



**Biologische Bekämpfung von *Rhizoctonia solani*  
im ökologischen Anbau mit Hilfe von bakteriellen  
und pilzlichen Antagonisten**

**Herausgeberin:**

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)  
53168 Bonn

Tel.: +49 228 6845-280 (Zentrale)

Fax: +49 228 6845-787

E-Mail: [geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de](mailto:geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de)

Internet: [www.bundesprogramm-oekolandbau.de](http://www.bundesprogramm-oekolandbau.de)

Finanziert vom Bundesministerium für  
Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft  
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

**Auftragnehmer:**

Institut für Gemüse und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.  
und Universität Rostock, Institut für Molekulare Physiologie und  
Biotechnologie

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



# **Biologische Bekämpfung von *Rhizoctonia solani* im ökologischen Anbau mit Hilfe von bakteriellen und pilzlichen Antagonisten**

## **Abschlussbericht des Forschungsprojektes 02OE298**

an die Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung beim Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft

### **Vertragspartner:**

- 1) Institut für Gemüse und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.
- 2) Universität Rostock, Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie, Mikrobiologie

### **Berichtersteller:**

Rita Grosch, Jana Lottmann, Franziska Faltin, Gabriele Berg

**Laufzeit:** 01. Juni 2002 – 31. Oktober 2003

**Berichtszeitraum:** 01. Juni 2002 – 31. Oktober 2003

## **Inhaltsverzeichnis**

### **1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes**

#### **1.1 Planung und Ablauf des Projektes**

#### **1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand**

### **2 Material und Methoden**

#### **2.1 Selektion geeigneter bakterieller BCAs**

2.1.1 Antifungische Mechanismen *in vitro*

2.1.2 Untersuchungen des Exoenzymspektrums

2.1.3 Pflanzenwachstumsförderung *ad planta*

2.1.4 Wirkung auf die Sklerotienkeimung

#### **2.2 Selektion geeigneter pilzlicher BCAs**

2.2.1 Antifungische Mechanismen *in vitro*

2.2.2 Exoenzyme der antifungisch wirksamen Pilzisolat

2.2.3 Wirkung auf die Sklerotienkeimung

#### **2.3 Erstellung molekularer Fingerprints**

2.3.1 Bakterielle BCAs

2.3.2 Pilzliche BCAs

#### **2.4 Verifizierung der Pathogenitätstest**

2.4.1 Salat / AG 1-IB

2.4.2 Kartoffel / AG 3

2.4.3 Zuckerrübe / AG 4 und AG 2-2IIIB

## **2.5 Evaluation der ausgewählten BCAs unter kontrollierten Bedingungen**

### 2.5.1 Salat / AG 1-IB

#### 2.5.1.1 Salatblattscheiben -Test

### 2.5.2 Kartoffel / AG 3

### 2.5.3 Zuckerrübe / AG 4

## **2.6 Evaluation der ausgewählten BCAs unter Feldbedingungen**

### 2.6.1 Prüfung der antifungalen Wirkung an Salat

### 2.6.2 Prüfung der antifungalen Wirkung an Kartoffel

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Festlegung der Prüfbedingungen**

### **3.2 Selektion geeigneter bakterieller BCAs**

#### 3.2.1 Antifungische Wirkung der Bakterienisolate

#### 3.2.2 Antifungische Mechanismen *in vitro*

##### 3.2.2.1 Exoenzymspektrums und Bildung von Indol-3-Essigsäure

##### 3.2.2.2 Pflanzenwachstumsförderung *ad planta*

##### 3.2.2.3 Wirkung von Bakterienisolaten auf die Lebensfähigkeit von Sklerotien

### **3.3 Selektion geeigneter pilzlicher BCAs**

#### 3.3.1 Antifungische Wirkung der Pilzisolate

#### 3.3.2 Antifungische Mechanismen *in vitro*

##### 3.3.2.1 Exoenzyme der antifungisch wirksamen Pilzisolate

##### 3.3.2.2 Wirkung von Pilzisolaten auf die Lebensfähigkeit von Sklerotien

##### 3.3.2.3 Wirkung von Pilzisolaten auf die Keimfähigkeit parasitierten Myzels

##### 3.3.2.3 Mikroskopische Untersuchungen

### **3.4 Erstellung molekularer Fingerprints**

#### 3.4.1 Bakterielle BCAs

#### 3.4.2 Pilzliche BCAs

- 3.5 Evaluation der ausgewählten BCAs unter kontrollierten Bedingungen**
  - 3.5.1 Salat / AG 1-IB
  - 3.5.2 Kartoffel / AG 3
  - 3.5.3 Zuckerrübe / AG 4
- 3.6 Evaluation der ausgewählten BCAs unter Feldbedingungen**
  - 3.6.1 Prüfung der antifungalen Wirkung an Salat
  - 3.6.2 Prüfung der antifungalen Wirkung an Kartoffel
- 4 Diskussion**
  - 4.1 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse für den ökologischen Landbau
- 5 Zusammenfassung**
- 6 Gegenüberstellung der geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen**
- 7 Literaturverzeichnis**

## 1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

*Rhizoctonia solani* Kühn ist ein weit verbreiteter Bodenpilz, der an zahlreichen Kulturen zu erheblichen Ertragsverlusten führen kann. Der Erreger verursacht neben Auflaufschäden (z.B. Kartoffel, Zuckerrüben, Radies) auch Fäulen an verschiedenen Pflanzenorganen (Zwiebeln, Knollen, Wurzeln, Stengeln, Blättern, Blattscheiden). In Deutschland sind insbesondere Kartoffel, Zuckerrüben, Salat, Kohl, Radies oder Möhren durch den Befall mit *R. solani* betroffen.

Der Erreger *R. solani* ist aufgrund eines breiten Wirtspflanzenkreises und der sowohl parasitischen als auch saprophytischen Eigenschaften schwer zu bekämpfen. Die Dauerorgane (Sklerotien) sind über mehrere Jahre im Boden lebensfähig. Die saprophytische Aktivität wird im Boden durch organische Substanz gefördert. Im organischen Landbau wird jedoch ein hoher organischer Anteil im Boden angestrebt, so dass hier in Bezug auf den Erreger *R. solani* ein Zielkonflikt besteht.

Im ökologischen Landbau wird durch Einhaltung von Fruchtfolgen den Problemen mit bodenbürtigen Pathogenen entgegen gewirkt. Die Gestaltung von entsprechenden Fruchtfolgen beruht auf langjährigen Erfahrungen. Trotz der Einhaltung von Fruchtfolgen und der Richtlinien der EU-Verordnung für den ökologischen Landbau stellt *R. solani* im ökologischen Anbau an verschiedenen Kulturen (Kartoffel, Salat, Kohl, Zuckerrüben) ein Problem dar. Eine Ursache dafür könnte die Fähigkeit von *R. solani* sein, sich auch über sogenannte Nichtwirtspflanzen (z.B. Wildkräuter) zu vermehren. Derzeit fehlen Kenntnisse darüber, welche Nichtwirtspflanzen unter Feldbedingungen befallen werden. Das erschwert die Gestaltung von effektiven Fruchtfolgen, die der Erregerentwicklung entgegen wirken. Bei der Kartoffel kann *R. solani* über Sklerotien an den Knollen leicht verbreitet werden. Nicht immer sind sie visuell wahrnehmbar. Der sogenannte latente Befall stellt insbesondere für die Pflanzkartoffelproduktion im ökologischen Landbau ein zunehmendes Problem dar. Aussagen über die Bedeutung dieses latenten Befalls sind derzeit ebenfalls nicht verfügbar.

Bekämpfungsstrategien stehen derzeit generell nicht zur Verfügung. Eine Lösung zur Bekämpfung von *R. solani* bietet der biologische Pflanzenschutz. Der Einsatz natürlicher bakte-

rieller und pilzlicher Antagonisten zur Kontrolle von bodenbürtigen Phytopathogenen stellt außerdem eine ökologisch nachhaltige Bekämpfungsmöglichkeit dar.

Ziel des Projekts ist daher die Entwicklung einer biologischen Bekämpfungsstrategie gegen *Rhizoctonia solani* für den Kartoffel-, Zuckerrüben-, Kohl und Salatanbau. Durch den Einsatz von Antagonisten soll der Aktivität des Erregers (z.B. durch Mykoparasitismus) und damit im weiteren dem Aufbau eines pathogenen Potenzials im Boden entgegen gewirkt werden. Eine weitere Strategie ist die Stärkung der Pflanzengesundheit, wodurch eine Verzögerung der Krankheitsentwicklung erreicht werden kann. Die Kombination beider Strategien z.B. durch Einsatz eines effektiven pilzlichen und bakteriellen Mikroorganismus kann eine erfolgreiche Krankheitskontrolle darstellen.

## **1.2 Planung und Ablauf des Projektes**

### **Selektion geeigneter BCAs**

- Prüfung der antifungalen Wirkung gegen *R. solani* in Dualkultur
- Antifungale Wirkung gegenüber virulenten Anastomosegruppen (AGs) in Dualkultur
- Exoenzymspektrum von antifungal wirksamen Antagonisten
- Pflanzenwachstumsförderung *ad planta* (Keimlingstest)

### **Verifizierung der Pathogenitätstest**

- Salat / AG 1-IB
- Kartoffel / AG 3
- Zuckerrübe / AG 4 und AG 2-2IIIB

### **Erstellung molekularer Fingerprints**

- bakterielle BCAs
- pilzliche BCAs

### **Evaluation der ausgewählten BCAs unter kontrollierten Bedingungen**

- Prüfung der antifungalen Wirkung an Salat, Kartoffel und Zuckerrübe
- Prüfung der Wirkung der BCAs auf das Pflanzenwachstum

### **Evaluation der ausgewählten BCAs unter Feldbedingungen**

- Prüfung der antifungalen Wirkung an Salat
- Prüfung der antifungalen Wirkung an Kartoffeln





### 1.2.1 Wissenschaftlicher und technischer Stand

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Probleme in der modernen Pflanzenproduktion offensichtlich. Der Ausbau von landwirtschaftlichen Monokulturtechniken ist für einen enormen Verlust der Biodiversität weltweit verantwortlich. Zusätzlich hat der Gebrauch von chemischen Pflanzenschutzmitteln zahlreiche ökologische Schäden angerichtet. Dennoch sind einige Schaderreger wie z.B. *R. solani* nicht bekämpfbar und nachhaltige Lösungen im Pflanzenbau und -schutz generell gefordert. Bekämpfungsmöglichkeiten gegen *R. solani* sind derzeit weder im ökologischen Landbau noch für manche Kulturen wie die Zuckerrübe in der konventionellen Pflanzenproduktion vorhanden. Resistente Sorten stehen für den Anbau ebenfalls nicht zur Verfügung.

Eine Strategie kann der biologische Pflanzenschutz liefern, durch Einsatz natürlicher Gegenspieler (Antagonisten) als Biological Control Agents (BCAs) zur Pathogenkontrolle (Weller 1988, Marten et al. 2001). Antagonismus wird über die Fähigkeit der Bakterien antifungal wirksame Substanzen, lytische Enzyme oder Konkurrenzmechanismen (z. B. Siderophoren, Nährstoffkonkurrenz, Konkurrenz um Raum oder Infektionsstellen) vermittelt (Fravel 1988, Chet et al. 1990). Neben diesen antagonistischen Eigenschaften spielt die Wachstumsförderung durch pflanzenassoziierte Mikroorganismen eine große Rolle. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), die das Pflanzenwachstum durch die Produktion von Phytohormonen begünstigen, die Nährstoffaufnahme durch die Wurzel fördern oder durch induzierte Resistenz (IR) zum Erhalt oder der Förderung der Pflanzengesundheit beitragen, sind von großem Interesse für eine umweltfreundliche Landwirtschaft (Schönbeck 1998).

In Deutschland stehen zur Zeit keine biologischen Agenzien zur Bekämpfung von *R. solani* zur Verfügung. Auf der internationalen Liste der kommerziellen biologischen Agenzien gegen bodenbürtige Pathogene sind Produkte wie SoilGard (*Gliocladium virens*), Intercept, Deny (=Blue Circle) (*Burkholderia cepacia*), Kodiak (*Bacillus subtilis*) und T-22G (*Trichoderma harzianum*) zur Anwendung gegen *Rhizoctonia* aufgeführt, die jedoch nicht für Kartoffel, Zuckerrübe oder Gemüsekulturen zugelassen sind. Das Präparat Deny wurde aufgrund seiner fakultativ humanpathogenen Eigenschaften vom Markt genommen (Govan et al. 2000). Die Produkte wurden auch nicht speziell zur Bekämpfung von *Rhizoctonia* entwickelt. Insgesamt zeigen die Erfahrungen aus der Forschung, dass die Anwendung biologischer Agenzien Teil einer erfolgreichen Bekämpfungsstrategie auch gegen *R. solani* sein können (Lewis & Kulik 1996).

Obwohl *R. solani* als relativ unspezialisierter Erreger gilt, weisen einzelne genetische Gruppen oder Anastomosegruppen (AGs) eine gewisse Wirtsspezifität auf. Die daraus resultierenden Unterschiede in der Krankheitsentwicklung sind beim Einsatz biologischer Agenzien gegen *R. solani* zu berücksichtigen. So kann die Krankheitsentwicklung an der Kartoffel von an der Knolle überdauernden Sklerotien des Erregers ausgehen, während an der Zuckerrübe, an Salat oder Kohl die Primärinfektion von keimenden Sklerotien im Boden verursacht wird und erste Symptome nicht unbedingt im Frühstadium der Pflanzenentwicklung zu beobachten sind. Zu prüfen ist, inwieweit eine unterschiedliche Sensitivität der AGs gegenüber antagonistisch wirkenden Mikroorganismen besteht. Effektive antifungal wirkende Mikroorganismen sollten gegen die relevanten AGs (AG 2-2, AG 1-IB, AG 3, AG 4) des Erregers wirksam sein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Selektion geeigneter bakterieller BCAs

Die antifungische Aktivität von 4 bekannten BCAs wurde gegenüber verschiedenen *R. solani* Isolaten relevanter AGs (Tab. 1) bei 15 °C und 20 °C auf Waksman-Agar getestet, um die Prüfbedingungen im nachfolgenden Screening festzulegen. Die Auswertung der gebildeten Hemmhöfe erfolgte nach 4, 7 und 10 Tagen.

