnisse lassen sich nicht unmittelbar im ökologischen Erdbeeranbau umsetzen. Dies hat verschiedene Gründe:

- Die Erfassung des Befalls mit den bodenbürtigen Krankheitserregern erwies sich trotz intensivem Austausch mit anderen Wissenschaftlern innerhalb und außerhalb des Verbundprojektes als sehr schwierig.
- Der Infektionsdruck war trotz künstlicher Inokulation nicht ausreichend, um klar auswertbare Symptome zu erhalten.

Dennoch sind die bisherigen Ergebnisse von Nutzen und sind insofern verwertbar, da

- diese Aufschluss darüber geben, welche der 98 getesteten Mikroorganismen ein Potential zur Bekämpfung eines Schaderregerkomplexes (vier Pathogene) aufweisen. Diese Informationen sind auch für Produzenten und Vertreiber biologischer Pflanzenschutzmittel bzw. Pflanzenstärkungsmittel von Bedeutung.
- bei welcher Kombination von Mikroorganismen eine gegenseitige Hemmung zu erwarten ist. Diese Informationen sind sowohl für die Hersteller, für die Beratung aber auch für den Anbauer von Bedeutung, um besser abschätzen zu können, welche Spritzfolgen ohne negative Beeinflussung verwendet werden können.
- dass Mikroorganismen wie insektenpathogene Pilze neben ihrer Wirkung auf Schadinsekten durchaus auch phytopathogene Pilze beeinflussen können. Dies verdeutlicht die Komplexität der Wirkung von Antagonisten bzw. Pathogenen.
- die Erfassung der Mikrosklerotiendichte im Boden als Maß der Bodenverseuchung nicht zwingend aussagekräftig interpretiert werden kann. Trotz teilweise sehr hoher Mikrosklerotienkonzentrationen im Boden konnte keine Infektion erzielt werden. Diese Informationen können auch für den Erdbeeranbauer von größerer Bedeutung sein.
- bei der Wirksamkeit antagonistischer Mikroorganismen nicht nur Symptomausprägung sondern auch die pflanzenstärkende Wirkung mit berücksichtigt werden sollte.

## **7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen**

Entgegen der geplanten Versuche wurde die Anzahl der zu untersuchenden Pathogene reduziert. So zeigte sich bei den verschiedenen Projekttreffen, dass besonders die Gattungen *Phytophthora* und *Verticillium* ein wichtiges Problem darstellen. Weniger bedeutsam hingegen schien *S. rolfsii* zu sein. Daher wurde sich zuerst auf die vier wichtigen Pathogene der Gattungen *Phytophthora* und *Verticillium* konzentriert und auf Versuche mit *S. rolfsii* verzichtet. Da *P. fragariae* var. *fragariae* eine Quarantänekrankheit ist, wurde diese nur in *in vitro* Versuchen untersucht, nicht aber in den Gewächshausversuchen berücksichtigt. Ebenso zeigte sich bei den Projekttreffen dass die Bedeutung von *V. albo-atrum* gering ist und daher wurde sich neben *P. cactorum* vornehmlich auf *V. dahliae* konzentriert.

Die *in vitro* Wirksamkeitstest wurden entsprechend des Arbeitsplans durchgeführt und es konnten entsprechende Mikroorganismen mit einem vielversprechenden Antagonistenpotential identifiziert werden. Die Kompatibilität der verschiedenen Mikroorganismen wurde *in vitro* und *ad planta* geprüft. In Gewächshausversuchen wurden die Interaktionen „Präparat-Schaderreger-Wirtspflanze“ untersucht. Diese Versuche erwiesen sich aber als unerwartet schwierig, da für die beiden Pathogene *V. dahliae* und *P. cactorum* keine klaren Symptome nachweisbar waren. In Diskussion mit anderen Forschergruppen zeigte sich, dass auch diese ähnliche Probleme haben. Hier wird teilweise durch künstliche Verletzungen eine Infektion provoziert, was allerdings für die eigenen Versuche als nicht sinnvoll erachtet wurde. In zwei Vegetationsperioden wurde die Wirksamkeit in Freilandversuchen auf dem Institutsversuchsfeld untersucht. Auch hier konnte selbst nach künstlicher Inokulation mit beiden Pathogenen unter Verwendung von zwei verschiedenen Sorten keine eindeutige Infektion hervorgerufen werden. Somit waren die Versuchsergebnisse schwer interpretierbar. Aufgrund der Probleme des Infektionsnachweises wurden in zusätzlichen Aktivitäten geprüft, in wie weit indirekte Messmethoden, wie die Chlorophyllfluoreszenzmessung und Beta-Glucanase-Messungen einen Hinweis auf einen Befall geben können. Eine Erprobung unter Praxisbedingungen konnte aufgrund fehlender Ergebnisse der Freilandversuche nicht durchgeführt werden.

Die projektbegleitende Arbeitsgruppe erwies sich über die Projektlaufzeit hinaus als äußerst hilfreich. So konnten Versuche aufeinander abgestimmt werden, und Prioritäten entsprechend angepasst werden. Auch entstand ein reger Austausch mit den Produktherstellern, so dass Versuchsaufbauten den Bedürfnissen der einzelnen Mikroorganismen angepasst werden

konnten. Die bisher erzielten eigenen Ergebnisse und die Ergebnisse der anderen Teilprojekte verdeutlichen, dass die Berücksichtigung eines Schaderregerkomplexes aus verschiedenen Krankheiten und Schädlingen von Bedeutung ist. Allerdings konnten aufgrund der Komplexität eines entsprechenden Versuchsaufbaus diese nur am Rande bearbeitet werden, auch wenn die Regulierung eines Schaderregerkomplexes für den Praktiker von großer Bedeutung ist.

## 8 Zusammenfassung

In dem vorliegenden Projekt wurde zu Beginn das antagonistische Potential von 98 verschiedenen Mikroorganismen *in vitro* gegenüber vier bodenbürtigen Krankheitserreger der Erdbeere (*Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, *Phytophthora cactorum*, *P. fragariae*) ermittelt. Die Ergebnisse erbrachten, dass gerade pilzliche Antagonisten teilweise alle vier Krankheitserreger hemmten. Auch zeigten insektenpathogene Pilze eine Hemmung gegen verschiedene Pathogene. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden 15 Mikroorganismen für weiterführende Kompatibilitätsstudien ausgewählt. Diese zeigte, dass Bakterien pilzliche Antagonisten, hingegen pilzliche Antagonisten sich untereinander nur sehr begrenzt hemmten. Für weitere Untersuchungen wurden vier Mikroorganismen (*Trichoderma atroviride* P1, *T. harzianum* T58, *Metarhizium anisopliae* Ma43, *Bacillus subtilis* FZB24) sowie deren Gemisch ausgewählt. Bezüglich der Temperaturbedürfnisse wiesen diese Mikroorganismen ähnliche Temperaturbedürfnisse wie die vier Pathogene auf. Wurde der Einfluss der Mikroorganismen auf die Mikrosklerotien (MS)-Konzentration im Freilandboden untersucht, so konnten gerade die pilzlichen Antagonisten eine gewisse Reduktion der MS-Dichte im Boden hervorrufen. Diese Ergebnisse konnten allerdings im Gewächshaus unter Verwendung von Bodensubstraten nicht bestätigt werden. Hier unterschieden sich die Wiederholungen teilweise erheblich. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen MS-Dichte im Boden und von *V. dahliae* hervorgerufenen Welkesymptomen festgestellt werden. Sowohl in Gewächshaus- als auch in Freilandversuchen konnte durch eine künstliche Inokulation mit *P. cactorum* und *V. dahliae* keine eindeutige Infektion der Erdbeerpflanzen hervorgerufen werden. Wohl aber konnte im Gewächshaus ein Einfluss der Antagonisten auf verschiedene Wachstumsparameter der zwei Erdbeersorten Honeoye und Sonata beobachtet werden. Hingegen waren die Ergebnisse der angelegten Freilandversuche nicht eindeutig und müssen durch weitere Versuche noch ergänzt werden.

## 9 Literaturverzeichnis

- Anandhakumar J. and Zeller W., 2008. Biological control of red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) disease of strawberry with rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115 (2): 49-56.
- Bhat R.G. and Browne G.T., 2010. Specific detection of *Phytophthora cactorum* in diseased strawberry plants using nested polymerase chain reaction. *Plant Pathology*, 59:121-129.
- Berg G., Fritze A., Roskot N. and Smalla K., 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 963-971.
- Berg G., Opelt K., Zachow C., Lottmann J., Gotz M., Costa R. and Smalla K., 2006. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. *Fems Microbiology Ecology*, 56: 250-261.
- Dathe B., 1994. Unterschiede in der Anfälligkeit von Erdbeeren gegen *Verticillium*. *Obstbau*, 8: 405-407.
- Debode J., De Maeyer K., Perneel M., Pannecouque J., De Backer G. and Höfte M., 2007. Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium microsclerotia* by *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1184-1196.
- Eikemo H., Stensvand A. and Tronsmo A., 2003. Induced resistance to *Phytophthora* diseases in strawberry. *Bulletin Oilb/Srop*, 26: 187-192.
- Erdogan O. and Benlioglu K., 2010. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control*, 53: 39-45.
- Fradin E.F. and Thomma B.P.H.J., 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7 (2): 71-86.
- Hawke M.A. and Lazarovits G., 1994. Production and manipulation of individual microsclerotia of *Verticillium dahliae* for use in studies of survival. *Phytopathology*, 84 (9): 883-890.
- Heitmann B., 2009. Pers. Mitteilung, FH Osnabrück.
- Junge H., 2008. Pers. Mitteilung, ABiTEP GmbH.
- Khosla K. and Kumar J., 2005. Management of root rot and blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of strawberry. *Proceedings of the VII International Symposium on Temperate Zone Fruits in the Tropics and Subtropics*, Pt 2: 371-373.



Klosterman S.J., Atallah Z.K., Vallad G.E. and Subbarao K.V., 2009. Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. Annual Review of Phytopathology, 47: 39-62.

Kurze S., Bahl H., Dahl R. and Berg G., 2001. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. Plant Disease, 85: 529-534.

Lamers J. G., Evenhuis A., Wanten P. and Blok W.J., 2008. Biological soil disinfestation to control *Verticillium dahliae* in strawberries. COST863 WG2 and WG3 Joint SGM Jokioinen 19-20 May 2008.

Lilja A.T., Parikka P.K., Pääskynkivi E.A., Hantula J.I., Vainio E.J., Vartiamäki H.A., Lemmetty A.H. and Vestberg M.V., 2006. *Phytophthora cactorum* and *Colletotrichum acutatum*: Survival and detection. Agriculturae Conspectus Scientificus, 71(4): 121-128.

Maas J.L., 1998. Compendium of strawberry diseases. APS Press, St. Paul, MN.

Marois J.J., Fravel D.R. and Papavizas G.C., 1984. Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere and its interaction with *Verticillium dahliae*. Soil Biology and Biochemistry, 16 (4): 387-390.

Merkblatt nr. 57. 1981. Die rote Wurzelfäule der Erdbeere. Merkblatt des JKI

Michel V., Dutheil A., Ancay A. and Fuchs J., 2006. The use of compost and green manure to control soil borne diseases of strawberry. Bulletin Oib/Srop, 29: 59-66

Moser R., Pertot I., Elad Y. and Raffaelli R., 2008. Farmers' attitudes toward the use of biocontrol agents in IPM strawberry production in three countries. Biological Control, 47 (2): 125-132.

Neubauer C. and Heitmann B., 2011. Quantitative detection of *Verticillium dahliae* in soil as a basis for selection of planting sites in horticulture. Journal für Kulturpflanzen, 63(1): 1-8.

Porras M., Barrau C., Arroyo F.T., Santos B., Blanco C. and Romero F., 2007. Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma* spp. and soil solarization. Plant Disease, 91(2): 142-146.

Raj H. and Sharma S. D., 2005. Integrated management of collar and root rot (*Sclerotium rolfsii*) of strawberry. Proceedings of the VII International Symposium on Temperate Zone Fruits in the Tropics and Subtropics, Pt 2: 375-379.

Sasse A., 1997. Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung des Rapswelkeerreger (*Verticillium dahliae* Kleb.) durch den Einsatz mikrobieller Antagonisten. Dissertation.

Schlussbericht Projekt Nr. 06OE148: Stärkung der Ertragsicherheit und Rentabilität im biologischen Erdbeeranbau durch effektivere Unkrautkontrolle sowie Regulierung des Erdbeerblütenstechers und verschiedener Wurzelfaulen.

Schlussbericht Projekt Nr. 06OE354: Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren. Teilprojekt: Graufäule und Echter Mehltau.

Shaw D.V., Gordon T.R., Hansen J. and Kirkpatrick S.C., 2010. Relationship between the extent of colonization by *Verticillium dahliae* and symptom expression in strawberry (*Fragaria x ananassa*) genotypes resistant to verticillium wilt. *Plant Pathology*, 59: 376-381.

Subbarao K. V., Kabir Z., Martin F. N. and Koike S. T., 2007. Management of soilborne diseases in strawberry using vegetable rotations. *Plant Disease*, 91: 964-972.

Van der Scheer H.A.Th., 1971. Isolation of *Phytophthora cactorum* from soil in orchards and strawberry fields and differences in pathogenicity to apple. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 77(3): 65-72.

Vestberg M., Kukkonen S., Saari K., Parikka P., Huttunen J., Tainio L., Devos N., Weekers F., Kevers C., Thonart P., Lemoine M.-C., Cordier C., Alabouvette C. and Gianinazzi S., 2004. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology*, 27: 243-258.

Zimmer J., 2008. Pers. Mitteilung, DLR-Rheinpfalz.

## 10 Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt

Termin	Veröffentlichung	Art der Darstellung
März 2009	Ökologische Beerenobsttagung, LVWO Weinsberg	Vorstellung der Projektes
März 2009	Tagung des Arbeitskreises „Biologische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten“	Vorstellung des Projektes
Januar 2010	JKI Darmstadt, Institutsführung, Herr Zebitz Uni Hohenheim	Vorstellung des Projektes
07.-11. Juni 2010	IOBC Tagung; Arbeitskreis „Biological Control of Fungal and Bacterial Pathogens“, Graz (A)	Poster: Biocontrol activity of different <i>Pseudomonas</i> spp. against <i>Verticillium dahliae</i> microsclerotia
06.-09. September 2010	57. Pflanzenschutztagung, Berlin	Vortrag: Vergleich verschiedener Mikroorganismen zur biologischen Bekämpfung bodenbürtiger Pathogene an Erdbeeren
Vom 28. März bis 30 September 2011	Diplomarbeit von Solène Juillet	Influence of the four antagonistic microorganisms ( <i>Trichoderma atroviride</i> strain P1, <i>T. harzianum</i> strain T58, <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma43 and <i>Bacillus subtilis</i> strain FZB24) on the phytopathogenic fungus <i>Verticillium dahliae</i> in strawberries
20.-22. Februar 2012	15th International Conference on Organic Fruit-Growing, Hohenheim	Poster und kurzer Vortrag: Influence of antagonistic micro-organism on the growth of strawberry plants in the presence of <i>Verticillium dahliae</i> and <i>Phytophthora cactorum</i>
22. Februar 2012	Erdbeer Fachtagung, LLH Griesheim	Vortrag: <i>Verticillium</i> -Welke
15.-16. März 2012	Tagung des Arbeitskreises „Biologische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten“	Vortrag: Einfluss von Antagonisten auf <i>Verticillium dahliae</i> an Erdbeeren

<b>Termin</b>	<b>Veröffentlichung</b>	<b>Art der Darstellung</b>
24.-27. Juni 2012	IOBC Tagung; Arbeitskreis "Biological Control of Fungal and Bacterial Pathogens", Reims (F)	Vortrag: Influence of antagonists on <i>Verticillium dahliae</i> on strawberry plants
10.-11. Juli 2012	Fachtagung zur Ökoforschung, Hohenheim	Poster: Influence of antagonistic micro-organism on the growth of strawberry plants in the presence of <i>Verticillium dahliae</i> and <i>Phytophthora cactorum</i>
11.-14. September 2012	58. Pflanzenschutztagung, Braunschweig	Vortrag: Einsatz mikrobiologische Präparate zur Regulierung von Verticillium-Welke und Rhizomfäule an Erdbeeren
23. September 2012	Tag der offenen Tür am JKI Darmstadt	Vorstellung des Projektes

## 11 Zusätzliche Aktivitäten

Ergänzend zu den im Antrag aufgeführten Aktivitäten wurden noch weitere, für den Projektverlauf wichtige Arbeiten durchgeführt.

### 11.1 Produktion der Pathogene

Sowohl für Gewächshaus- als auch Freilandversuche sollte künstlich mit Pathogenen infiziert werden. Um dies zu gewährleisten, müssen die Pathogene in ausreichender Menge bereitgestellt werden können.

#### 11.1.1 Produktion von *Phytophthora cactorum*

Um *P. cactorum* zu produzieren, wurden zwei verschiedene Methoden - beschrieben von Anandhakumar und Zeller (2008) und von Vestberg *et al.* (2004) - wiederholt getestet. Beide Methoden erbrachten keine positiven Resultate. Bei der ersten Methode konnte kein ausreichendes Myzelwachstum erreicht werden und bei der zweiten Methoden traten immer wieder Kontaminationen auf, die das Wachstum von *P. cactorum* negativ beeinflussten. Aufgrund dieser negativen Ergebnisse wurde im Folgenden *P. cactorum* auf Roggen-Sitosterol-Agar-Platten vermehrt. Auf diese Weise konnte genug Inokulationsmaterial für Freilandversuche bereitgestellt werden, nicht aber für die Gewächshausversuche.

Aufgrund der Erfahrungen aus 2010 wurde 2011 versucht den Oomycet in Flüssigkultur anzuzüchten. Die getesteten Nährmedien waren: V8B, SPTB und PDB. 300 mL Kolben gefüllt mit 100 mL Medium wurden mit bewachsenen Agarstücken inokuliert und auf einem Schüttler bei

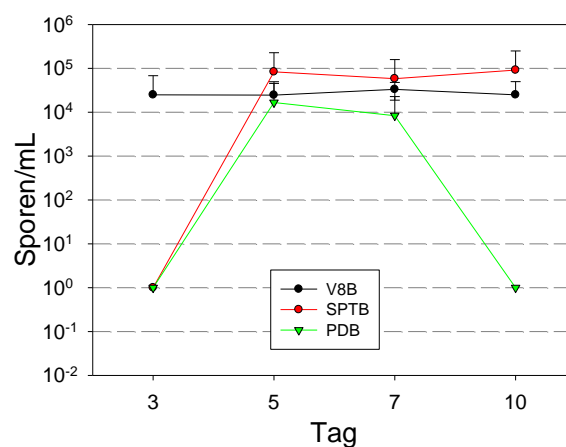


Abbildung 21: Sporenbildung von *P. cactorum* in verschiedenen Flüssigmedien nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

25 °C und 150 rpm inkubiert. Nach 3, 5, 7 und 10 Tagen wurde die Anzahl gebildeter Konidien bestimmt. Die Versuche wurden dreimal zeitlich unabhängig wiederholt. Die Abbildung 21 verdeutlicht, dass *P. cactorum* im V8B-Medium schon nach drei Tagen die höchste Sporendichte aufwies.