Tab. 1: Übersicht der verwendeten *Rhizoctonia solani* Isolate sowie geprüften BCAs

<i>R. solani</i> Isolat	AG	Wirtspflanze	BCAs (Identifizierung nach 16S rDNA)
RHI SO 7/3/14	AG 1-IB	Kopfsalat	<i>Bacillus subtilis</i> B2g
RHI SO H5	AG 1-IB	Kopfsalat	<i>Serratia plymuthica</i> C48
RHI SO 119	AG 3	Kartoffel	<i>Pseudomonas putida</i> R RE 109
RHI SO 325	AG 3	Kartoffel	<i>Streptomyces setonii</i> RP 87
RHI SO W4	AG 2	Weißkohl	
RHI SO W8	AG 2	Weißkohl	
RHI SO K	AG 2-IIIB	Zuckerrübe	

### **2.1.1 Antifungische Mechanismen in vitro**

#### **Dualkulturtest**

Die Überprüfung der antifungischen Aktivität der Bakterienisolaten erfolgt *in vitro* in Dualkultur. Auf jede Petrischale (Waksman-Agar, WA) wurden 4 Myzelscheiben (Durchmesser 6 mm) einer aktiven Pilzkultur des jeweiligen Testisolates platziert. Nach Beimpfen der Bakterienisolate (4 je Petrischale) zwischen den Myzelscheiben wurden die Petrischalen bei 20°C inkubiert. Die Messung der Hemmhöhe (HH) erfolgte nach 4, 7 und 10 Tagen. Die Bewertung wurde nach folgendem Schema vorgenommen: +++HH > 10 mm, ++HH = 5 - 10 mm, +HH = 2 - 5 mm.

### **2.1.2 Untersuchungen des Exoenzymspektrums**

Von den selektierten Isolaten wurde das Exoenzymspektrum *in vitro* untersucht, um auf mögliche antagonistische Mechanismen schließen zu können. Geprüft wurde die Bildung der lytischen Enzyme Chitinase, Glucanase und Protease sowie die Fähigkeit der Siderophorenproduktion und die Bildung von Indol-3-essigsäure. Die Auswertung der mit den entsprechenden Bakterienisolaten beimpften Testmedien erfolgte jeweils qualitativ (Tab. 2).

#### **Nachweis der Chitinaseaktivität**

Für den Nachweis der Chitinaseaktivität werden die Platten mit chitinhaltigem Medium (0.5 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub>-Lsg., 0.5 ml 1M MgSO<sub>4</sub>-lsg., 0.5 ml 0.1%ige Thiaminlösung, 0.25 g NaCl, 0.81 NB II(Sifin), 3 g M9 Salz (Sigma), 7.5 g Agar und 1 g kolloidales Chitin) mit je 4 Isolaten beimpft und mindestens 5 Tage bei 20 °C inkubiert. Die Produktion der Enzyme ist an der Bildung von klaren Hemmzonen um das applizierte Bakterium herum zu erkennen. Die Auswertung erfolgte qualitativ.

#### **Nachweis der $\beta$ -1,3-Glucanaseaktivität**

Das Testmedium (1g TSA (1/10), 4g Agar Agar, 0.25gAZCL-Barley  $\beta$ -Glucan (Megazyme), 250 ml Aqua dest.) enthält mit Farbstoff beschichtetes  $\beta$ -1,3-Glucan, so dass sich die Produktion des Enzyms an der Bildung von klaren Hemmhöfen zeigt. Es werden auch hier 4 Isolate pro Platte appliziert und die Platten 5-7 Tage bei 20 °C inkubiert.

### **Nachweis der Proteaseaktivität**

Der Test wird auf milchproteinhaltigem Medium (Lsg. 1:12.5 g Milchpulver, 125 ml Aqua dest., Lsg. 2: 1g TSA(1/5), 125 ml Aqua dest) durchgeführt. Es werden 4 Isolate pro Platte appliziert und bei 20 °C 2-5 Tage inkubiert. Die Produktion von Proteasen zeigt sich in der Bildung eines klaren Hemmhofes um das applizierte Isolat.

### **Nachweis der Bildung von Siderophoren**

Der Test wird auf eisenlimitiertem Medium durchgeführt, das den Farbstoff Chromazurol S enthält. Er hat die Eigenschaft, sich in Gegenwart von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen blau (Chelatisierung von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen) und in Abwesenheit von  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen orange zu färben. Es werden 4 Isolate pro Platte appliziert und mindestens 5 Tage bei 20 °C inkubiert. Die applizierten Bakterien, die Siderophoren bilden können, lösen die Eisen-(III)-ionen aus dem Agar und der Farbstoff färbt sich um das Bakterienisolat hell.

Mediumzusammensetzung (250 ml):

Lsg.1: 15.12 mg CAS (Chromazurol S) + 12.5 ml steriles Aqua dest.

lösen ohne Erwärmen

·2,5 ml HCl-saure sterilfiltrierte  $\text{FeCl}_3$ -Lsg. (1 mM  $\text{FeCl}_3$ , 10 mM HCl)

[270 mg  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (270 g/mol) + 373.5 mg HCl (0.86 ml konz.HCl, 10.1 ml 1M HCl)/ 1000 ml Lsg.][27 mg  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  + 37.4 mg HCl (0.086 ml konz. HCl, 1.01 ml 1M HCl) / 100 ml Lsg.] (9.1 ml 10 mM HCl und 6.76 ml 1 mM  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  in 2.5 ml Aqua dest.)

Lsg 2: 18.2 mg TDTMA (Cetyltrimethylammoniumbromid) + 10 ml steriles Aqua dest.

- unter Rühren und sterilen Bedingungen Lsg. 1 langsam in Lsg. 2 geben

Lsg. 3: 187.5 ml Aqua dest. + 25 ml Salzstammlösung (6.4g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.3g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5g NaCl, 2.5g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , pH = 7.42), 7.56 g PIPES (Piperazin-N,N'-bis (2-ethansulfonsäure); pH = 2.42, 3.0 g 50 %ige NaOH, pH = 5.0, 3.0 g Agar-Agar; pH = 7.0, pH auf 6.8 mit 50%iger NaOH einstellen und autoklavieren

Lsg.4: 5 ml 20 %ige sterilfiltrierte Glukoselsg.; pH = 7-8 (20 g Glc/80 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 2.5 g Glc/10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

Lsg.5: 7.5 ml 10%ige sterilfiltrierte Casaminoacids-lsg.; pH = 6.69, (10 g Casaminoacids/90 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; 1.11g Casaminoacids/10 ml  $\text{H}_2\text{O}$ )

Lsg. 3 und 4 jeweils auf pH = 6.8 einstellen

Lsg. 4 und 5 zusammengeben; pH = 6.8

Lsg. 1+2 bei 50°C in 3 und 4+5 geben

Der Agar ist in erhitztem Zustand grün und färbt sich nach dem Erkalten blau. Bei nochmaligem Erwärmen färbt sich der Agar orange und kann nicht mehr verwendet werden.

### **Nachweis der Bildung von Indol-3-essigsäure**

Die zu testenden Bakterienisolate werden 24 h auf halbkonzentriertem TS-Agar bei 30 °C vorinkubiert. Eine geringe Menge Zellmaterial wird in 5 ml Wachstumsmedium [5 g/l Glucose (4g), 0.025 g/l Hefeextrakt (0.02 g), 0.204 g/l L-Tryptophan (0.1632 g), 1 l Aqua dest. (800 ml)] suspendiert. Als Negativkontrolle dient ein unbeimpftes Kulturröhrchen mit Wachstumsmedium. Die Kulturröhrchen werden bei 20 °C für 72 h unter Lichtausschluss und schütteln inkubiert. Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung gebildeter IAA-Äquivalente wird 1 ml der Kultur jedes Isolates für 10 min bei 4 °C (13.000 rpm) zentrifugiert. Anschließend werden 90 µl des zellfreien Überstandes jeder Probe in die Kavitäten von Mikrotiterplatten pipettiert. Zum Kulturüberstand werden nun je 60 µl Salkowski Reagenz (1 ml 0.5 M FeCl<sub>3</sub>, gemischt mit 49 ml 35%iger Perchlorsäure pipettiert. Nach 30 min Inkubation unter Lichtausschluss wird mit Hilfe des Microplattenreaders (Spectramax-250, Molecular Devices) die Extinktion bei 530 nm gemessen. Zur qualitativen Auswertung wird die Extinktion zwischen dem Isolat und dem Kontrollröhrchen verglichen und überprüft, ob sich in dem zellfreien Kulturüberstand Indol-3-essigsäure befindet (+) oder nicht (-).

### **2.1.3 Pflanzenwachstumsförderung *ad planta***

Die Wirkung der Isolate als Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) wurde anhand eines *in vitro*-Keimlingstests beurteilt. Dieser Biotest ist eine einfache und schnelle Methode, um Effekte auf die Pflanzenentwicklung zu beurteilen und ideal um eine größere Anzahl an Isolaten zu testen.

### **Anzucht der Isolate**

Die Bakterienisolate wurden in Nährboullion (OXOID) für 24 h bei 30 °C angezogen und die Zellzahl mikroskopisch (Olympus BH-S) mit Hilfe einer THOMA-Zählkammer (Tiefe 0.01 mm) bestimmt. Anschließend wurde 1 ml der ursprünglichen Bakteriensuspension abzentrifugiert (Heraeus, 13.000 rpm, 10 min), der Überstand verworfen und mit dem gleichem Volu-

men steriler isotonischer Kochsalzlösung (0.85 %ig) aufgefüllt. Die gewünschte Konzentration an Bakterienzellen von  $10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  wurde durch Verdünnen mit isotonischer Kochsalzlösung erreicht.

### **Keimlingstest Salat– Vorbereitung des Saatgutes**

Das Salatsaatgut 'Daguan' wurde oberflächensterilisiert (1 %iger  $\text{NaClO}$ -Lösung (ROTH), 5 min) und in einer Feuchtkammer bei  $20\text{ }^\circ\text{C}$  für 2 Tage vorgekeimt.

### **Versuchsablauf**

Alle 24 Kavitäten von sterilen Zellkulturplatten wurden mit Wasser-Agar (1,2 %) gefüllt und mit je einem Keimling bestückt. Pro Keimling wurden  $10\ \mu\text{l}$  der Bakteriensuspension ( $10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ ) appliziert. In der Kontrollvariante wurden die Keimlinge mit  $10\ \mu\text{l}$  steriler isotonischer Kochsalzlösung behandelt. Die Testplatten mit den Keimlinge wurden 2 Wochen bei  $21\text{ }^\circ\text{C}$  unter Langtagbedingungen kultiviert. Der Einfluss der BCAs auf die Entwicklung der Keimlinge erfolgte anhand der Parameter Blattlänge (Bl) Blattanzahl (Ba), Wurzellänge (Wl) und Totallänge (Tl) mittels eines Binokulars (OLYMPUS SZ-40). Die ermittelten Parameter wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse ausgewertet (SPSS 11.0).

#### **2.1.4 Wirkung auf die Sklerotienkeimung**

Diese Untersuchungen wurden mit dem Isolat RHI SO325 (AG3), durchgeführt, einem leicht sklerotienbildenden Isolat. Die zu testenden Bakterien wurden über Nacht in Nährbouillon vorkultiviert. Anschließend wurden der Bakterientiter mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Sklerotien gleicher Größe (10 pro Platte) wurden auf Wasseragar ausgelegt und mit definierten Mengen der Bakteriensuspension ( $10^6$ - $10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ ) benetzt. Die Kontrollbehandlung erfolgte mit physiologischer  $\text{NaCl}$ -Lösung. Die Inkubation der Platten erfolgte bei  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Die Keimung bei  $20\text{ }^\circ\text{C}$  wurde mikroskopisch über einen Zeitraum von 5 Tagen verfolgt.

## **2.2 Selektion geeigneter pilzlicher BCAs**

Die antifungische Aktivität von 339 Pilzisolaten gegen *R. solani* wurde ebenfalls in einem *in vitro* Biotest untersucht. Nach Festlegung der Bedingungen wurden 390 pilzliche Isolate ge-

gen die Pathogenisolate (RHISOW4 und RHISO325) getestet. Die Isolate wurden aus der Stammsammlung (PD Dr. G. Berg, Universität Rostock, Mikrobiologie) nach den bereits genannten Kriterien ausgewählt. Die pilzlichen Isolate stammen aus der Rhizosphäre von Erdbeer-, Raps- und Kartoffelpflanzen (Rhizosphäre und Geocaulosphäre) sowie aus nicht durchwurzeltem Boden. Während der Vegetationsperiode 2000 bis 2002 wurden die Isolate in Rostock, Berlin und Braunschweig 6 Wochen nach der Pflanzung, während der Blüte und kurz vor der Ernte isoliert.

### **2.2.1 Antifungische Mechanismen *in vitro***

#### **Dualkultur**

Die Überprüfung der antifungischen Aktivität der pilzlichen Isolate erfolgte in Dualkultur auf Waksman-Agar (WA). Das Pathogenisolat wurde für 24 h auf WA bei 20 °C vorkultiviert. Die zu testenden Isolate werden dann ebenfalls auf die bereits mit dem Pathogen beimpften Testplatten gesetzt und bei 20 °C inkubiert. Nach 4, 7 und 10 Tagen werden die gebildeten Hemmzonen (HH) vermessen und nach folgendem Schema bewertet: +++HH > 10 mm, ++HH = 5 - 10 mm, +HH = 2 - 5 mm

Die antagonistische Aktivität von selektierten Pilzisolaten mit antifungischer Wirkung gegen *R. solani* im ersten Screening wurde nochmals bei einer Temperatur von 12 °C geprüft. In diesem Test wurde statt des Isolates RHISOW4 das virulente Rhizoctonia-Isolat (3/3/13), mit hoher Wachstumsrate bei einer Temperatur von 10 °C, verwendet. Der Biotest wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Aufgrund der geringeren Wachstumsgeschwindigkeiten wurde das Pathogen 3-4 Tage vorinkubiert. Die Auswertung der Hemmzonen erfolgte nach 12, 21 und 30 Tagen.