### 11.1.2 Produktion von *Verticillium dahliae*

Zur Produktion von *V. dahliae* wurde nach der von Heitmann (persönliche Mitteilung) beschriebenen Methode vorgegangen (siehe Kapitel 3.3.1.2). Mit Hilfe dieser Methode konnten MS für Tests im Gewächshaus und Freiland produziert werden. Für die Laborversuche wurden MS nach Hawke und Lazarovitis (1994) produziert. Beide Verfahren erbrachten gute Resultate. Da die künstlich inokulierten Pflanzen keine Symptome erbrachten, wurde 2011 versucht, *V. dahliae* in Flüssigkultur zu fermentieren und anschließend die Pflanzen mit in Flüssigkultur gebildeten Konidien anstatt mit MS zu infizieren. Ziel war es, über diese Inokulation eine bessere Infektion mit deutlichen Symptomen zu erhalten.

Die getesteten Nährmedien waren SPTB, PDB und CD. 300 mL Kolben gefüllt mit 100 mL Medium wurden mit bewachsenen Agarstücken inokuliert und auf einem Schüttler bei 25 °C und 150 rpm inkubiert. Nach 3, 5, 7 und 10 Tagen wurde die Anzahl Konidien bestimmt. Die Versuche wurden dreimal zeitlich unabhängig wiederholt. Abbildung 22 verdeutlicht, dass die Fertigmedien PDB und CD vergleichbar gute Sporenausbeuten erbrachten.

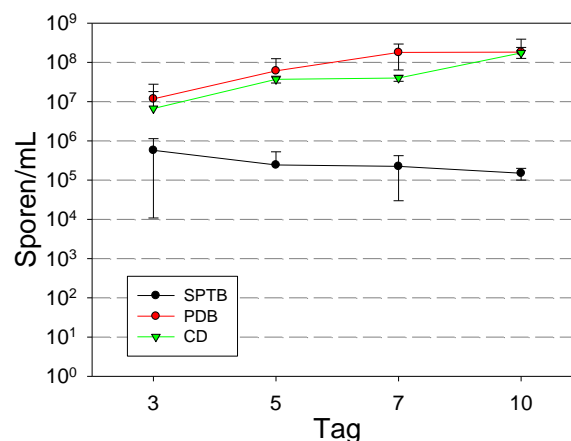


Abbildung 22: Sporenbildung von *V. dahliae* in verschiedenen Flüssigmedien nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

### **11.2 Tests zur *Verticillium dahliae* Infektion**

Um zu prüfen, welche MS-Konzentration für eindeutige Symptome in den Gewächshausversuchen notwendig sind, wurde die *V. dahliae* empfindliche Sorte "Honeoye" in Null-Erde, die mit 1, 10 oder 100 MS/g Boden beimpft wurden, gepflanzt. In diesem dreifach wiederholten Versuch konnte auch bei Inokulation mit der hohen Konzentration an MS keine eindeutige auf *V. dahliae* zurückführbare Symptomausprägung beobachtet werden.

### **11.3 Produktion von *Metarhizium anisopliae* Ma43 gegen Erdbeerblütenstecher**

Im Prophyta-Labor-Feststoff-Fermenter wurde der Pilz auf Hafer für 14 Tage bei 25 °C fermentiert. In 2010 und in 2011 wurde anschließend das Substrat in 0,1% Tween 80 suspendiert und über einen Siebschüttler mit 150 µm Maschenweite gesiebt. Anschließend wurde eine definierte Sporenkonzentration eingestellt und nach Ermittlung der Keimfähigkeit an den Projektpartner verschickt.

### **11.4 Bestimmung der *in vitro* Hemmung auf Keimung der MS**

Ziel der Versuche war es, eine schnelle Methode zur Bestimmung der Wirkung der BCAs auf die Keimung der MS verfügbar zu haben.

#### **11.4.1 Versuche 2010**

Die MS-Suspension wurde in 0,08% Wasseragar mit ca. 50 oder ca. 200 MS pro 10 µL vorbereitet. Die antagonistischen Pilze wurden in einer Konzentration von 10<sup>3</sup> und 10<sup>5</sup> Konidien/mL und das Bakterium entsprechend des Beipackzettels vorbereitet. Das Gemisch der vier Antagonisten wurde im selben Mischungsverhältnis angesetzt. Der Test wurde in Mikrotiterplatten angesetzt. In jede Kavität wurden 10 µL MS-Suspension, 10 µL PDB und 80 µL der Antagonisten-Suspension zugegeben. Nach 0, 2, 5 und 7 Tagen wurden 100 µL auf SPTA ausplattiert und bei 24 °C inkubiert. Nach 5 bzw. 10 Tagen wurde geprüft, ob MS gekeimt waren bzw. sekundäre MS gebildet wurden. Hierfür wurden je Wiederholung zwei bzw. drei Petrischalen ausgewertet. Der Versuch wurde zeitlich unabhängig dreimal wiederholt.

Die Ergebnisse zeigen, dass diese *in vitro* Versuche Anhaltspunkte geben können, in wie weit das Auskeimen der MS durch Antagonisten beeinflusst wird. Diese Informationen sind für eine Beschreibung des Wirkungsmechanismus von Bedeutung. Nach zwei Tagen Inkubation konnten Unterschiede festgestellt werden, eine längere Inkubation erwies sich allerdings als schwer

auswertbar, da sich in der Kavität ein nicht ausplattierbarer Myzelklumpen bildete und eine Auswertung sehr erschwerte. *B. subtilis* FZB24 zeigte keinen Einfluss auf die Hemmung der Keimfähigkeit der MS und auf der Ausbildung von sekundäre MS. *M. anisopliae* Ma43 hemmte die Keimfähigkeit nach einem Kontakt von 7 Tagen mit einer Konzentration von  $10^5$  Konidien/mL bei 50 MS. Bei Anwendung des Gemisches konnte eine Keimhemmung nach 2 Tagen Inkubation beobachtet werden. Bei *T. atroviride* P1 konnte keine Hemmung nach einem zweitägigen Kontakt beobachtet werden. Nach 5 und 7 Tagen zeigte sich keine vollständige Hemmwirkung.

#### 11.4.2 Versuche 2011

Die MS-Suspension wurde in 0,08% Wasseragar mit ca. 100 MS pro 10  $\mu$ L vorbereitet. Die antagonistischen Pilze wurden in einer Konzentration von  $10^5$  Konidien/mL und das Bakterium wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben kultiviert. Es wurden auch die verschiedenen Mischungen untersucht (Tabelle 2). Der Test wurde in Mikrotiterplatten und in 1,5 mL Reaktionsgefäße durchgeführt. In jede Kavität/Gefäß wurde ein Teil MS-Suspension und neun Teile der Antagonisten-Suspension zugegeben. Nach 0, 2, 5 und 7 Tagen wurde 50  $\mu$ L auf SPTA ausplattiert und bei 25 °C inkubiert. Nach weiteren 7 bzw. 14 Tagen wurde geprüft, ob sekundäre MS gebildet wurden. Der Versuch wurde zeitlich unabhängig dreimal wiederholt. Abbildung 23 veranschaulicht, dass verschiedene Mikroorganismen und deren Kombinationen die Bildung sekundärer Mikrosklerotien hemmen können.

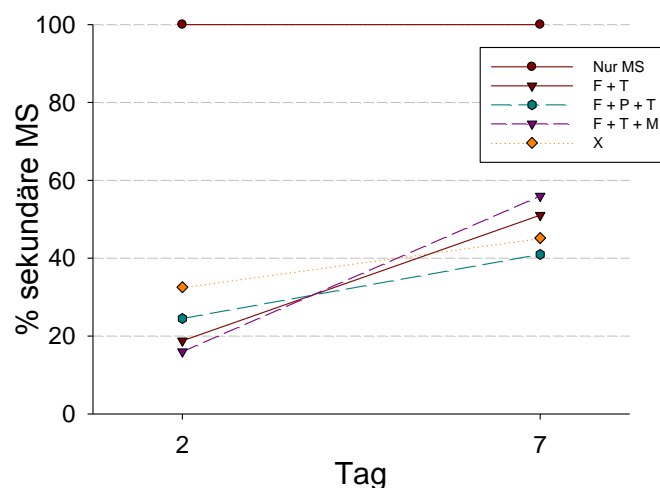


Abbildung 23: Beispiel für den Einfluss der Antagonisten und ihrer Gemische auf die Bildung sekundärer Mikrosklerotien.



## 11.5 Temperatur-Verläufe

### 11.5.1 Antagonisten

Diese Versuche wurden in 2009 begonnen und in 2010 abgeschlossen. Es wurden Wachstumsversuche mit 15 Antagonisten bei 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C und 30 °C durchgeführt. Bei Pilzen wurde das Myzelwachstum auf PDA (n=18 zeitlich unabhängig), bei Bakterien die Änderung der Optischen Dichte (OD) bei 595 nm (1 µL Bakterien Suspension und 99 µL TSB; n=96 zeit unabhängig) gemessen. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass das Temperaturbedürfnis für die verschiedenen Mikroorganismen unterschiedlich ist. So wuchsen die zwei *Trichoderma*-Stämme noch bei 10 °C stetig, für *B. subtilis* FZB24 hingegen unterschied sich die Wachstumskurve bei 10 °C deutlich von denen bei höheren Temperaturen (Abbildung 24).