### **2.2.2 Exoenzyme der antifungisch wirksamen Pilzisolate**

#### **Chitinasen**

Der Nachweis chitinolytischer Aktivität erfolgte auf einem Mineralsalzagar, dem 1 % kolloidales Chitin zugesetzt war. Die zu testenden Pilzisolate wurden in der Mitte der Agarplatte aufgebracht. Ein Abbau des Chitins ist durch die Klärung des Agars im Umkreis der Kolonien infolge des Abbaus der Chitinpartikel erkennbar.

## **$\beta$ -1,3-Gucanasen**

Der Nachweis glucanolytischer Aktivität erfolgte ebenfalls auf einem Mineralsalzagar, dem 1 % Glucan (AZCL-Barley  $\beta$ -Glucan [Megazyme, Ireland]) zugesetzt wurde. Beim Abbau von Glucan wird der Farbstoff gelöst und diffundiert in den Agar.

## **Proteasen**

Der Nachweis proteolytischer Aktivität erfolgte auf einem Medium, dem 0.4 % Gelatine zugesetzt waren. Pro Platte wurde ein Isolat aufgebracht. Nach Inkubation für 5-7 Tage bei 20 °C klärt sich der sonst opake Agar infolge des Abbaus der Gelatine um die Kolonie herum auf. Zur besseren Sichtbarmachung des Abbaus können die Platten am Ende des Versuchs mit einer gesättigten wässrigen Ammoniumsulfat-Lösung überschichtet werden.

### **2.2.3 Wirkung auf die Sklerotienkeimung und Parasitierung des Myzels**

Diese Untersuchungen wurden mit dem Isolat RHI SO325 (AG 3), durchgeführt, einem schnell Sklerotien bildenden Isolat. Die zu testenden Antagonisten wurden zunächst für 4-5 Tage auf Hafermehlagar (DIFCO) vorkultiviert. Anschließend wurden Sklerotien gleicher Größe (10 pro Platte) auf die mit dem Antagonisten bewachsene Hafermehlagar-Platten ausgelegt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 20 °C. Nach 6 Tagen wurden die Sklerotien auf Wasseragar ausgelegt und die Keimung bei 20 °C wurde mikroskopisch über einen Zeitraum von 7-8 Tagen untersucht.

In einem weiteren Test wurde die Wirkung antagonistischer Pilze auf die Keimfähigkeit parasitierten Myzels untersucht. Für diese Untersuchungen wurde ebenfalls mit dem Isolat RHI SO325 gearbeitet. Zunächst wurden sterile Objektträger mit Waksman-Agar beschichtet und in sterile, mit Filterpapier ausgelegte, Glaspetrischalen überführt. Das Filterpapier wurde mit sterilem Wasser befeuchtet. Mit einem Korkbohrer wurden nun Segmente des *Rhizoctonia*-Isolates ausgestochen und auf die eine Seite des beschichteten Objektträgers überführt. Auf die andere Seite wurde ein Myzelfragment des Pilzantagonisten aufgebracht. Die Petrischalen wurden anschließend mit Parafilm verschlossen und für 4 Tage bei 20 °C inkubiert. Aus den Überlappungszonen der gegeneinander gewachsenen Isolate wurde eine Agarscheibe (ca. 1 cm<sup>2</sup>) entnommen und auf Wasseragar ausgelegt. Über einen Zeitraum von 1 Woche wurde mikroskopisch das Auswachsen von *R. solani* verfolgt.



## 2.3 Erstellung molekularer Fingerprints

### 2.3.1 Bakterielle BCAs

Die Isolierung der DNA erfolgte größtenteils mit Hilfe des Genomic Tip 20/G-Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers. Eine weitere Methode zur schnellen Isolierung bakterieller DNA kann ebenfalls zum Einsatz: Dabei wurde etwas Koloniematerial von einer mit dem jeweiligen Bakterienisolat bewachsenen Nähragarplatte in 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O-UV<sub>clear</sub> suspendiert (Vortex) und für 10 min bei -70 °C gelagert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 100 °C in einen Thermoblock gestellt. Die Proben wurden danach für 5 min bei 13.000 rpm (4 °C) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppi pipettiert. Zur Überprüfung der DNA wurde diese in einem 1%igen Agarosegel (90V, Laufpuffer 1 x TAE) aufgetrennt. Die isolierte DNA wurde als Template für die PCR eingesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde in 25 µl-Ansätzen mit folgender Zusammensetzung durchgeführt: Pro Ansatz waren 21.5 µl PCR-SuperMix (High Fidelity, Invitrogen), 2.5 µl Primer (BOX A1: 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3', ROTH) und 1 µl DNA enthalten. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (TGradient Thermocycler, Biometra) nach folgendem Zyklusprogramm durchgeführt: 95 °C 6 min, Denaturierung, 94 °C 1 min Denaturierung, 53 °C 1 min Primer-Anlagerung, 65 °C 8 min Polymerisierung, Schritte 2 bis 4 werden 35 x wiederholt, 65 °C 16 min, 4 °C "endlos". Anschließend wurden die Amplifikate (12 µl und 3 µl Stopp-Mix) in einem 1.5%igem Agarosegel (Laufpuffer: 0.5 x TBE) bei 90 V aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und auf dem UV-Tisch visualisiert und fotografiert. Die Auswertung der Bandenmuster erfolgte visuell bzw. mit Hilfe der Gelcompar<sup>®</sup> Software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium).

### Sequenzierung der 16S rDNA

Mittels einer PCR-Reaktion wurde ein Abschnitt der 16S rDNA amplifiziert. Die Reaktion wurde in 25µl-Ansätzen mit folgender Zusammensetzung durchgeführt: 17 µl H<sub>2</sub>O<sub>UVclear</sub>, 5 µl PCR-SuperMix (Taq&Go, Qiogene), 1 µl Primer (Eubac I, ROTH), 1 µl Primer (Eubac II, ROTH), 1 µl DNA. Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (TGradient Thermocycler, Biometra) nach folgendem Zyklusprogramm durchgeführt: 95 °C 5 min, 94 °C 30 sec, 52 °C 30 sec, 72 °C 100 sec, Schritte 2 bis 4 werden 9 x wiederholt, 95 °C 30 sec, 52 °C 30 sec, 72 °C 90 sec, Schritte 6 bis 8 werden 19 x wiederholt, 72 °C 5 min, 4 °C "endlos".

Anschließend wurde das Fragment (25 µl und 3 µl Stopp-Mix) in einem 1%igen Agarosegel (Laufpuffer: 1 x TAE) bei 90 V aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und auf dem UV-Tisch visualisiert. Das ca. 1500 bp große Fragment wurde dann aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (Qiagen, MiniElute Gel Extraction Kit). Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC biotech AG. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend in die NCBI (National Center for Biotechnology Information)-Datenbank eingegeben ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) und in einem Nucleotid-Nucleotid-Vergleich mit den Datenbankinformationen verglichen.

### **2.3.2 Pilzliche BCAs**

Für die Isolierung wurde etwas Pilzmyzel in sterile 2 ml-Eppendorfgläser gegeben und mit 500 µl TE (Tris-EDTA, pH8) versetzt. Nach einer Einwirkzeit von ca. 10 min wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Dann wurden sterile Glasperlen sowie 450 µl Extraktionspuffer dazu gegeben. Die Proben wurden dann auf Eis mit einem Mikrohandrührgerät und sterilen Mikrohandrührern 10 sec bis 1 min zermahlen und anschließend mit 225 µl 3 M Na-Acetat-Lösung versetzt. Die Proben wurden nun für mindestens 10 min bei -20 °C gelagert. Zur Abtrennung der Zellbestandteile wurden die anschließend wieder aufgetauten Proben zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, 4 °C) und der DNA-haltige Überstand in neues, steriles 1,5 ml-Eppendorfglas überführt. Die Entfernung von Proteinresten erfolgte durch eine anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion. Die gereinigte DNA wurde nun durch Zugabe von aliquoten Volumina Isopropanol ausgefällt (ca. 5 min, RT). Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet wurde dann mit eiskaltem (-20 °C) 70 %igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Gefäße erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 5 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die noch feuchten DNA-Pellets wurden 30-60 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrockneten Pellets wurden dann in TE vorsichtig resuspendiert. Zur Überprüfung der Qualität und Menge der isolierten DNA wurden 6 µl jeder Probe in einem Agarosegel (1%ig in 1 x TAE) überprüft. Die DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert. Die BOX-PCR wurde für die Pilzisolat analog zu den Bakterien durchgeführt.

#### **Sequenzierung der 18Sr DNA**

Bei den selektierten Pilzisolaten handelt es sich um Stämme, die auf Grund ihrer morphologischen Eigenschaften der Gattung *Trichoderma* zuzuordnen sind. Für eine spätere Zulassung

eines BCAs ist jedoch eine eindeutige Identifizierung der Stämme nötig. Auf der Grundlage der Ergebnisse der BOX-PCR wurden nun repräsentative Isolate für eine Sequenzierung der 18S rDNA ausgewählt.

Dazu wurde zunächst mittels einer PCR-Reaktion ein Abschnitt der 18S rDNA amplifiziert. Die Reaktion wurde in 25µl-Ansätzen mit folgender Zusammensetzung durchgeführt: 18 µl H<sub>2</sub>O<sub>UVclear</sub>, 5 µl PCR-SuperMix (Taq&Go, Qiogene), 0.5 µl Primer NS1\* (forward), 0.5 µl Primer FR1-GC\*\* (reverse), 1 µl DNA-Template

\* 5'- GTA GTC ATA TGC TTG TCT C - 3' (MWG biotech)

\*\* 5'- CCC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GCC GAI CCA TTC AAT CGG TAI T - 3' (I = Inosin) (MWG biotech)

Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (TGradient Thermocycler, Biometra) nach folgendem Zyklusprogramm durchgeführt: 94 °C 8 min, 94 °C 30 sec, 48 °C 45 sec, 72 °C 3 min, Schritte 2 bis 4 werden 35 x wiederholt, 72 °C 10 min, 4 °C "endlos". Anschließend wurde das Fragment (25 µl und 3 µl Stopp-Mix) in einem 1%igen Agarosegel (Laufpuffer: 1 x TAE) bei 90 V aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und auf dem UV-Tisch visualisiert. Das ca. 1500 bp große Fragment wurde dann aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt (Qiagen, MiniElute Gel Extraction Kit). Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma GATC biotech AG. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend in die NCBI (National Center for Biotechnology Information)-Datenbank eingegeben ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) und in einem Nucleotid-Nucleotid-Vergleich mit den Datenbankinformationen verglichen.

## **2.4 Verifizierung der Pathogenitätstest**

### **2.4.1 Salat / AG 1-IB**

#### **Einfluss der Inokulumdichte von *R. solani* an Salatjungpflanzen**

Die Anzucht der Salatjungpflanzen (cv. Dagan) erfolgte in allen Versuchen bis zum 2-3 Blattstadium in Pikierpaletten unter Temperaturbedingungen von 20/15°C (Tag/Nacht). Im 3 Blattstadium wurden die Jungpflanzen in Töpfe (10x10x10 cm, eine Pflanze je Topf), gefüllt mit 'Fruhsdorfer Einheitserde' Typ P [chemische Analysis (mg/100g) N = 75; P = 75; K = 125; pH 5,9] gepflanzt. Jede Variante umfasste 6 Wiederholungen mit jeweils 4 Pflanzen, die

in der Klimakabine (16 h Licht  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 20/15 °C, 60/80 % rel. Luftfeuchtigkeit Tag/Nacht) randomisiert aufgestellt wurden.

Am Pathosystem Salat/*R. solani* wurde zunächst der Einfluss von zwei verschiedenen Inokula auf das Pflanzenwachstum von Salat geprüft. Im Versuch I wurde ein reines Myzelinokulum von *R. solani* verwendet. Um eine Reproduzierbarkeit des Inokulums zu gewährleisten erfolgte die Einstellung anhand des C-Gehaltes im Erregermyzel. Je Pflanze wurde im 2-3 Blattstadium die Myzelmengen von 5, 10, 15 bzw. 20 mg C-Gehalt im Myzel appliziert. Die Anzucht des Erregers sowie Einstellung der Inokulumdichte auf der Basis des C-Gehaltes erfolgte nach Benker (2000).

In einem weiteren Versuch (II) wurden mit *R. solani* bewachsene Gerstenkörner als Inokulum verwendet. Die zweimal autoklavierten Gerstenkörner wurden 2 Wochen vorher mit dem Erregerisolat (7/3) beimpft und bei 22 °C inkubiert. Nach der Pflanzung wurden die 3, 4 oder 6 Körner 2 cm von der Pflanze platziert. Vier Wochen nach der Pflanzung wurde die Sprossfrisch- und -trockenmasse bestimmt. Die Bonitur des Krankheitsauftretens erfolgte wöchentlich.