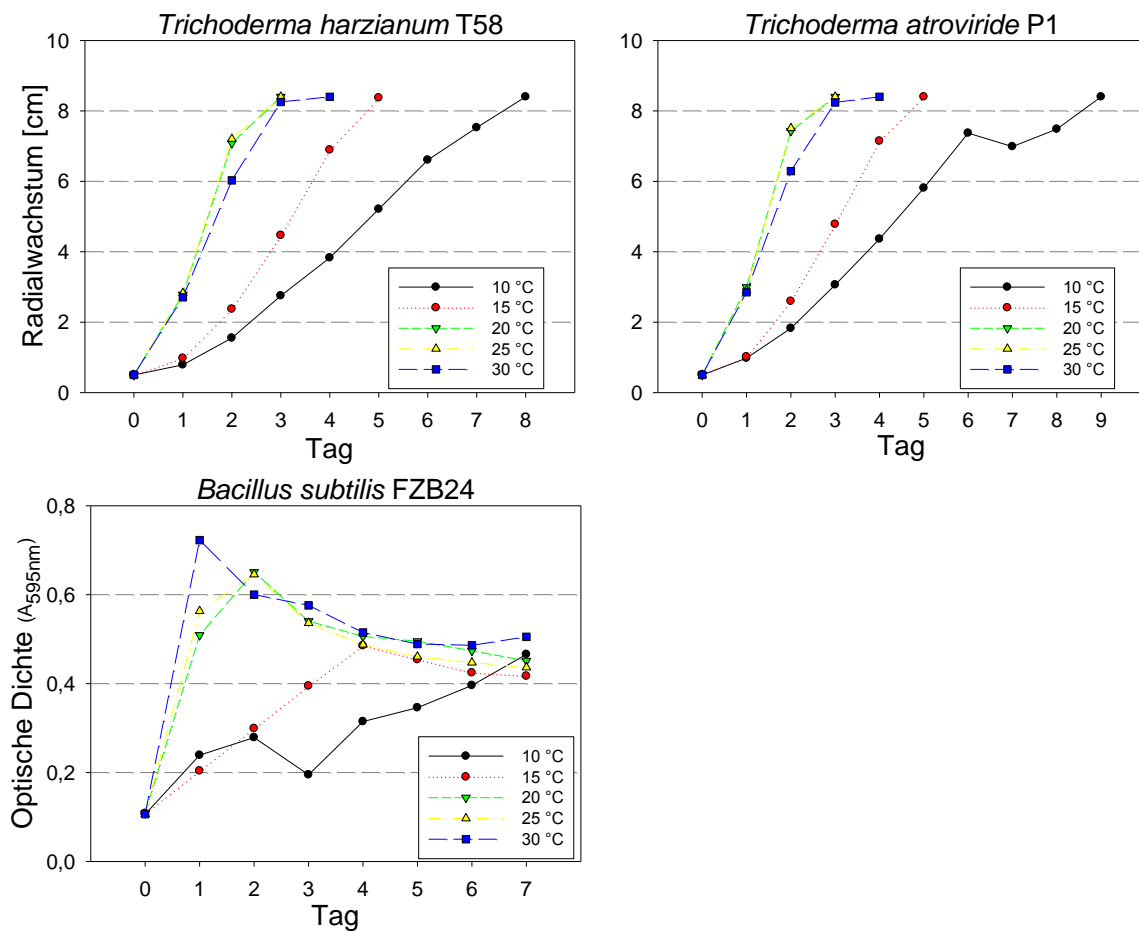


Abbildung 24: Beispiel für das Wachstum von *T. harzianum* T58, *T. atroviride* P1 und *B. subtilis* FZB24 bei verschiedenen Temperaturen

### 11.5.2 Pathogene

Aus Abbildung 25 ist zu erkennen, dass die drei untersuchten Pathogenen ähnliche Temperaturbedürfnisse aufweisen. Bei 20°C konnte ein starkes Radialwachstum beobachtet werden, dass bei Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 25°C nur bei *V. dahliae* geringfügig zunahm. Aus diesen Versuchen kann abgeleitet werden, dass die potentiellen Antagonisten gerade bei Temperaturen von 20°C wirken sollten.

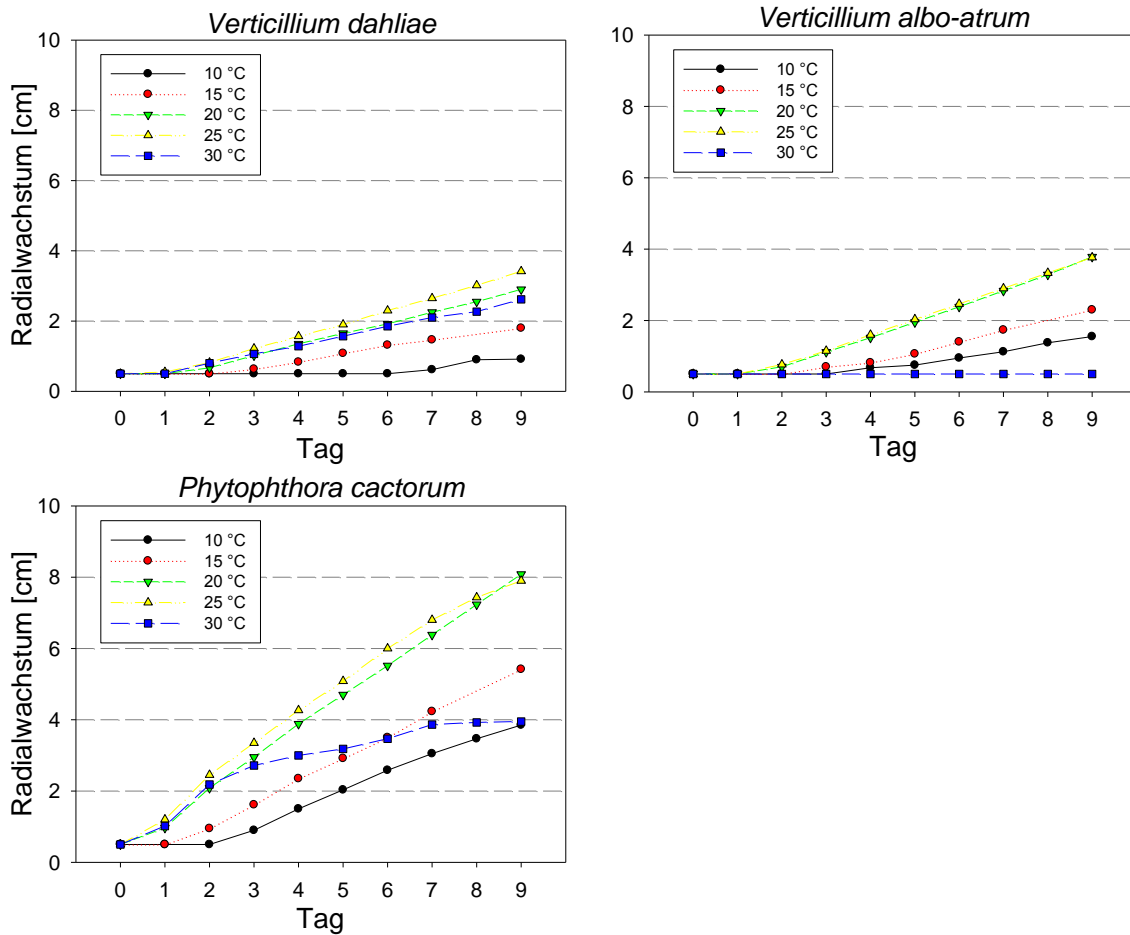


Abbildung 25: Myzelwachstum der Pathogene, *V. dahliae*, *V. albo-atrum* und *P. cactorum* bei unterschiedlichen konstanten Temperaturen.

### 11.6 Tests mit Erdbeersämlingen

Diese Versuche wurden durchgeführt, um einen Schnelltest zur Überprüfung möglicher Wechselwirkungen zwischen Antagonist, Pathogen und Pflanze aufzubauen. Die Versuche wurden nach der Methode von Berg *et al.* (2001) durchgeführt. Hierfür wurde die Wirksamkeit der Antagonisten nach Infektion der Pflanzen mit Konidien und MS von *V. dahliae* getestet. Des Weiteren sollten phytotoxische Effekte mit erfasst werden.

Vier bis sieben Tage alte Erdbeersämlinge wurden auf 1 mL, 10% Wasser-Agar platziert. Danach wurden 10 µL Antagonist und 10 µL Pathogen dazugegeben und bei 18 °C inkubiert. Alle Antagonisten wurden zuvor auf Agar-Platten angezogen und anschließend abgeschwemmt.

Die ersten bisher nicht wiederholten Resultate lassen eine Wirkung der Antagonisten auf die Erdbeersämlinge vermuten. Außerdem ist es nicht auszuschließen, dass Ma43 eventuell eine phytotoxische Wirkung auf Erdbeersämling haben könnte.

**Tabelle 8: Einfluss der vier Antagonisten auf die Mortalität der Erdbeersämlinge nach Inokulation MS oder Konidien von *V. dahliae***

	BCA	BCA und <i>V. dahliae</i> Konidien	BCA und <i>V. dahliae</i> MS
Kontrolle	6*	3	2
<i>B. subtilis</i> FZB24	5	4	4
<i>T. atroviride</i> P1	5	4	5
<i>M. anisopliae</i> Ma43	2	4	2
<i>T. harzianum</i> T58	4	4	4

\* Anzahl lebender Pflanzen (n=6).

Im Jahr 2011 wurden die Versuche an Erdbeersämlingen fortgeführt. Die Tests wurden mit den obengenannten Antagonisten und deren Mischung durchgeführt. *V. dahliae* wurde als MS dazugegeben und *P. cactorum* als Sporensuspension. Die Platten wurden bei 20 °C inkubiert. Leider keimten die MS auf Wasser Agar nicht aus. Darum wurden SPTA Medium getestet, auf dem die MS mit Sicherheit keimten. Die Sämlinge starben aber auf diesem Medium ab.

### **11.7 Tests mit *Pseudomonas***

38 *Pseudomonas*-Isolate wurden auf zwei Agarmedien für 24 h (28 °C) kultiviert und anschließend in sterile physiologischer Lösung suspendiert.

Bestimmung der *in vitro* Hemmung auf Keimung der MS: 1 mL frisch kultivierte Bakteriensuspension wurde mit ca. 9 mL 40 °C warmen TSA (pH 7,0) in Petrischalen vermischt. Danach wurden 10 mL PDA (pH 5,5) auf die erstarrte Agarschicht gegeben. Die Platten wurden bei 28 °C inkubiert. Nach 24 h wurde eine Prise Sand/MS Mischung auf die Agar-Oberfläche verteilt. Die Auswertung erfolgte nach 7 Tagen. 12 *Pseudomonas*-Isolate zeigten eine Verhinderung der MS-Keimung unabhängig davon, welches Agar-Medium verwendet wurde. Bei vier Isolaten zeigte das Medium einen Einfluss.

Wachstum der Bakterien in Gegenwart von MS: 20 µL der Sand/MS Mischung (in 0,08% Wasseragar suspendiert) wurden mit 70 µL Bakteriensuspension und 10 µL TSB Medium in Mikrotiterplatten gemischt. Es folgte die Inkubation bei 24 °C. Das bakterielle Wachstum wurde mittels Optischer Dichte (OD) bei 595 nm nach 0, 2, 5 und 7 Tagen gemessen.

Es konnte kein sichtbarer Einfluss der MS auf das Wachstum von *Pseudomonas* festgestellt werden. Zusätzlich wurde von 4 Isolaten die Lebendzellzahl mit Hilfe der *Most Probable Number*-Methode und das Auskeimen von MS nach Kontakt (bis zu 7 Tage) mit den Pseudomonaden bestimmt. In diesem Fall wurden Unterschiede beobachtet.

### **11.8 Chlorophyllfluoreszenzmessung**

Da davon ausgegangen werden kann, dass befallene Pflanzen im Vergleich zu gesunden Pflanzen einen veränderten Stoffwechsel aufweisen (*V. dahliae* stellt eine vaskuläre Krankheit dar und beeinflusst den Wasserhaushalt), wurde die Chlorophyllfluoreszenz (CF) mit Hilfe des Junior-PAM Chlorophyll-Fluorometer von Walz Mess- und Regeltechnik bestimmt.

Im Jahr 2010 wurden drei Erdbeerpflanzen nur mit *V. dahliae* infiziert, drei Pflanzen wurden mit *T. harzianum* T58 und drei Pflanze mit *T. harzianum* T58 behandelt und zusätzlich mit *V. dahliae* infiziert. Drei unbehandelte Pflanzen dienten als Kontrolle. Die durchgeführten Messungen ergaben keine eindeutigen Resultate da die Messungszeit zu kurz war. Der Versuch wurde nach zwei Monate abgebrochen da die Pflanzen Blattläuse hatten.

In Frühling 2011 wurden 6 Honeoye Pflanzen 10 min in eine 5 Tage alte *V. dahliae* Konidien Suspension getunkt und anschließend in Null-Erde gepflanzt und im Gewächshaus für 3 Monate kultiviert. Danach wurden die Pflanzen einen Monat bei 20 °C gelassen und die CF gemessen. Die Analyse der Resultate hat gezeigt, dass junge Pflanzen einen Y-Wert von 0,82 haben, während alte Blätter mit *V. dahliae* inokulierte Pflanzen einen niedrigeren Wert aufwiesen.

Im Sommer 2011 wurde ein Versuch mit den Antagonisten angesetzt. Die Hälfte der Pflanzen wurde 30 min in einer *V. dahliae*  $2 \times 10^6$  Konidien/mL Suspension getunkt und anschließend gepflanzt. Danach wurden die mit *V. dahliae* behandelte Pflanze und die unbehandelte Pflanze mit den Antagonisten angegossen. Nach 5 Wochen wurde alle zwei Wochen immer am selben Blatt Messungen durchgeführt. Die Kontrollpflanze mit *V. dahliae* war zu Beginn der Messungsreihe tot und die Pflanzen behandelt mit *T. atroviride* P1 starben im Laufe der Messungen ab. Abbildung 26 stellt ein Versuchsergebnis eines nicht wiederholten Versuches dar. Es zeigte sich, dass die CFs der nicht infizierten Kontrolle über den Beobachtungszeitraum nahezu konstant blieb. Hingegen konnte nach Infektion und anschließender Behandlung mit *T. harzianum* T58 nach einer Abnahme der CF ein anschließender Anstieg auf das Niveau der Kontrolle beobachtet werden. Ob dieses Messsystem für die Beschreibung eines Krankheitsverlaufes mit herangezogen werden kann, müssen weitere Versuche erbringen.

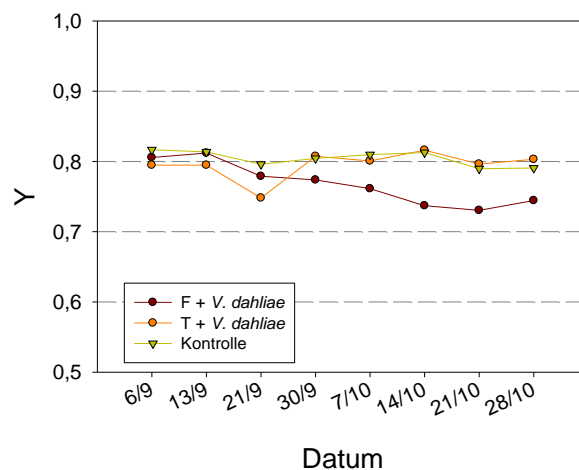


Abbildung 26: Nicht wiederholten Resultate der CF-Messungen von Erdbeerblätter (cv. Honeoye) behandelt mit FZB24® (F) und *T. harzianum* T58 (T) und mit *V. dahliae* Konidien inokuliert.

### **11.9 Beta-Glucanase Messung**

In der Literatur wird beschrieben, dass mit *V. dahliae* infizierte Pflanzen das PR Protein Beta-Glucanase produzieren. Dafür wurden inokulierte und nicht inokulierte Pflanzen nach der nach Sasse (1997) beschriebenen Methode analysiert. Hierfür wurde ein Teil der Pflanze (in unseren Fall wurden Blatt, Stängel, Rhizom und Wurzel) in Extraktionspuffer (0,1 M Natriumacetat, pH 5) gemörsert und anschließend bei 15000 rpm für 10 min zentrifugiert. Für jede Probe wurden drei Mikrotiterwell mit jeweils 50 µL Puffer (0,2 M Natriumacetat, pH 5), 100 µL Probe und 50 µL CM-Curdalan gefüllt (und eines zusätzlich für die negative Kontrolle ohne Probe) und für zwei Stunden bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µL 2N HCl hinzugegeben (bei der negative Kontrolle erst 100 µL Probe und gleich danach das HCl) und für 10 min auf Eis gelegt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (2500 rpm für 10 min) und 175 µL wurden für die photometrische Messung bei 595 nm genutzt. Die Auswertung der Daten ergab allerdings keine eindeutigen Ergebnisse, so dass dieser Versuchsaufbau nicht weiter verfolgt wurde.

**ANHANG**

Tabelle 9:: Verwendete Nährmedien und Nährlösungen. Angaben für 1 L

Medium	
CD	35,0 g Czapek- Dox Broth (Otto Nordwald, #233810)
CDA	CD 15,0 g Agar-Agar (Roth, #5210.2)
GYM	4,0 g Glucose (Merck, #1.08337.1000) 4,0 g Hefeextrakt (Merck, #1.03753.0500) 10,0 g Malzextrakt (Merck, #1.05391.0500) 2,0 g CaCO <sub>3</sub> (Merck, #1.02066.1000) 12,0 g Agar-Agar (Roth, #5210.2)
MPA	30,0 g Malzextrakt ( Merck, #1.05391.0500) 5,0 g Pepton aus Sojabohnenmehl (Merck, #1.07212.0500) 15,0 g Agar-Agar (Roth, #5210.2)
OMA	72,5 g Difco™ Oatmeal Agar (Otto Nordwald, #255210)
PDA	39,0 g Difco™ Potato Dextrose Agar (Otto Nordwald, #213400)
PDB	24,0 g Difco™ Potato Dextrose Broth (Otto Nordwald, #254920)
Quarzsand-Roggenmehl Gemisch (Heitmann, persönliche Mitteilung)	210,0 g Quarzsand 15,0 g Roggenmehl (health food quality) 20 mL entionisiertes Wasser
Roggen-Sitosterol-Agar (in Anlehnung an das CIP Manual)	10,0 g Gefriergetrocknete Roggenmasse 5,0 g D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck, # 1.08342) 0,05 g β-Sitosterol (Fluka, #85451) 20,0 g Agar-Agar (Roth, #5210.2)
SPTB	1,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, #1.04873.0250) 4,0 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Roth, #6875.1) 2,0 g Polygalacturonic acid (MP, #102711) 25,0 mL Bodenextrakt
SPTA	SPTB 15,0 g Agar-Agar (Roth, #5210.2)
TSB	30,0 g Bacto™ Tryptic Soy Broth (Otto Nordwald, #211822)
TSA	TSB 15,0 g Agar-Agar (Roth, #5210.2)
TSM	1,00 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 3,30 g D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck, #1.08342) 0,90 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Roth, #6875.1) 0,15 g KCl 0,20 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 20,0 g Bacto Agar (Otto Nordwald, #214010) 0,15 g Bengalrosa 0,30 g Streptomycinsulfat (Sigma, #3810-74-0)
V8-Agar (Romero and Erwin, 1959)	300 mL Gemüsesaft (Viva Vital, Netto) 4,5 g CaCO <sub>3</sub> (Merck, #1.02066.1000) 15,0 g Agar-Agar (Roth, #5210.2) 30 mg β-Sitosterol (Fluka, #85451)