## 2.4.2 Kartoffel / AG 3

### **Einfluss von Temperatur und Inokulumdichte**

Die Prüfung der BCAs gegen *R. solani* an der Kartoffel erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Carling und Leiner (1990). Auch hier wurde zunächst der Einfluss der Inokulumdichte und der Temperatur (15/10 °C und 20/15 °C) von 2 *R. solani* Isolaten (Ben3 und Rs325) auf den Befall der Kartoffel (cv. Exquisa) geprüft. Dazu wurden die Kartoffelknollen (KK) oberflächensterilisiert (1 %ige NaOCl, 1 min) und anschließend auf eine 10 cm hohe Bodenschicht (Einheitserde und Sand 1:1 mischen) in Rosentöpfe (25x12x12 cm) platziert. Die KK werden mit 2 cm Bodengemisch überschichtet, auf welche das Erregerinokulum (bewachsene Gerstenkörner) aufgelegt wurde. Das Inokulum wird anschließend ebenfalls mit einer Bodenschicht von 7 cm überschichtet. Geprüft wurde der Einfluss von 3 und 6 bewachsenen Getreidekörnern auf die Befallsstärke der Kartoffelkeime mit *R. solani*. Jede Variante umfasste 5 Wiederholungen. Das Bodengemisch wurde während des Versuches feucht gehalten. Nach einer Kulturdauer von 4 Wochen im Dunkeln wurde die Befallsstärke wie folgt bonitiert: 1 = keine Symptome, 2 = einzelne bzw. geringe Anzahl an Läsionen, < 5 mm, 3 = mittlere Schä-

digung, Läsionen > 5 mm und um gesamten Keimstängel, 4 = starke Schädigung, meisten Keimstängel abgestorben, 5 = alle Keimstängel abgestorben.

### **2.4.3 Zuckerrübe / AG 4 und AG 2-2IIIB**

#### **Einfluss von Temperatur und Inokulumdichte**

In Abhängigkeit von der Inokulumdichte (1 bis 6 mit *R. solani* bewachsene Gerstenkörner je Topf) und der Temperatur (20/15 °C und 15/10 °C) wurde der Einfluss von zwei *R. solani* Isolaten (AG 4, Ben4 und AG 2-2IIIB, Ben2) auf die Auflauftrate (AR) und BH der Zuckerrübe (cv. Dorena) geprüft. Jede Variante umfasste 5 Wiederholungen mit jeweils 12 Samen, die in Töpfe (10x10x10 cm), gefüllt mit Fruhsdorfer Einheitserde Typ P, 1 cm tief ausgesät wurden. Die Variante wurden in der Klimakammer randomisiert aufgestellt. Neben den entsprechenden Temperaturbedingungen war in der Klimakammer eine Lichtstärke von 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (16 h) und eine relative Luftfeuchtigkeit von 60/80 % (Tag/Nacht) gegeben. Die Inokulation von *R. solani* erfolgte unmittelbar nach Ausbringen des Saatgutes. Die Gerstenkörner wurden 2 Wochen vor der Inokulation mit *R. solani* beimpft und bei 22 °C inkubiert.

## **2.5 Evaluation der ausgewählten BCAs unter kontrollierten Bedingungen**

### **2.5.1 Salat / AG 1-IB**

Die Prüfung der BCAs erfolgte entsprechend den unter 2.4.1 beschriebenen Versuchsbedingungen bei 20/15 °C. In allen Versuchen wurden die Jungpflanzen (Sorte Dagan) mit *R. solani* (Isolat 7/3) bewachsenen Getreidekörnern (5 Körner je Pflanze) zum Zeitpunkt der Pflanzung im 3 Blattstadium inokuliert.

#### **Bakterielle BCAs**

Zur Prüfung der Effektivität der bakteriellen Organismen gegen *R. solani* an Salat wurde eine zweimalige Behandlung mit den entsprechenden Bakterienstämmen durchgeführt. Die erste Behandlung erfolgte 7 Tage vor der Pflanzung im 2 Blattstadium. Jede Pflanze wurde mit 5 ml Bakteriensuspension ( $10^7$  CFU/ml) behandelt. Zur zweiten Behandlung wurde jede Pflanze (3 Blattstadium) mit 20 ml Bakteriensuspension ( $10^7$  CFU/ml) einen Tag nach der Pflanzung

zung angegossen. In den Kontrollvarianten wurde entsprechend physiologische Kochsalzlösung (0.3 %) appliziert.

Die Bakteriensuspensionen wurden 24 h vor der Anwendung in Nährbouillon bei 30 °C angezogen. Durch Messung der optischen Dichte wurde eine Dichte von  $10^7$  CFU/ml eingestellt. Wöchentlich wurde die Anzahl befallener Pflanzen bonitiert. Drei Wochen nach der Inokulation von *R. solani* wurde die Frisch- und Trockenmasse von Salat ermittelt.

### **Pilzliche BCAs**

Sieben Tage vor der Pflanzung wurden die Salatkeimlinge im 2 Blattstadium mit den pilzlichen BCAs behandelt. Jede Pflanze wurde mit 5 ml der entsprechenden Konidiensuspension ( $10^3$  Konidien/ml) in den Pikierpalletten angegossen. Zum Zeitpunkt der Pflanzung wurde das Substratinokulum der entsprechenden pilzlichen BCAs in das Substrat (1:10) eingemischt. Die Jungpflanzen wurden in das mit den pilzlichen BCAs beimpfte Substrat gesetzt und anschließend mit *R. solani* inokuliert.

#### *Herstellung der Konidiensuspensionen*

Die pilzlichen BCAs wurden drei Wochen bei Raumtemperatur auf Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA, Merck 1.10130) kultiviert. Während dieser Zeit waren die Pilz-Kulturen ausreichend sporuliert. Zur Herstellung der Konidiensuspensionen wurden die Konidien mit 10 ml physiologische Kochsalzlösung (0.3 %) von der Agaroberfläche abgeschwemmt. Die Bestimmung der Knidienzahl erfolgte mikroskopisch durch Auszählen mittels Thomakammer.

#### *Herstellung des Substratinokulums*

Die Anzucht der pilzlichen BCAs erfolgt in einem Gemisch aus Maismehl und Einheitserde (MEG, 1:1). Das MEG (260 ml) wurde mit 26 ml Konidiensuspension ( $10^6$  Konidien/ml) der entsprechenden BCAs beimpft und zwei Wochen bei 25 °C im Dunkeln inkubiert.

### **2.5.1.1 Salatblattscheiben –Test**

In Klimakammer wurden Salatpflanzen 7 Wochen (20/15 °C, 14 h Licht, 70/90 % Feuchtigkeit, Tag/Nacht) kultiviert, deren Blätter abgetrennt und im Test verwendet. In Plastikboxen (18x28 cm, 500 cm<sup>2</sup>) wurde eine 5 mm Sandschicht gefüllt und mit Aqua dest befeuchtet. Auf die Sandoberfläche wurden 7 d alte *R. solani* (7/3) Agarscheiben (AS) (kultiviert bei 20 °C) platziert (15 AS per Box) und anschließend mit einer Sandschicht von 10 mm bedeckt, die mit

20 ml der entsprechenden Bakteriensuspension ( $10^8$  CFU/ml) oder Wasser (Kontrolle) besprüht wurde. Abschließend werden Salatblattscheiben (3x3 cm) auf die AS aufgelegt. Die Boxen werden verschlossen und nach 6 Tage Inkubation bei 20 °C wurde die Besiedlung der Blattbscheiben durch *R. solani* wie folgt bonitiert: 0 = keine Nekrose, 1 = < 20 % (1.8 cm<sup>2</sup>), 2 = 21-40 % (2 – 3.6 cm<sup>2</sup>), 3 = 41-60 % (4- 5.4 cm<sup>2</sup>), 4 = 61-80 % (5.5 – 7.2 cm<sup>2</sup>) und 5 = > 80 % (7.5 cm<sup>2</sup>).

### **2.5.2 Kartoffel / AG 3**

Die Evaluierung der BCAs an Kartoffelknollen erfolgte wie unter 2.4.2 beschrieben bei einer konstanten Temperatur von 20 °C in Kühlbrutschränken. Inokuliert wurden die Knollen mit jeweils 5 mit *R. solani* (Isolat Ben3 3) bewachsenen Getreidekörnern. Jede Variante umfasste 6 Wiederholungen. Die Befallsstärke wurde nach drei Wochen bonitiert.

#### **Bakterielle BCAs**

In einem ersten Versuch wurden die Kartoffelknollen (Sorte Exquisa) mit entsprechenden Suspensionen der zu prüfenden BCAs in einer Dichte von  $10^8$  CFU/ml behandelt. Die Behandlung erwies sich als nicht ausreichend, da das Erregerinokulum nicht direkt auf die Knolle selbst gegeben wurde, so dass die BCAs nicht unmittelbar mit dem Erreger in Kontakt kamen. In den weiteren Versuchen wurde die gesamte Bodenschicht mit den BCAs behandelt (180 ml/Topf,  $10^8$  CFU/ml). Die Anzucht der bakteriellen BCAs erfolgte ebenfalls für 24 h in Nährbouillon bei 30 °C.

#### **Pilzliche BCAs**

Die Prüfung der krankheitsunterdrückenden Wirkung der pilzlichen BCAs erfolgte in zwei Versuchen zum einen nach künstlicher Inokulation der Knollen mit *R. solani* und zum anderen von mit Sklerotien befallenen Kartoffelknollen (Befallsstärke 10%). In beiden Versuchen wurde das Bodengemisch eine Woche vor dem Platzieren der Knollen in die Töpfe mit einer Konidien suspension (10 ml/1 l Bodengemisch,  $10^7$  Konidien/ml) der entsprechenden BCAs beimpft und bei Raumtemperatur inkubiert.

Die natürlich mit Sklerotien befallenen Kartoffelknollen wurden vor der Pflanzung mit einer Konidien suspension ( $10^7$  Konidien/ml) der BCAs benetzt.

Die Anzucht der pilzlichen BCAs sowie Herstellung der Konidiensuspensionen erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben.

### **2.5.3 Zuckerrübe / AG 4**

Die Versuchsbedingungen sind bereits unter 2.4.3 beschrieben. Die Prüfung der BCAs erfolgte bei 20/15 °C. Nach der Aussaat der Zuckerrübe (cv. Dorena) wurde jeder Topf mit 6 bewachsenen Gerstenkörnern (Isolat Ben4) inokuliert.

#### **Bakterielle BCAs**

Zur Prüfung der krankheitsunterdrückenden Wirkung der bakteriellen BCAs wurde eine Saatgutbakterisierung vorgenommen. Das Saatgut wurde zuvor mit 1 % NaOCl für ca. 2 min oberflächensterilisiert. Jeweils 70 Körner jeder Variante wurden mit 200 µl der entsprechenden Bakteriensuspension ( $10^8$  CFU/ml) benetzt.

Die Anzucht der Bakterienkulturen erfolgte für 24 h in Nährbouillon bei 29 °C. Durch Messung der optischen Dichte wurde die entsprechende Keimzahl für jedes Isolat eingestellt.

## **2.6 Evaluation der ausgewählten BCAs unter Feldbedingungen**

### **2.6.1 Prüfung der antifungalen Wirkung an Salat**

Die krankheitsunterdrückende Wirkung der bakteriellen BCAs L13-6-12 (*Pseudomonas putida*), 2Re2-6 (*P. fluorescens*) und 3Re4-18 (*Serratia plymuthica*) gegen *R. solani* an Salat (cv. Nadine) wurde auf zwei Standorten, Golzow und Großbeeren evaluiert. Auf dem Versuchsstandort Golzow wurde die Wirksamkeit sowohl nach einmaliger (1x) als auch nach zweimaliger (2x) Applikation geprüft, während in Großbeeren nur eine zweimalige (2x) Applikation durchgeführt wurde. Beide Versuchsfelder (100 x 25 m) sind natürlich mit *R. solani*, dem Erreger der Salatfäule, infiziert. Je Variante (Tab. 3) wurden 6 Wiederholungen bzw. Parzellen (1.50 x 9 m) randomisiert auf dem jeweiligen Versuchsfeld angelegt. Die Salatjungpflanzen wurden im 3-4 Blattstadium per Hand (Pflanz- und Reihenabstand 30 cm) gepflanzt.

Zwei Wochen vor der Pflanzung wurden die Versuchsfelder mit Rhizikorn (60 kg N/ha) aufgedüngt.



Im Vergleich zu den Varianten mit den bakteriellen BCAs wurde eine Fungizidvariante in die Untersuchungen einbezogen. Die Wirksamkeit des Fungizids (BASF 516) wurde nach einmaliger (FU 1x) und zweimaliger (FU 2x) Applikation auf dem Standort Golzow und nach zweimaliger Applikation auf dem Standort Großbeeren geprüft. Die Applikation erfolgte 4 (FU 1x) bzw. 4 und 11 Tage (FU 2x) nach der Pflanzung mit einer Aufwandmenge von 1.5 kg/ha.

Tab. 3: Übersicht über die Behandlungstermine

Standort	Bodentyp	1. Applikation	Pflanzung	2. Applikation	Ernte/Endbonitur
Golzow	lehmiger Ton	02.07.03	10.07.03	16.07.03	13.08.03
Großbeeren	sandiger Lehm	17.07.03	24.07.03	29.07.02	03.09.03

### Behandlung mit den BCAs

Die erste Behandlung der Salatjungpflanzen mit den bakteriellen BCAs erfolgte eine Woche vor der Pflanzung im 2-3 Blattstadium. Hierbei wurden 150 Pflanzen mit 1 l Bakteriensuspension ( $10^7$  CFU/ml) angegossen. Zur zweiten Applikation wurde die Bodenoberfläche mit den entsprechenden Bakteriensuspensionen ( $10^9$  CFU/ml, 2 l für 21 Pflanzen) mit einer Handspritze besprüht.

Die Anzucht der Bakteriensuspensionen erfolgte jeweils für 12 h in Nährbouillon bei 29 °C.

### Datenerhebung

Zur Ernte wurde von jeweils 20 Köpfen aus der Kernparzelle die Befallsstärke (BS) ermittelt sowie die Frisch- und Trockenmasse bestimmt. Die Bonitur der BS erfolgte nach folgender Skala: BS-1 = kein Befall, BS-3 = leichter Befall, Symptome nur an unteren Blättern, BS-5 = mittlerer bis starker Befall, Symptome an unteren zwei Blättern (noch vermarktungsfähiger Kopf), BS-7 = Köpfe stark bis ganz verfault.