Tabelle 10: Ergebnisse zur Wirksamkeit mikrobiologischer Präparate (in vitro); in rot nicht eindeutig mit BIOLOG identifiziert (Geisenheim)

	<i>V. dahliae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>
<b>Antagonist</b>				
	Hemmwirkung ± Stdev	Hemmwirkung ± Stdev	Hemmwirkung ± Stdev	Hemmwirkung ± Stdev
Aktinomycet 984	20,24 ± 4,49	16,67 ± 1,79	13,99 ± 2,10	78,17 ± 1,72
Aktinomycet 98A	14,88 ± 2,53	16,07 ± 2,15	23,41 ± 2,81	80,56 ± 6,98
Aktinomycet A267	49,01 ± 2,41	38,49 ± 6,25	20,83 ± 2,53	86,51 ± 1,82
<i>Ampellomyces quisqualis</i> AQ10	22,92 ± 2,95	44,84 ± 2,48	25,2 ± 0,91	86,9 ± 0,60
<i>Aneisibacillus migulans</i>	0,60 ± 0,84	6,35 ± 6,90	8,53 ± 8,08	n.a.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	9,97 ± 0,75	26,64 ± 20,4	n.a.	88,69 ± 0,00
<i>Bacillus (fastidiosus?)</i> U461a	27,78 ± 0,91	n.a.	0,60 ± 1,03	30,95 ± 53,61
<i>Bacillus (halodurans?)</i>	10,52 ± 4,62	13,1 ± 11,36	36,31 ± 2,53	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus (laevolacticus?)</i> II16/1	0,40 ± 0,69	13,39 ± 1,26	17,26 ± 0,84	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus (megaterium?)</i> 975	27,98 ± 2,06	35,42 ± 0,42	30,75 ± 0,91	90,48 ± 0,00
<i>Bacillus (megaterium?)</i> IV298a	1,39 ± 2,41	12,9 ± 0,69	29,17 ± 0,84	36,11 ± 14,12
<i>Bacillus (subtilis?)</i> A K13	32,94 ± 24,02	35,71 ± 1,57	40,77 ± 1,26	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus</i> 051	14,29 ± 0,00	9,52 ± 9,83	25,2 ± 4,47	74,4 ± 5,89
<i>Bacillus amyloliquefacens</i> FZB42	31,55 ± 3,37	35,12 ± 4,17	44,44 ± 2,41	90,48 ± 0,00
<i>Bacillus brevis</i> (evtl. <i>Brevibacillus?</i> )	13,10 ± 3,15	11,01 ± 2,1	13,49 ± 14,35	80,16 ± 13,95
<i>Bacillus circulans</i> (BIOLOG)	41,87 ± 4,47	48,02 ± 4,22	29,37 ± 1,91	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus laevolactus</i> (BIOLOG)	44,44 ± 10,85	57,54 ± 0,34	31,55 ± 0,00	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus licheniformis?</i>	27,18 ± 0,69	35,52 ± 0,34	33,53 ± 2,81	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus mycoides</i> B153	12,30 ± 3,83	18,45 ± 3,31	8,13 ± 8,04	81,55 ± 12,67
<i>Bacillus mycoides</i> B154	18,65 ± 18,12	n.a.	11,71 ± 4,96	88,49 ± 4,18
<i>Bacillus pumilis</i> BB1-3-5	36,31 ± 14,67	27,58 ± 9,68	35,12 ± 2,38	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus</i> SLU3	31,15 ± 3,28	33,93 ± 2,98	35,12 ± 9,58	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus subtilis</i> 1Pe4 - 13	32,94 ± 9,82	31,25 ± 2,95	36,9 ± 4,21	87,5 ± 2,98
<i>Bacillus subtilis</i> A (BIOLOG)	26,98 ± 0,91	32,59 ± 2,40	40,48 ± 3,37	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus subtilis</i> B2g	41,67 ± 1,68	40,67 ± 8,04	43,75 ± 1,26	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus subtilis</i> MB/600	28,77 ± 0,34	34,92 ± 0,34	21,43 ± 0,84	89,68 ± 1,37
<i>Bacillus subtilis</i> QST713	28,37 ± 1,24	35,12 ± 1,19	40,77 ± 2,10	92,86 ± 0,00
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	30,56 ± 5,40	36,9 ± 3,09	44,05 ± 2,53	85,52 ± 1,82
<i>Bacillus thuringiensis</i> Dipel ES	14,88 ± 1,68	n.a.	10,71 ± 0,84	92,06 ± 1,37
<i>Bacillus thuringiensis</i> Dipel WP	n.a.	8,33 ± 0,00	7,44 ± 2,95	42,06 ± 22,29
<i>Bacillus thuringiensis</i> San 415 re	20,24 ± 4,21	n.a.	10,86 ± 13,73	42,66 ± 44,21
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	12,7 ± 7,77	13,99 ± 1,26	3,97 ± 6,87	77,78 ± 17,87
<i>Bacillus thuringiensis</i> Thuricide HD 97	16,07 ± 10,43	20,83 ± 3,37	21,13 ± 6,31	72,02 ± 6,21
Bakterien 1010	38,49 ± 9,01	37,5 ± 1,68	20,63 ± 7,44	84,23 ± 1,26
Bakterien I135a	n.a.	13,69 ± 0,00	20,44 ± 2,75	n.a.
Bakterien II79/2	0,40 ± 0,69	12,20 ± 0,42	17,66 ± 2,09	83,93 ± 4,87
Bakterien IV906	11,11 ± 19,25	23,81 ± 10,10	19,25 ± 3,28	90,48 ± 2,48
Bakterien U439b	0,30 ± 0,42	n.a.	n.a.	n.a.
<i>Beauveria bassiana</i>	33,13 ± 3,64	30,75 ± 2,41	18,45 ± 1,19	92,86 ± 0,00
<i>Burkholderia bryophila</i> sp. nov. A5	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>Burkholderia glumae</i> (BIOLOG) U407a/1	1,19 ± 1,68	n.a.	n.a.	9,82 ± 7,16
<i>Burkholderia glumae</i> (BIOLOG) U442b/b	7,14 ± 7,14	7,14 ± 0,00	14,29 ± 0,00	n.a.
<i>Clonostachys rosea</i> IK726	55,16 ± 7,35	51,19 ± 1,19	0,60 ± 0,84	86,11 ± 1,82
<i>Clonostachys</i> sp.	55,36 ± 2,59	50,99 ± 0,69	24,60 ± 2,25	92,86 ± 0,00
<i>Collimonas fungivorans</i> A23	31,35 ± 7,15	29,17 ± 5,36	39,58 ± 2,95	92,86 ± 0,00
<i>Enterobacter radicicitans</i> 1	35,12 ± 4,49	32,54 ± 4,81	48,21 ± 1,68	92,86 ± 0,00
<i>Enterobacter radicicitans</i> 2	35,12 ± 5,05	12,8 ± 1,26	17,86 ± 1,68	92,86 ± 0,00