## 2.6.2 Prüfung der antifungalen Wirkung an Kartoffel

Die krankheitsunterdrückende Wirkung der bakteriellen BCAs L13-6-12 (*Pseudomonas putida*), 2Re2-6 (*P. fluorescens*) und 3Re4-18 (*Serratia plymuthica*) wurde unter Freilandbedingungen an der Sorte Exquisa in einer Kastenparzellenanlage (4 m<sup>2</sup> je Kasten, Bodentyp sandiger Lehm) des IGZ ohne und nach zusätzlich künstlicher Inokulation mit *R. solani* geprüft. Je Parzelle wurden 21 Knollen im Abstand von 30 cm und einem Reihenabstand von 65 cm gesteckt. Jede Variante umfasste 6 Wiederholungen bzw. 6 Parzellen, die randomisiert angeordnet waren. Vier Wochen nach der Pflanzung wurden die Kartoffelpflanzen gehäufelt.

Zwei Wochen vor Pflanzung wurde aufgedüngt mit Rhizikorn (150 kg N/ha). Unmittelbar nach der Pflanzung wurden die Parzellen beregnet und im weiteren Kulturverlauf entsprechend den Angaben nach Beeritz.

Letzmalig wurde 1996 Kartoffeln in der Anlage angebaut und in den sich anschließenden Jahren erfolgte der Anbau von Fracelia.

### Behandlung mit den BCAs

Unmittelbar vor dem Pflanzen (27.05.03) der Knollen wurden diese mit entsprechenden Bakteriensuspension der bakteriellen BCAs ( $10^8$  CFU/ml) benetzt (126 Knollen mit 250 ml Suspension).

Zur zweiten Behandlung (12.06.03) wurde jede Pflanze mit 100 ml Bakteriensuspension ( $10^8$  CFU/ml) der jeweiligen BCAs angegossen.

Die Anzucht der Bakteriensuspensionen erfolgte für 12 h in Nährbouillon bei 29 °C.

### Inokulation von *R. solani*

Ebenfalls zum Zeitpunkt der Pflanzung wurden die Knollen der Varianten mit zusätzlicher *R. solani* Inokulation (AG 3, Isolat Ben 3) mit 5 bewachsenen Gerstenkörnern inokuliert. Dazu wurden die Knollen in den Pflanzlöchern mit ungefähr zwei cm Erde überschichtet, auf welche die mit *R. solani* bewachsenen Gerstenkörner platziert wurden.

### Datenerhebung

Nach der Pflanzung wurde wöchentlich der Auflauf der Kartoffeln bonitiert. Zur Ernte (01.10.03) erfolgte die Ermittlung des vermarktungsfähigen Knollenertrags. Von 120 Knollen

je Variante (20 je Wiederholung) wurde der Befall mit Sklerotien nach der Richtlinie 4-1.4 der BBA bonitiert (BS-1 = kein Besatz, BS-2 = < 1 %, BS-3 = 1-5 %, BS-4 = > 5 %).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Festlegung der Prüfbedingungen

In Abhängigkeit von der Temperatur (Tab. 4) zeigten sich keine deutlichen Unterschiede in der antifungischen Aktivität bekannter BCAs gegenüber *R. solani*. Unterschiede waren jedoch in der Sensitivität der verwendeten *R. solani* Isolate gegenüber den BCAs zu beobachten. Die geringste Sensitivität zeigte das Isolat RHI SO 325 gegenüber allen BCAs, während das Isolat RHI SO W4 am empfindlichsten reagierte. Das Screening aller potentiellen Antagonisten wurde daher gegenüber den *R. solani* Isolaten RHI SO 325 und RHI SO W4 bei 20 °C durchgeführt.

Tab. 4: Durchschnittliche antifungische Aktivität der bekannter BCAs auf Waksman-Agar in Abhängigkeit von der Temperatur

BCA	Hemmhofgröße [mm]	
	15 °C	20 °C
B2g	2 bis 9	4 bis 8
C48	8 bis 12	10 bis 14
R RE 109	3 bis 9	2 bis 9
RP 87	12 bis 13	11 bis 15

#### 3.2 Selektion geeigneter bakterieller BCAs

Nach Festlegung der Bedingungen für das Screening 440 bakterielle Isolate auf ihre antifungische Wirkung gegen *R. solani* verschiedener AGs in Dualkultur untersucht. Aus der Stammsammlung (PD Dr. G. Berg, Universität Rostock) wurden gegenüber anderen boden-

bürtigen Schaderregern antifungisch wirkende Isolate ausgewählt und ihr antagonistisches Potenzial gegenüber den *Rhizoctonia*-Isolaten mit der stärksten (RHISOW4, AG 2, Weißkohl) und schwächsten (RHISO325, AG 3, Kartoffel) Sensitivität geprüft. Die getesteten Isolate stammen aus den Mikrohabitaten: Rhizosphäre, Endorhiza, Phyllosphäre, Endosphäre und Geocaulosphäre von Kartoffel-, Erdbeer- und Rapspflanzen.

### **3.2.1 Antifungische Wirkung der Bakterienisolate**

Gegenüber beiden verwendeten *R. solani*-Isolaten zeigten 20 Isolate eine hohe antagonistische Aktivität (Tab. 2). In der Aktivität der Bakterienisolate gegenüber den *Rhizoctonia*-Isolaten waren nur geringe Unterschiede zu erkennen. Die Aktivität gegen das Pathogenisolat mit der höchsten Sensitivität (RHISOW4) war oftmals höher im Vergleich zu dem Isolat mit der schwächeren Sensitivität (RHISO325). Besonders aktiv waren beispielsweise 3 Bakterienisolate (5Re4-6, 5Re4-12 und 5Re4-21) aus der Endorhiza von Kartoffelpflanzen. Diese Isolate waren gegenüber beiden *Rhizoctonia*-Isolaten in gleicher Weise sehr stark wirksam. Bis auf drei Isolate (*Bacillus subtilis* 1Pe4-13, *Streptomyces setoni* RP87, *Micrococcus kristinae* 4Rr44) zählten alle antifungisch wirksamen Isolate zu den Gram-negativen Bakterien. Die Mehrzahl gehört zu den fluoreszierenden Pseudomonaden; eine Bakteriengruppe, die bereits aus der Literatur durch ihre stark antifungischen und pflanzenwachstumsfördernden Eigenschaften bekannt ist (Weller et al. 2002). Vier Isolate liessen sich der Gattung *Serratia* zuordnen. Auch für Isolate dieser Gattung ist die Fähigkeit zu Kontrolle phytopathogener Pilze bereits beschrieben worden (Berg et al. 2000, Kurze et al. 2001). In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der antifungisch aktiven Bakterienisolate, einschließlich der Ergebnisse der antifungischen Aktivität zugrunde liegenden Mechanismen sowie wachstumsfördernder Eigenschaften.

### **3.2.2 Antifungische Mechanismen *in vitro***

#### **3.2.2.1 Exoenzymspektrums und Bildung von Indol-3-Essigsäure**

Von den im Dualkulturtest selektierten Isolaten wurden die antifungischen Mechanismen *in vitro* untersucht. Die Isolate wurden auf die Bildung von lytischen Enzymen (Chitinasen, Glucanasen, Proteasen) und Siderophoren sowie auf die Produktion von Indol-3-essigsäure

getestet. Eine Chitinaseaktivität konnte für insgesamt 3 Isolate nachgewiesen werden (Tab. 2). Für 2 Isolate konnte die Fähigkeit zum Abbau von  $\beta$ -1,3-Glucan nachgewiesen werden. Dabei zeigte das Isolat 1Pe4-13 (*Bacillus subtilis*) eine sehr starke Glucanase-Aktivität. Für die meisten Isolate (18 von 21) wurde eine proteolytische Aktivität nachgewiesen. Die Bildung von Siderophoren konnte für 10 der 20 Isolate gezeigt werden. Die Bildung von Indol-3-Essigsäure (Auxin- bzw. Auxinäquivalenten) wurde bei insgesamt 13 Isolaten nachgewiesen.

### 3.2.2.2 Pflanzenwachstumsförderung *ad planta*

Die Wirkung der Isolate als *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR) wurde anhand eines *in vitro*-Keimlingstests beurteilt. Dieser Biotest ist eine einfache und schnelle Methode, um Effekte auf die Pflanzenentwicklung zu beurteilen und ideal um eine größere Anzahl an Isolaten zu testen (Berg et al. 2001, Suckstorff & Berg 2003). In dem hier angewandten Test wurden erstmals Salatkeimlinge eingesetzt. Aus vorangegangenen Untersuchungen an Erdbeerkeimlingen ist bekannt, dass die Konzentration der applizierten Bakterien von großer Bedeutung für die Wirkung auf das Pflanzenwachstum ist. In diesen Untersuchungen erwies sich eine Konzentration von  $10^5$  Bakterienzellen pro Keimling als günstig, so dass diese Konzentration auch bei der Inokulation der Salatkeimlinge angewandt wurde. Gleichzeitig wurde für alle bisher getesteten Bakterienisolate ein Dosis-abhängiger Effekt auf das Pflanzenwachstum festgestellt, der negative Effekte bei zu hohen Konzentrationen einschließt (Kurze et al. 2001, Suckstorff & Berg 2003). Der Test wird daher als Indikator für eine generelle Bakterien-Pflanzen-Interaktionen benutzt.

Insgesamt bewirkten 19 der getesteten 20 Isolate signifikante Unterschiede in der Wachstumsentwicklung der Salatkeimlinge in mindestens einer der Kategorien Blattanzahl, Blattlänge, Wurzellänge und Totallänge im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abb. 1). Von den untersuchten Isolaten zeigte der Stamm 2R1-7 in allen gemessenen Parametern eine wachstumsfördernde Wirkung im Vergleich zur Kontrolle. Einige Bakterienstämme beeinflussten unter den gewählten Testbedingungen nur die oberirdischen Pflanzenteile (Blattlänge und Blattanzahl) positiv. Hemmende Effekte waren meistens bei der Wurzel- und Totallänge zu erkennen. Alle 4 Isolate der Gattung *Serratia* zeigten unter den gewählten Bedingungen einen Effekt auf die Totallänge und die Wurzellänge. Drei *Serratia*-Isolate wirkten gleichzeitig auch fördernd auf die Blattanzahl und/oder Blattlänge. Unter den gewählten Versuchsbedingungen hatte das Isolat 5Re4-12 keinen Einfluß auf das Keimlingswachstum. Die meisten Isolate för-

derden das Blattwachstum und verringerten gleichzeitig das Längenwachstum. Eine Korrelation zwischen der Wachstumsförderung und der Produktion von Indol-3-essigsäure bei den Isolaten konnte nicht festgestellt werden.

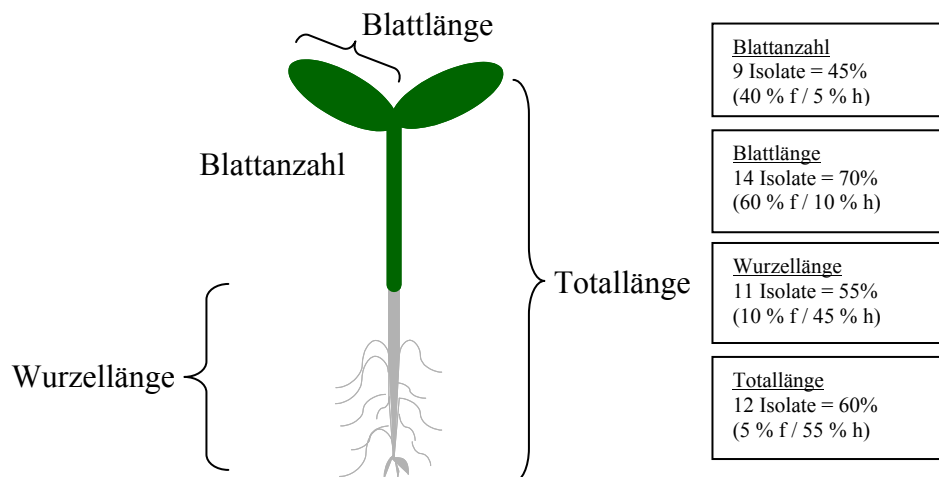


Abb. 1: Übersicht der im Keimlingstest analysierten Parameter. Rechts sind die Ergebnisse der Effekte (f = pflanzenwachstumsfördernd, h = pflanzenwachstumshemmend) der applizierten Bakterien dargestellt (vgl. auch Tab. 2).

### 3.2.2.3 Wirkung von Bakterienisolaten auf die Lebensfähigkeit von Sklerotien

Für eine Beurteilung des Effektes der Bakterienisolate auf die Lebensfähigkeit von Rhizoctonia-Sklerotien, die als Dauerorgane eine entscheidende Rolle in der Epidemiologie des Pilzes spielen, wurde ein spezielles Testverfahren entwickelt.

Für das Bakterienisolat *Pseudomonas fluorescens* 2Re2-6 (B2) konnte bei einer Zellzahl von  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup> eine Hemmung der Sklerotienkeimung um ca. 26 % erreicht werden. Es konnte eine eindeutige Korrelation zwischen der Zellzahl und der hemmenden Wirkung auf die Sklerotienkeimung beobachtet werden. Bei höheren Titern des *Pseudomonas*-Isolates ( $10^7$  und  $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) war die Hemmwirkung geringer als bei  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>.

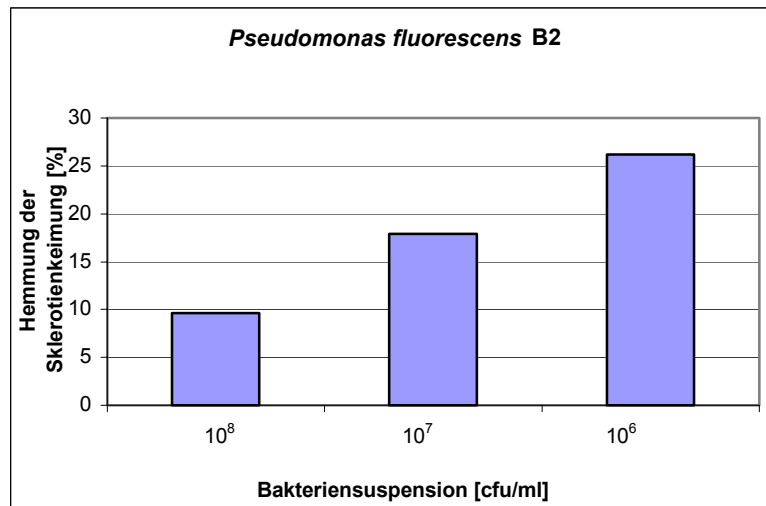


Abb. 2: Einfluss von *Pseudomonas fluorescens* 2Re2-6 auf die Sklerotienkeimung in Abhängigkeit von der Zellzahl.

### 3.1 Selektion geeigneter pilzlicher BCAs

Die antifungische Aktivität von Pilzisolaten gegen *R. solani* wurde ebenfalls in einem *in vitro* Biotest untersucht. Nach Festlegung der Bedingungen wurden 390 pilzliche Isolate gegen die Pathogenisolate (RHISOW4 und RHISO325) getestet. Die Isolate wurden aus der Stammsammlung (PD Dr. G. Berg, Universität Rostock, Mikrobiologie) nach den bereits genannten Kriterien ausgewählt. Die pilzlichen Isolate stammen aus der Rhizosphäre von Erdbeer-, Raps- und Kartoffelpflanzen (Rhizosphäre und Geocaulosphäre) sowie aus nicht durchwurzeltem Boden. Während der Vegetationsperiode 2000 bis 2002 wurden die Isolate in Rostock, Berlin und Braunschweig 6 Wochen nach der Pflanzung, während der Blüte und kurz vor der Ernte isoliert.

#### 3.3.1 Antifungische Wirkung der Pilzisolat

Bei 20 °C zeigten 35 Isolate eine deutliche antifungische Aktivität gegen die virulenten *R. solani*-Isolate RHISO 325 und RHISO W4 durch Ausbildung von klaren Hemmzonen, der Ausbildung von Grenzzonen des Pathogens und in der Ausbildung einer Hemmzone mit anschließendem Überwachsen des Pathogens durch den Antagonisten (Tab. 5). Mikroskopisch waren in diesen Varianten auch Veränderungen des Myzelbildes des Pathogens zu beobach

Tab. 5: Antagonistische Aktivität pilzlicher Isolate gegenüber *R. solani* nach einer Inkubationsdauer von 10 Tagen bei 20 °C.

Nr.	Stamm	Spezies	Antagonistische Aktivität <sup>1</sup>			
			RHI SO 325 <sup>2</sup>		RHI SO W4 <sup>3</sup>	
1	PR 9-10-8	<i>Trichoderma sp.</i>	++	HP	+++	HP
2	PR 26-12-6	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP	+++	HP
3	PR 13-11-11	<i>Trichoderma sp.</i>	++	HP	++	HP
4	BSE 1-1-10	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP	++	HP
5	BSE 3-1-5		++	HP	++	HP
6	BSR 3-2-2		++	HP	+++	HP
7	RB 4-2-18	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP	+++	
8	RB 3-2-14	<i>Trichoderma sp.</i>	++	HP	+++	
9	RB 4-2-1	<i>Trichoderma sp.</i>	++	HP	++++	
10	RB 1-2-4		++	HP	++	HP
11	RB 1-2-18	<i>Trichoderma sp.</i>	++	HP	+++	
12	RE 1-3-3	<i>Trichoderma sp.</i>	+++		+++	
13	RE 4-3-9		+++	HP	+++	HP
14	RE 3-3-7		+++		+++	
15	RE 2-3-11		+++		+++	
16	RE 4-3-8	<i>Trichoderma sp.</i>	+++		+++	
17	RE 1-3-12	<i>Trichoderma sp.</i>	+++		+++	
18	RE 1-3-4	<i>Trichoderma sp.</i>	+++		+++	
19	RE 1-3-17	<i>Trichoderma sp.</i>	+++		+++	
20	RE 1-3-13	<i>Trichoderma sp.</i>	+++		+++	
21	RB 4-3-18	<i>Trichoderma sp.</i>	+++		+++	
22	RE 2-3-4		+++		+++	
23	RB 3-3-16		+++		+++	
24	RB 2-3-17	<i>Trichoderma sp.</i>	+++		+++	
25	RB 2-3-9		+++		+++	
26	RB 2-3-13	<i>Trichoderma sp.</i>	+++		+++	
27	RB 2-3-5		+++		+++	
28	PR 18-12-9	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP**	+++	HP**
29	G1/4	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP	+++	HP
30	G3/2	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP**	+++	HP**
31	G4/4	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP	+++	HP
32	G1/9	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP**	+++	HP**
33	G4/7	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP	+++	HP
34	G1/8	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP**	+++	HP**
35	G1/7	<i>Trichoderma sp.</i>	+++	HP	+++	HP

<sup>1</sup>Bewertung der Hemmhöfe (HH): + HH 2-5 mm, ++ HH 5-10 mm, +++ HH > 10 mm

HP = Hyperparasitismus



**\*\* Hyperparasitismus sehr stark ausgeprägt**

ten. In einigen Varianten war das Myzel des Pathogens weiß, d. h. offensichtlich wurde die Bildung von Melanin im Myzel des Erregers verhindert. In anderen Varianten wirkte das Myzel des Erregers brüchig und die Struktur der Myzeloberflächen verändert.

Die antagonistische Aktivität der 35 Pilzisolat mit antifungischer Wirkung gegen *R. solani* im ersten Screening wurde nochmals bei einer Temperatur von 12 °C geprüft. In diesem Test wurde statt des Isolates RHI SO W4 das virulente Rhizoctonia-Isolat (3/3/13), ein Isolat mit gutem Wachstum bei Temperaturen von 10-12 °C, verwendet. Der Biotest wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Aufgrund des verzögerten Wachstums von *R. solani* 3/3/13 wurde das Pathogen 3-4 Tage vorinkubiert. Die Auswertung der Hemmzonen erfolgte nach 12, 21 und 30 Tagen.

Von den 31 geprüften Pilzisolaten zeigten 15 Isolate bei 12 °C eine antagonistische Aktivität gegen *R. solani* in Dualkultur (Tab. 6).

### **3.3.2 Antifungische Mechanismen *in vitro***

#### **3.3.2.1 Exoenzyme der antifungisch wirksamen Pilzisolat**

##### **Chitinasen**

Nach 7 Tagen Inkubation bei 20 °C zeigte sich noch kein Abbau des Chitins. Daher wurden die Platten insgesamt über 4 Wochen beobachtet. Für zwei Isolate, *T. viride* PR26-12-6 (P4) und *T. viride* PR9-10-8 (P5), konnte unter den gewählten Bedingungen eine geringe chitinolytische Aktivität gezeigt werden.

##### **β-1,3-Glucanasen**

Bei allen getesteten Pilzisolaten wurde eine starke glucanolytische Aktivität nachgewiesen. In Abb. 3 sind Beispiele von β-1,3-Glucan-abbauenden Isolaten dargestellt.

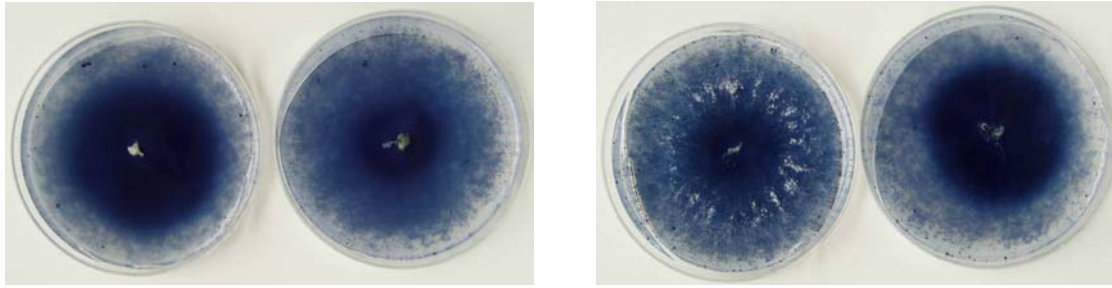


Abb. 3: Plattentest zum Nachweis  $\beta$ -1,3-Glucan-abbauender Enzyme bei Pilzen. Dargestellt sind 4 antagonistische Isolate nach 7 Tagen Inkubation bei 20 °C. Der Abbau des Glucans ist an der Diffusion des gelösten Farbstoffes in den Agar zu erkennen.

### **Proteasen**

Bei allen getesteten Pilzisolaten konnte nach 7 Tagen Inkubation bei 20°C eine Proteaseaktivität nachgewiesen werden.

Die Mehrzahl der selektierten, antagonistisch wirksamen Pilzisolatete zeigte ein hohes lytisches Potenzial, welches für die Pilzzellwand-auflösende Aktivität relevant ist.

#### **3.3.2.2 Wirkung von Pilzisolaten auf die Lebensfähigkeit von Sklerotien**

Ebenfalls wurde der Einfluss der Pilzisolatete auf die Keimung von Rhizoctonia-Sklerotien untersucht. Die Keimung der Sklerotien wurde unter den gewählten Bedingungen durch 9 der 10 getesteten Pilzisolatete zu 100 % gehemmt werden (Abb. 4). Es zeigte sich eine z. T. stark ausgeprägte Besiedlung der Sklerotien mit dem jeweiligen Antagonisten. Durch mikroskopische Beobachtungen konnte das auf Wasseragar ausgewachsene Myzel eindeutig den Antagonisten zugeordnet werden.

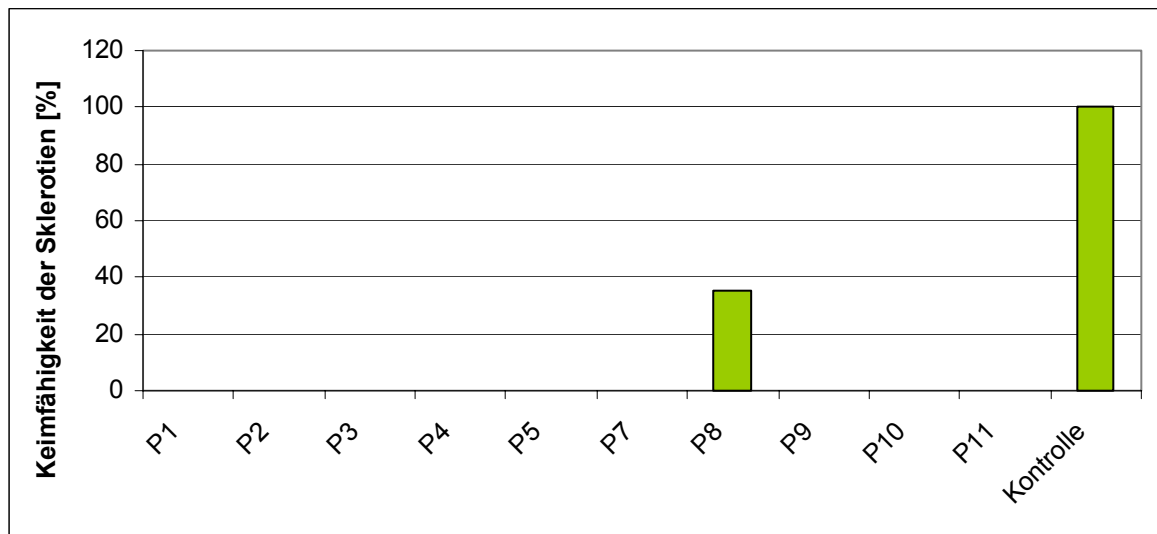


Abb. 4: Keimfähigkeit von Sklerotien auf Wasseragar 7 Tagen nach Inkubation auf Hafermehlger in Gegenwart des jeweiligen Pilzantagonisten.

### 3.3.2.3 Wirkung von Pilzisolaten auf die Keimfähigkeit parasitierten Myzels

Bei 6 von 10 Antagonisten wurde unter den gewählten Bedingungen eine vollständige Hemmung des parasitierten Myzels beobachtet. Bei diesen 6 Isolaten zeigten die mikroskopischen Beobachtungen eindeutig, dass es sich bei dem ausgewachsenen Myzel um das der Antagonisten handelt (Tab. 7). Für diesen Versuch wurde ein spezielles Boniturschema (vgl. Fußnote Tab. 7) entwickelt. Mit Hilfe lichtmikroskopischer Beobachtungen wurden die ausgewachsenen Hyphen beurteilt und konnten so dem Pathogen, bzw. den antagonistischen Pilzisolaten zugeordnet werden. Hierbei zeigte sich in den meisten Fällen eine deutliche Besiedlung der Sklerotien mit den entsprechenden pilzlichen BCAs, die ein Auskeimen der Sklerotien verhinderten. Je nach Anteil der jeweiligen Hyphen (Antagonist/Pathogen) wurden die Ergebnisse in vier Kategorien unterteilt.

Tab. 7: Keimfähigkeit parasitierten Myzels nach 4-tägiger Inkubation mit dem jeweiligen Antagonisten.

Isolate			Myzelwachstum*
Kontrolle (RHI SO325)			4
<i>Trichoderma reeseii</i>	RB2-3-9	P1	1
<i>Trichoderma reeseii</i>	RB2-3-13	P2	1
<i>Trichoderma viride</i>	RE1-3-4	P3	1
<i>Trichoderma viride</i>	PR26-12-6	P4	1
<i>Trichoderma viride</i>	PR9-10-8	P5	n.g.
<i>Trichoderma spec.</i>	PR13-11-11	P6	n.g.
<i>Trichoderma viride</i>	BSE1-1-10	P7	2
<i>Trichoderma viride</i>	RB1-2-18	P8	4
<i>Trichoderma viride</i>	G1/8	P9	1
<i>Trichoderma viride</i>	G1/9	P10	2
<i>Trichoderma viride</i>	G3/2	P11	1

\*Boniturnoten: 1 = kein Wachstum von *R. solani*, 2 = starke Wachstumshemmung von *R. solani*, 3 = geringe Wachstumshemmung von *R. solani*, 4 = keine Wachstumshemmung von *R. solani*. n.g. = nicht getestet.