	<i>V. dahliae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>
<b>Antagonist</b>				
	Hemmwirkung ± Stdev	Hemmwirkung ± Stdev	Hemmwirkung ± Stdev	Hemmwirkung ± Stdev
<i>Erwinia herbicola</i>	12,95 ± 11,52	30,36 ± 1,68	22,22 ± 5,96	20,44 ± 1,50
Gurke Wurzel 1	33,48 ± 27,02	85,71 ± 2,06	64,48 ± 5,40	92,86 ± 0,00
<i>Isaria fumosorosea</i> 12	79,76 ± 6,86	88,10 ± 0	n.a.	90,48 ± 0,00
<i>Metarhizium anisopliae</i> Ma43	67,46 ± 3,64	66,07 ± 6,73	53,77 ± 7,05	92,86 ± 0,00
<i>Metschnikowia fructicola</i>	n.a.	4,61 ± 5,33	8,53 ± 3,05	92,86 ± 0,00
<i>Microsphaeropsis</i> sp.	27,08 ± 2,10	26,98 ± 4,18	20,54 ± 4,63	84,52 ± 2,73
<i>Penicillium oxalicum</i>	68,30 ± 2,50	47,42 ± 1,82	40,08 ± 10,12	88,10 ± 1,03
<i>Pseudomonas (synxantha?)</i> E183	2,58 ± 2,41	0,99 ± 1,72	23,51 ± 1,26	86,31 ± 1,79
<i>Pseudomonas aurantiaca</i> SDK2-2-6	3,97 ± 4,96	0,60 ± 0,84	17,86 ± 2,15	88,10 ± 0,00
<i>Pseudomonas clororaphis</i> MA342	37,5 ± 0,84	23,21 ± 2,15	26,49 ± 2,95	26,00 ± 1,26
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B040	n.a.	n.a.	19,94 ± 1,26	48,81 ± 0,84
<i>Pseudomonas fluorescens</i> biotyp F?	0,40 ± 0,69	12,8 ± 3,79	19,25 ± 2,94	75,99 ± 1,50
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CHA0	22,22 ± 9,89	20,24 ± 0,84	22,62 ± 3,15	85,71 ± 7,46
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DMZS 13134	n.a.	28,57 ± 2,59	48,21 ± 0,60	92,86 ± 0,00
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf153	3,37 ± 3,59	5,95 ± 0,84	27,98 ± 2,59	91,53 ± 1,40
<i>Pseudomonas putida</i> 1T1	25,79 ± 11,08	15,18 ± 2,95	17,56 ± 2,10	92,86 ± 0,00
<i>Pseudomonas</i> sp. WCS365	2,38 ± 4,12	3,57 ± 3,15	17,26 ± 1,19	92,86 ± 0,00
<i>Pseudomonas trivialis</i> 3Re2-7	1,79 ± 2,53	6,85 ± 2,10	22,22 ± 4,99	86,31 ± 9,35
<i>Pseudomonas trivialis</i> RE*1-1-14	11,31 ± 2,73	13,29 ± 1,50	18,75 ± 1,26	80,16 ± 7,27
<i>Pythium oligandrum</i>	25,79 ± 4,22	28,37 ± 16,99	22,42 ± 0,91	92,86 ± 0,00
RI 5	56,15 ± 4,22	49,8 ± 3,87	30,75 ± 0,34	92,86 ± 0,00
<i>Serratia entomophila</i> 363 Nr. 79	1,19 ± 1,19	2,38 ± 0,00	n.a.	86,31 ± 0,60
<i>Serratia plymuthica</i> HRO-C48	32,54 ± 8,08	18,06 ± 2,68	23,21 ± 1,03	92,86 ± 0,00
<i>Serratia plymuthica</i> HRO-C48	19,44 ± 1,50	18,06 ± 3,05	22,82 ± 1,24	92,86 ± 0,00
<i>Serratia plymuthica</i> RR2-5-10	29,17 ± 5,29	15,08 ± 0,69	20,04 ± 3,28	92,06 ± 1,37
<i>Serratia proteamaculans</i> BSR1-2-6	35,71 ± 13,05	15,67 ± 0,34	53,37 ± 10,65	92,86 ± 0,00
<i>Staphylococcus (epidermis?)</i>	58,04 ± 8,84	54,76 ± 2,38	30,36 ± 3,31	92,86 ± 0,00
<i>Staphylococcus (xylosus?)</i>	1,19 ± 1,68	1,39 ± 2,41	n.a.	6,55 ± 6,27
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10 P69	28,87 ± 5,47	n.a.	n.a.	67,00 ± 21,04
<i>Streptomyces albidoflavus</i> 1W1	19,44 ± 1,37	54,32 ± 11,79	20,54 ± 0,42	47,02 ± 20,20
<i>Streptomyces albidoflavus</i> 1W1	16,07 ± 1,68	16,37 ± 0,42	18,25 ± 0,69	92,86 ± 0,00
<i>Streptomyces graminofaciens</i> FZB53	58,04 ± 2,95	46,73 ± 9,68	17,86 ± 0,84	58,53 ± 1,91
<i>Streptomyces</i> sp 62A	21,23 ± 2,81	20,24 ± 3,31	32,14 ± 0,84	92,86 ± 0,00
<i>Subtercola pratensis</i> Rüb1-3-7	0,60 ± 0,84	n.a.	n.a.	92,86 ± 0,00
<i>Trichoderma asperellum</i>	43,45 ± 3,09	82,94 ± 1,91	67,66 ± 1,24	92,86 ± 0,00
<i>Trichoderma atroviride</i> P1	86,71 ± 4,22	89,48 ± 0,34	71,23 ± 2,25	92,86 ± 0,00
<i>Trichoderma</i> ICC1	83,93 ± 0,84	23,51 ± 4,63	31,40 ± 27,94	88,89 ± 2,09
<i>Trichoderma</i> ICC2	44,64 ± 6,44	38,49 ± 2,94	21,03 ± 1,50	74,01 ± 2,94
<i>Trichoderma harzianum</i>	25,00 ± 10,33	73,51 ± 11,32	51,19 ± 3,57	92,86 ± 0,00
<i>Trichoderma harzianum</i> RR	50,99 ± 0,91	85,32 ± 2,41	69,05 ± 4,29	92,86 ± 0,00
<i>Trichoderma harzianum</i> T22	25,79 ± 1,50	50,00 ± 4,72	34,23 ± 26,64	90,48 ± 0,00
<i>Trichoderma harzianum</i> T39	47,02 ± 10,58	62,2 ± 31,53	70,68 ± 5,68	92,86 ± 0,00
<i>Trichoderma harzianum</i> T39	11,31 ± 1,68	66,87 ± 1,91	51,39 ± 1,50	92,06 ± 1,37
<i>Trichoderma harzianum</i> T58	87,3 ± 0,69	85,42 ± 3,79	69,84 ± 1,50	92,86 ± 0,00
<i>Trichoderma harzianum</i>	22,62 ± 2,06	80,36 ± 7,18	60,52 ± 4,39	92,86 ± 0,00
<i>Trichoderma</i> PR-9-10-9	50,20 ± 6,08	81,55 ± 7,24	68,85 ± 3,87	88,49 ± 2,41
<i>Trichoderma virens</i>	66,67 ± 1,68	77,53 ± 2,30	62,10 ± 2,68	92,86 ± 0,00
Ulme 3	53,33 ± 15,25	31,55 ± 0,60	27,38 ± 4,87	90,48 ± 0,00
<i>Verticillium lecanii</i> 18	35,32 ± 2,25	31,55 ± 0,84	23,61 ± 0,91	82,34 ± 2,41

	<i>V. dahliae</i>	<i>V. albo-atrum</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>P. fragariae</i> var. <i>fragariae</i>
<b>Antagonist</b>				
	Hemmwirkung ± Stdev	Hemmwirkung ± Stdev	Hemmwirkung ± Stdev	Hemmwirkung ± Stdev
<i>Verticillium lecanii</i> 23	45,24 ± 5,46	29,56 ± 1,50	21,43 ± 2,53	73,41 ± 4,31
We18	51,79 ± 4,86	50,60 ± 8,99	30,56 ± 3,05	92,86 ± 0,00

*Enterobacter radicicitans* 1 und 2: reisoliert aus Präparat der Firma Abitep.

*Trichoderma* ICC1 und 2: reisoliert aus Produkt Bioten Mix der Firma Intrachem bestehend aus *T. harzianum* ICC012 und *T. viride* ICC080. Da keiner für folgende Versuche benutzt wurde, wurde auf eine Bestimmung verzichtet.

*Streptomyces albidoflavus* 1W1: wurde auf zwei verschiedene Nährmedien gezogen (GYM und PDA)

*Trichoderma harzianum* T39: wurde von zwei verschiedenen Personen reisoliert

*Serratia plymuthica* HRO-C48: wurde von zwei verschiedenen Quellen bezogen

Tabelle 11: Getestete Mikroorganismen die als Produkt verfügbar sind

Antagonist	Produktname
<i>Ampellomyces quisqualis</i> AQ10	AQ10
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Boniforte
<i>Bacillus amyloliquefacens</i> FZB42	RhizoVital42
<i>Bacillus subtilis</i> QST713	Serenade
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	RhizoPlus®
<i>Bacillus thuringiensis</i> Dipel ES	Dipel ES re Nr. 127
<i>Bacillus thuringiensis</i> Dipel WP	Dipel WP re Nr. 126
<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	Xentari
<i>Bacillus thuringiensis</i> Thuricide HD 97	Thuricide
<i>Beauveria bassiana</i>	Naturalis
<i>Isaria fumosorosea</i> 12	Preferal (PFR-97) Stamm <i>Bemisia argentifolia</i>
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> MA342	Cedemon
<i>Pseudomonas fluorescens</i> DMZS 13134	Proradix
<i>Pseudomonas trivialis</i> 3Re2-7	Salavida
<i>Pythium oligandrum</i>	Polyversum
<i>Serratia plymuthica</i> HRO-C48	Rhizostar
<i>Trichoderma asperellum</i>	Ecofit
<i>Trichoderma harzianum</i>	Vitalin
<i>Trichoderma harzianum</i>	Supresivit
<i>Trichoderma harzianum</i> ICC012	Bioten mix
<i>Trichoderma harzianum</i> T22	Trianum-P
<i>Trichoderma harzianum</i> T39	Trichodex
<i>Trichoderma harzianum</i> T58	Trichostar
<i>Trichoderma virens</i>	Soilgard
<i>Trichoderma viride</i> ICC080	Bioten mix
<i>Verticillium lecanii</i> 18	Vertalec
<i>Verticillium lecanii</i> 23	Mycotal

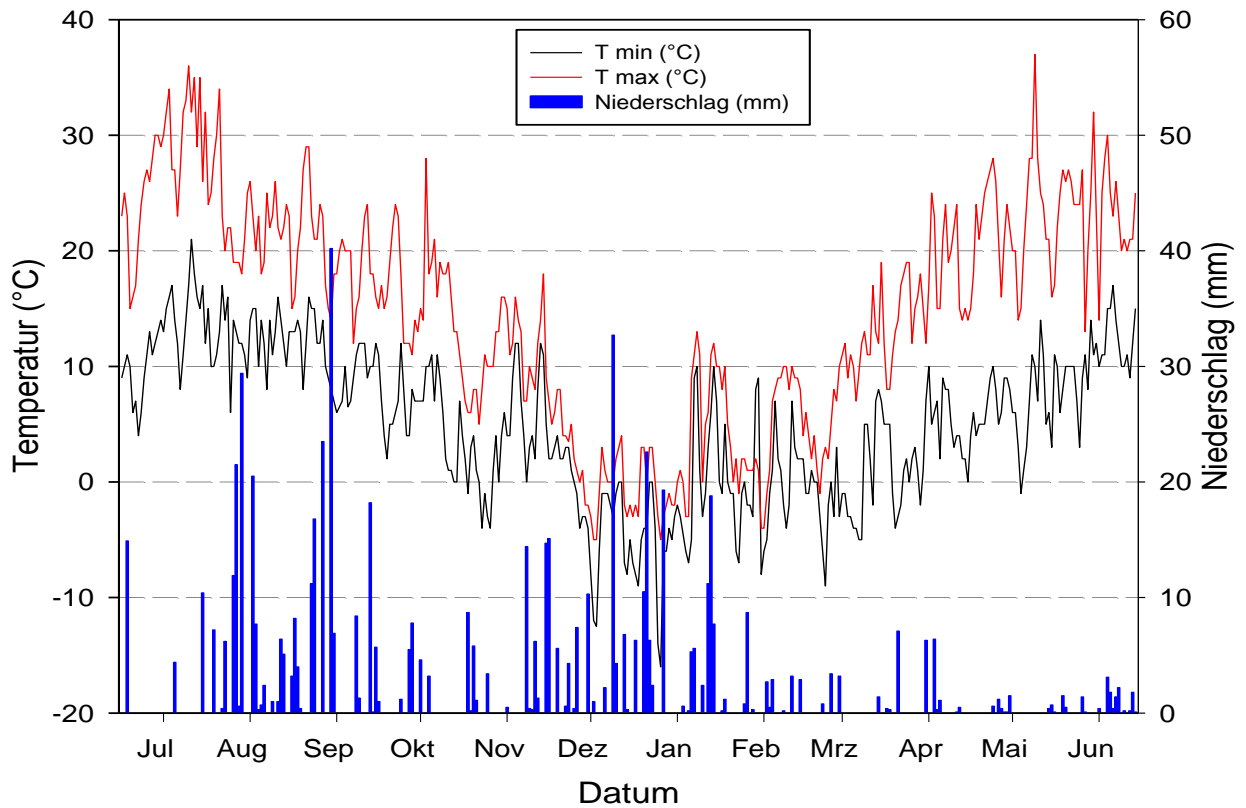


Abbildung 27: Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen während des Versuchszeitraum von Feld 1 und Feld 2 (vom 16.06.2010 bis 14.06.2011)