### 3.3.2.3 Mikroskopische Untersuchungen

Eine interessante Methode stellt die Differenzielle Interferenz-Phasenkontrastmikroskopie dar. Diese Methode ermöglicht die Beobachtung lebender Organismen, ohne dass eine Färbung oder besondere Präparation nötig ist. Am Beispiel von Isolat *Trichoderma spec.* PR13-11-11 (P6) (Abb. 5) wurde versucht, das für Mykoparasitismus beschriebene „Coiling“ nachzuweisen (Chet 1987, Gupta et al. 1999), welches unter lichtmikroskopischen Bedingungen bereits nachgewiesen werden konnte.



Abb. 5: Beginnendes „coiling“ von *R. solani* durch *Trichoderma* spec. P6 nach 4 d Inkubation bei 20°C, Waksman-Agar (Objektträgertest). Aufgenommen mittels Differenzieller Interferenz-Phasenkontrastmikroskopie an der Universität Rostock.

### 3.3 Erstellung molekularer Fingerprints

Schnelle Verfahren zur Identifizierung (auf Spezies-Ebene) und Typisierung (auf der Ebene einzelner Isolate derselben Spezies) von Bakterien-Isolaten werden in vielen Bereichen immer wichtiger, wie z. B. der Taxonomie, der Mikrobiökologie und besonders auf Gebieten der biologischen Sicherheit, wie z. B. der medizinischen und industriellen Mikrobiologie.

Traditionelle Techniken zur Identifizierung von Bakterien beruhen auf phänotypischen und biochemischen Eigenschaften der Organismen. Die Differenzierung eines Isolates allein auf der Grundlage phänotypischer Methoden ist jedoch sehr problematisch und setzt zudem voraus, dass das zu identifizierende Isolat bereits in seinen biochemischen Eigenschaften sehr gut beschrieben ist. Deshalb kommen heute immer mehr Methoden zum Einsatz, die auf dem Genotyp beruhen. Diese bezeichnet man als „Fingerprinting“-Methoden. Man kann zwischen DNA-basierenden (z. B. Ribotyping, Puls-Feld-Gel-Elektrophorese) und PCR-basierenden

(z.B. Random-Amplified-Polymorphic-Sequences-PCR, Repetitive-Extragenomic-Palindrom-Sequences-PCR) Fingerprinting-Techniken unterscheiden.

In diesem Projekt wurden die bakteriellen Isolate mit Hilfe der BOX-PCR charakterisiert. Für die Analyse wird das repetitive BOX-Element benutzt, welches ursprünglich für das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (Martin et al. 1992) beschrieben wurde. Die repetitiven Abschnitte im Genom nahezu aller Spezies sind hochpolymorph. Sie unterscheiden sich in ihrer Häufigkeit, ihrer Länge und ihrer Sequenz. Bei der Untersuchung dieser Polymorphismen ergeben sich charakteristische, stammspezifische Muster der untersuchten Art.

### **3.3.1 Bakterielle BCAs**

#### **BOX-PCR und Sequenzierung der 16S rDNA**

Die nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel erhaltenen Bandenmuster sind in Abb. 6 dargestellt. Für die in Tab. 2 aufgeführten Isolate wurde mit Hilfe der BOX-PCR ein Isolat-spezifischer Fingerprint erstellt.

Anhand der Bandenmuster konnten repräsentative Isolate ausgewählt und die Auswahl identischer Isolate vermieden werden. Die Isolate zeigen einen individuellen „fingerprint“. Die meisten Isolate wurden im Rahmen früherer Studien mittels Fettsäureanalyse identifiziert und einige durch Sequenzierung der 16SrDNA. Die Spezies *Pseudomonas reactans* ist als Champignonpathogen bekannt, so dass dieses Isolat (3Re2-7) aus weiteren Studien heraus zu nehmen ist.

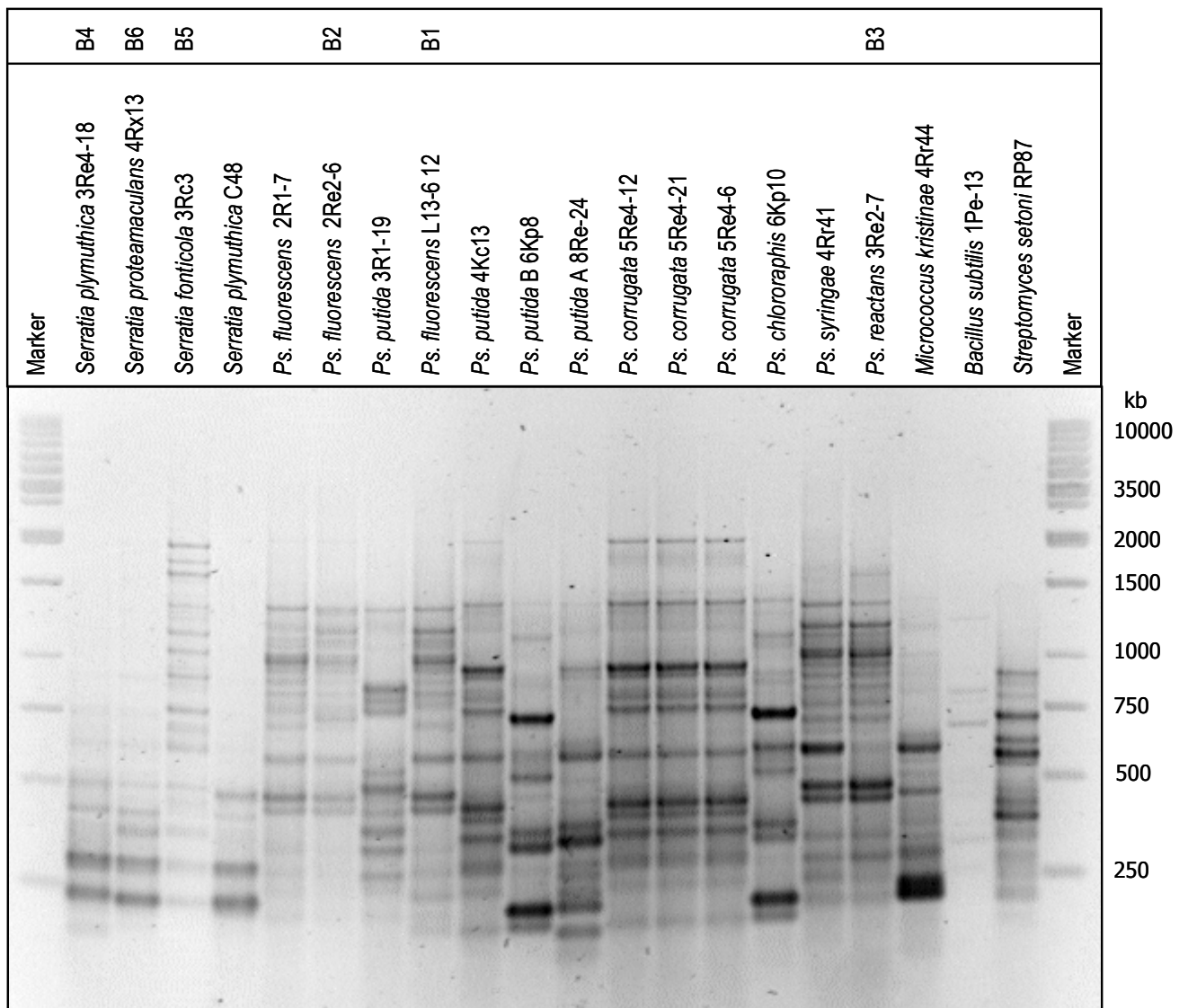


Abb.6: BOX-PCR-Fingerprints antagonistischer Bakterienisolate

### 3.3.2 Pilzliche BCAs

#### BOX-PCR und Sequenzierung der 18S rDNA

In Tab. sind die antagonistischen Pilzisolat zusammengestellt, die genotypisch weiter charakterisiert wurden. Anhand der Bandenmuster konnten repräsentative Isolate ausgewählt und die Auswahl identischer Isolate vermieden werden. Beispielsweise zeigen die Isolate G1/4, G4/4, G4/7, G1/9 und G3/2 nahezu identische Bandenmuster. Diese Isolate wurden von Skle-

rotien an Kartoffelknollen isoliert und stammen vermutlich von einem Isolat. Auch bei Isolat-  
 ten aus der Erdbeerrhizosphäre oder bei Bodenisolaten, die zur selben Zeit isoliert wurden  
 konnten z. T. sehr ähnliche Bandenmuster bei verschiedene Isolaten gefunden werden, was  
 auf dieselbe Ausgangspopulation bzw. auf ein Isolat zurück zu führen ist. In Abb. 7 sind aus-  
 gewählte Bandenmuster antagonistischer Pilzisolatate dargestellt.

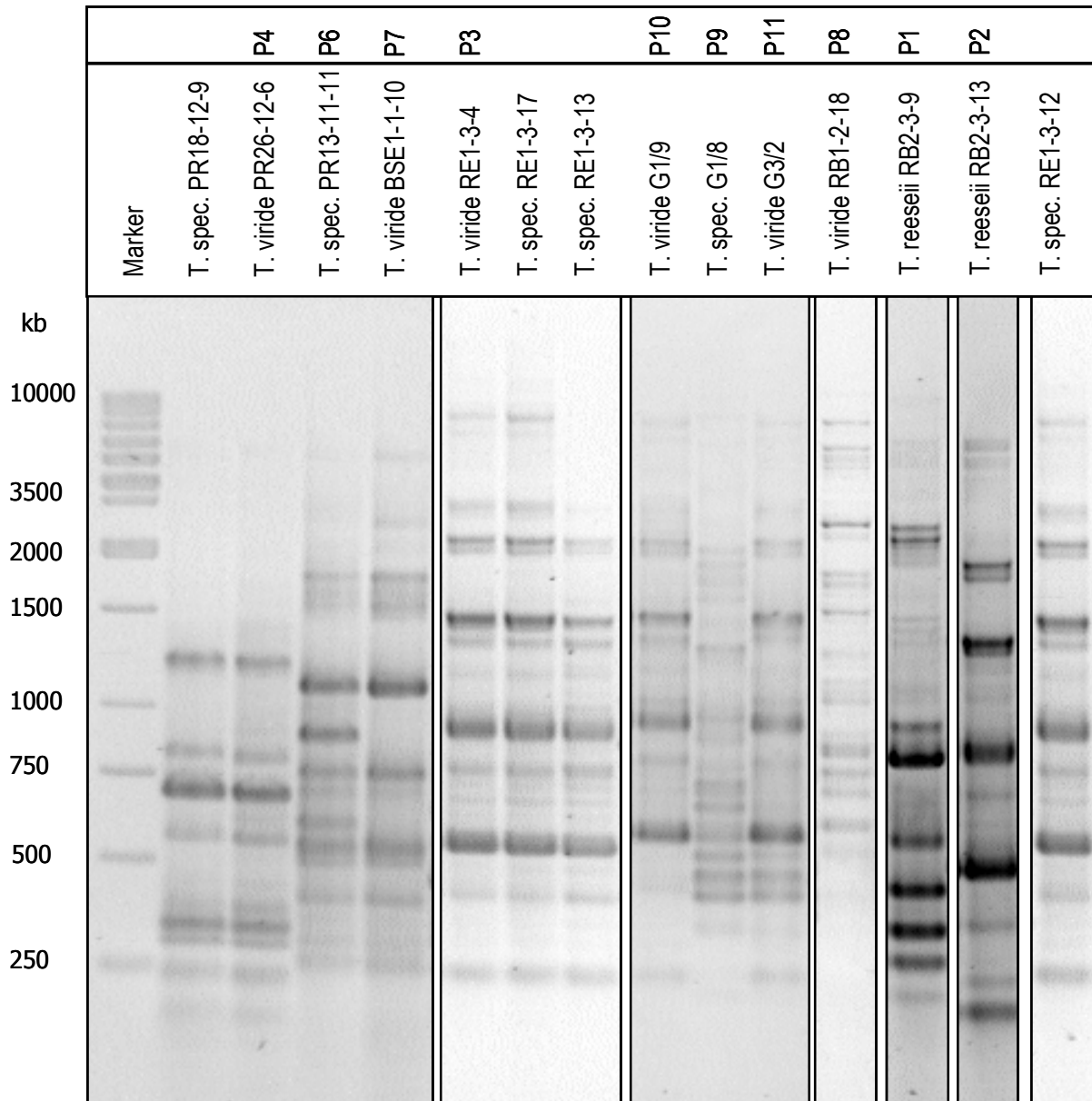


Abb. 7: BOX-PCR-Fingerprints der antagonistischen Pilzisolatate.



### 3.4 Verifizierung der Pathogenitätstest

#### 3.4.1 Salat / AG 1-IB

##### **Einfluss der Inokulumdichte von *R. solani* an Salatjungpflanzen**

Von den geprüften Inokulumstufen konnte bei der reinen Myzelinokulation in Abhängigkeit vom C-Gehalt bei den geprüften Myzelmengen keine Wachstumsdepression im Versuchszeitraum beobachtet werden (Tab. 8). Zur Auswahl einer geeigneten Inokulumdichte zur Prüfung antagonistisch wirkender Organismen müssten bei dieser Art des Inokulums weitere Myzelmengen untersucht werden.

Tab. 8: Einfluss der Inokulumdichte (Myzelmenge und bewachsene Gerstenkörner) auf die Trockenmasse [TM] von Salat (cv. Nadine) nach 4 Wochen Kulturdauer unter kontrollierten Bedingungen (20/12 °C Versuch I und 25/15 °C Versuch II).