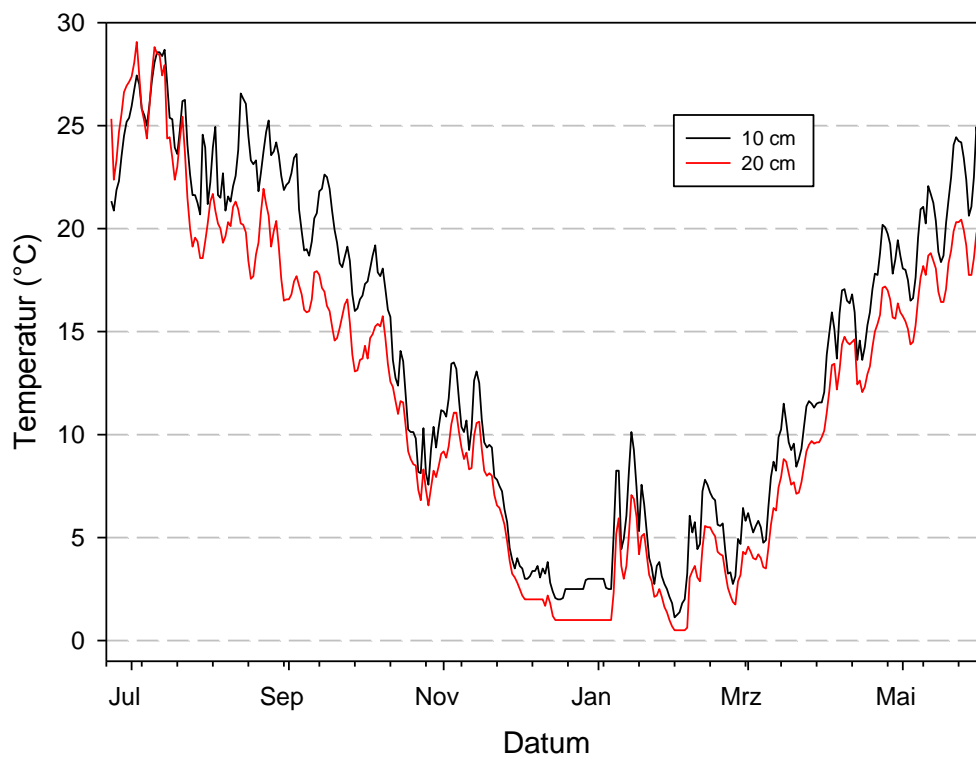


Abbildung 28: Temperaturverlauf in 10 und 20 cm Tiefe Feld 1 und 2

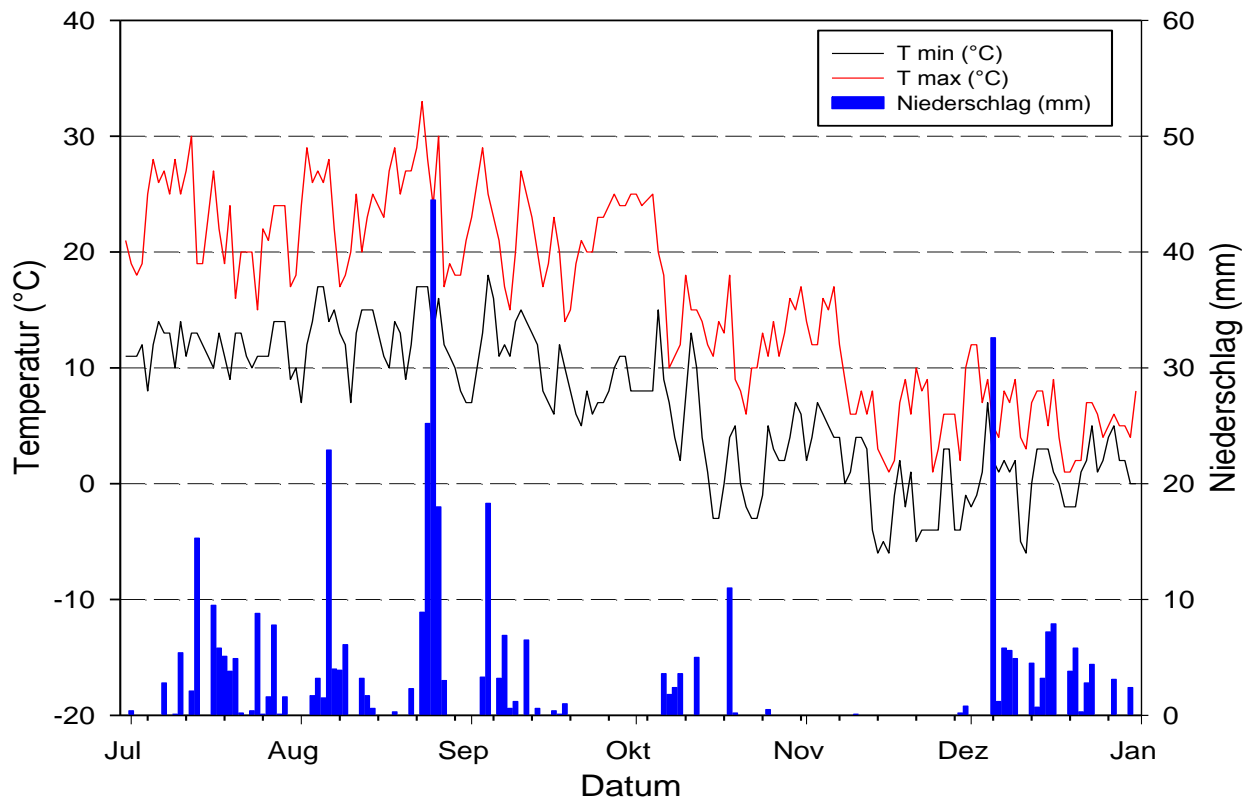


Abbildung 29: Temperaturverlauf und Niederschlag Mengen vom Pflanztag (29.06.2011) bis 31.12.2011 von Feld A und Feld B

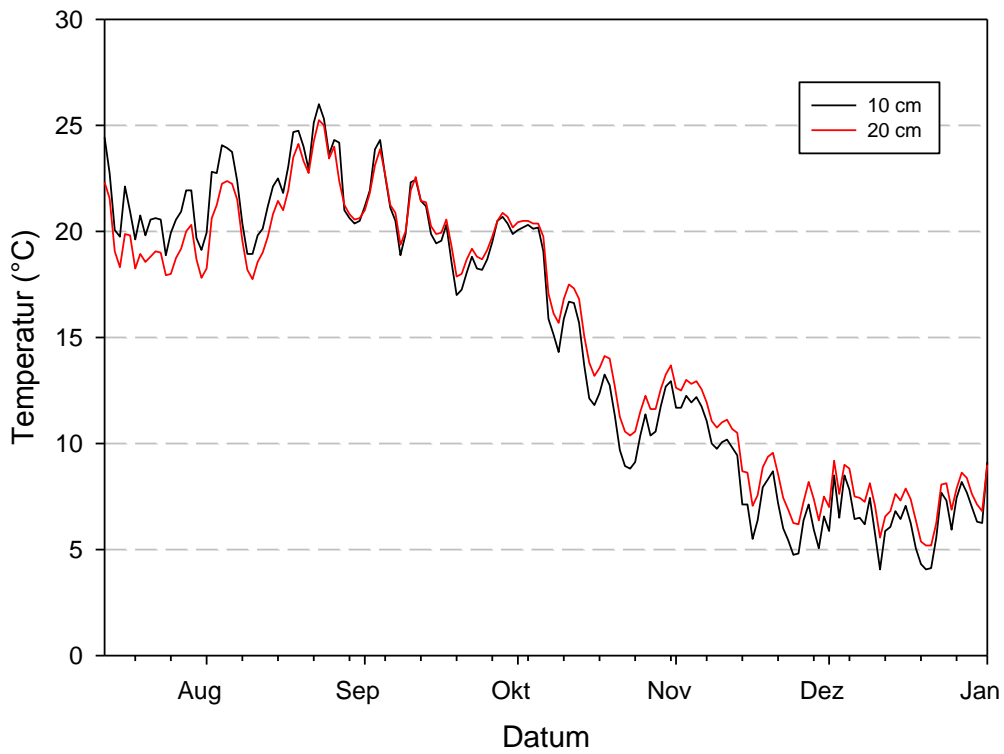


Abbildung 30: Temperaturverlauf in 10 und 20 cm Tiefe Feld A und B