Versuch I		Versuch II	
Myzelmenge [mg/Pflanze)	TM [%]	Anzahl Körner	TM [%]
0	100 a	0	100 a
5	90.7 a	3	86.8 b
10	89.3 a	4	62.1 c
15	95.8 a	6	60.9 c
20	90.2 a	-	-

- Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich nicht signifikant nach Test,  $P = 0.05$ .

Die Inokulation von *R. solani* in Form bewachsenen Gerstenkörnern verursachte in allen drei Varianten eine signifikante Reduktion der Salattrockenmasse von 13 bis nahezu 40 %. Die Inokulation von 4 Gerstenkörner je Pflanze erhöhte signifikant die Wachstumsreduktion von Salat im Vergleich zu der Variante mit 3 Gerstenkörnern, wobei eine weitere Erhöhung der Inokulummenge keine weitere Wachstumsreduktion bewirkte.

Bei der Verwendung von reinem Myzel als Inokulum waren leichte Symptome an den Pflanzen erst nach 14 Tagen zu beobachten, während bei Inokulation der ‚Körner‘ an allen Pflanzen Läsionen bereits nach 7 Tagen auftraten.

Insgesamt werden in den folgenden Versuchen in den verschiedenen Pathosystemen mit *R. solani* bewachsene Gerstenkörner als Inokulum verwendet. Für das Pathosystem Salat/*R. solani* wird jede Pflanze mit 3 bewachsenen Gerstenkörnern inokuliert.

### 3.4.2 Kartoffel / AG 3

#### Einfluss von Temperatur und Inokulumdichte

Die geprüften *R. solani* Isolate, isoliert von Kartoffeln, zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Virulenz sowohl in Abhängigkeit von der Temperatur als auch der Inokulumdichte (Abb. 8). Temperaturbedingungen von 18.3 °C und 13.3 °C sowie die geprüften Inokulumdichten beeinflussten die Befallsstärke nicht signifikant. Für die Untersuchungen zur Wirksamkeit der BCAs wurde mit dem Isolat Ben3 (AG 3) gearbeitet und unter Temperaturbedingungen von 20 °C.

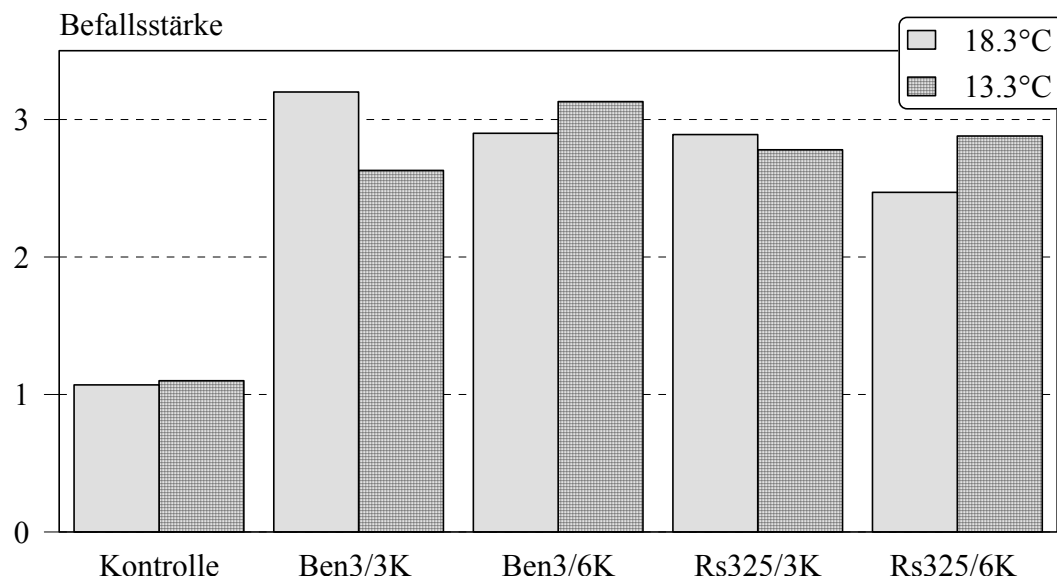


Abb. 8: Befallsstärke von zwei *R. solani* Isolaten (Ben3 und Rs325) auf die (1=gesund bis 5=Keimstängel abgestorben) an Kartoffelstängel (cv. Exquisa) in Abhängigkeit von der Inokulumdichte und der Temperatur, 4 Wochen nach der Inokulation.

### 3.4.3 Zuckerrübe / AG 4 und AG 2-IIIB

#### Einfluss von Temperatur und Inokulumdichte

In Abhängigkeit von der Temperatur war kein signifikanter Einfluss auf die AR der Zuckerrübe zu verzeichnen (Tab. 9). Die Temperatur beeinflusste jedoch deutlich die BH durch *R. solani*, die bei 25/15°C im Durchschnitt der Isolate annähernd 33 % betrug, während bei 15/10°C im Durchschnitt der Varianten lediglich das Isolat Ben4 eine geringe BH von 4.6 % verursachte. Bei 20/15°C waren keine signifikanten Unterschiede in der BH bei Vergleich der Isolate festzustellen. Im Durchschnitt der Varianten, die mit dem Isolat Ben4 inokuliert wurden, war eine signifikant geringere AR zu verzeichnen.

Tab. 9: Einfluss von zwei *R. solani* Isolaten Ben2 (AG 2-IIIB) und Ben4 (AG 4) auf die Auflaufrate (AR) und die Befallshäufigkeit (BH) der Zuckerrübe (cv. Dorena) 10 Tage nach der Inokulation in Abhängigkeit von der Temperatur.

Variante	20/15 °C		15/10 °C	
	AR [%]	BH [%]	AR [%]	BH [%]
Kontrolle	93.3 a	0 a	94.9 a	0 ab
R.s. Ben2 (AG 4)	93.9 a	33.7 b	87.2 a	0.6 a
R.s. Ben4 (AG 2-IIIB)	77.7 b	33.2 b	83.3 a	4.6 b

- Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Varianten unterscheiden sich nicht signifikant nach dem LSD-Test, P = 0.05.

Geprüft wurde der Einfluss der Inokulumdichte von 1- 6 Gerstenkörner/12 Sämlinge auf die AR bzw. BH der Zuckerrübe. Kein Einfluss auf die AR und BH war bei beiden Isolaten nach Inokulation von 1 bis 3 Körnern festzustellen. Die AR war nach Inokulation des Isolates Ben4 in allen Varianten reduziert und signifikant nach Inokulation von 4 bzw. 6 Körnern (Abb. 2).

Tab. 10: Einfluss von zwei *R. solani* Isolaten (Ben2 und Ben4) auf die Auflauftrate (AR) und die Befallshäufigkeit (BH) der Zuckerrübe (cv. Dorena) in Abhängigkeit von der Inokulumdichte, 10 Tage nach der Inokulation bei 20/15 °C.

Variante	Inokulum Anzahl Körner	AR [%]	BH [%]
Kontrolle	0	93.3 ab	0 a
R.s. Ben2 (AG 4)	4	91.7 ab	25.4 bd
	5	95.0 a	21.1 b
	6	95.0 a	54.4 c
R.s. Ben4 (AG 2-2IIIB)	4	75.0 ab	31.1 cd
	5	84.9 ab	49.0 cd
	6	73.3 b	18.2 ab

- Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test,  $P = 0.05$ .

Nach Inokulation von 4 bis 6 mit *R. solani* bewachsenen Körnern war in allen Varianten ein signifikanter Einfluss auf die BH gegeben. Eine lineare Beziehung zwischen Inokulumdichte (Anzahl inokulierter Körner) und BH war bei beiden Isolaten nicht zu beobachten. Das Isolat Ben2 verursachte die höchste BH nach Inokulation von 6 Körnern, während bei dieser Inokulumdichte das Isolat Ben4 die geringste BH aufwies. Ursache dafür kann ein unterschiedliches Durchwachsen der Körner mit *R. solani* sein.

### 3.5 Evaluation der ausgewählten BCAs unter kontrollierten Bedingungen

#### 3.5.1 Salat / AG 1-IB

An Salat wurde die krankheitsunterdrückende Wirkung von 18 bakteriellen und 6 pilzlichen, *in vitro* gegen *R. solani* antifungisch wirkenden, BCAs geprüft. Die Wirksamkeit der BCAs wurde anhand der Trockenmasse von Salat beurteilt. Durch die Inokulation mit *R. solani* wurde die Trockenmasse in allen Versuchen innerhalb von drei Wochen signifikant reduziert,

wobei die Wachstumsreduktion trotz kontrollierter Versuchsbedingungen in den einzelnen Versuchen variierte.

### **Bakterielle BCAs**

Von 18 geprüften BCAs zeigten 7 Isolate in einem Versuch eine Wirkung gegen *R. solani*. Nach Behandlung des Salates mit den BCAs L13-6-12, 2Re2-6, 3Re2-7, 3Re4-18 und 5Re4-21 sowie 3Rc3 und 4Rx13 war keine signifikante Reduktion in der Trockenmasse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten, d.h. die durch *R. solani* verursachte Wachstumsdepression konnte in diesen Varianten durch die BCAs kompensiert werden (Tab. 11, Abb. 9).

Die Infektion der Salatpflanzen mit *R. solani* konnte durch die Behandlung mit den bakteriellen BCAs in keinem Versuch verhindert werden. Die krankheitsunterdrückende Wirkung der BCAs L13-6-12, 2Re2-6, 3Re2-7, 3Re4-18 sowie aufgrund der positiven Ergebnisse im Blattscheibentest von 3Rc3 und 4Rx13 wurde nochmals überprüft. Die Ergebnisse des Versuches zeigen, dass in den Behandlungsvarianten mit den BCAs die Trockenmasse signifikant höher war im Vergleich zur Pathogenkontrolle (R.s.), ausgenommen die Variante mit dem BCA 3Re2-7 (Abb. 9). Eine vollständige Kompensation der durch *R. solani* verursachten Wachstumsdepression konnte jedoch nicht erreicht werden. Kein signifikanter Unterschied in der Trockenmasse war bei Vergleich der Variante mit dem BCA 3Rc3 und der Kontrolle gegeben. Somit zeigten die Isolate L13-6-12, 2Re2-6 und 3Re4-18 im Wiederholungsversuch ebenfalls eine krankheitsunterdrückende Wirkung, gemessen an der Trockenmasse von Salat (Abb. 9).

Tab. 11: Wirkung bakterieller BCAs auf die Trockenmasse (TM) von Salat (cv. Dagan) drei Wochen nach der Inokulation mit *R. solani* (Isolat 7/3) unter kontrollierten Bedingungen (20/15 °C).

Versuch I		Versuch II		Versuch III	
Varianten	TM [g/Pfl.]	Varianten	TM [g/Pfl.]	Varianten	TM [g/Pfl.]
Kontrolle	3.75	Kontrolle	4.88	Kontrolle	3.51
<i>R. solani</i>	0.89*	<i>R. solani</i>	3.62*	<i>R. solani</i>	2.32*
3Re2-7	2.87	5Re4-12	3.45*	8Rr24	2.61*
L13-6-12	3.59	5Re4-21	4.13	4Rr44	2.05*
4Kc13	1.83*	5Re4-6	3.54*	4Rr41	2.62*
3Re4-18	2.71	1Pe4-13	3.68*	6Kp10	2.67*
3Rc3	1.64*	2Re2-6	4.24	2R1-7	2.50*
4Rx13	1.97*	3R1-19	3.32*	6Kp8	2.77*

- \*Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle nach dem Tukey-Test, P = 0.05.

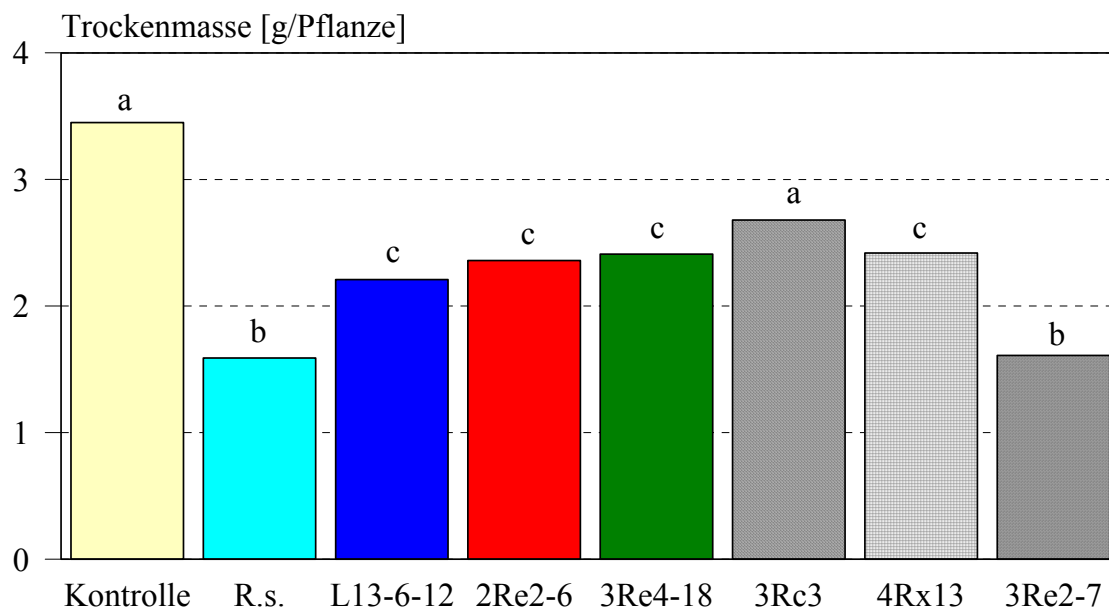


Abb. 9: Wirkung bakterieller BCAs auf die Trockenmasse von Salat (cv. Dagan) drei Wochen nach Inokulation mit *R. solani* (Isolat 7/3) unter kontrollierten Bedingungen (20/15 °C).

Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test,  $P = 0.05$ .

### **Pilzliche BCAs**

Bei der Auswahl der pilzlichen BCAs wurde neben der antifungischen Wirkung *in vitro*, der Aktivität bei geringeren Temperaturbedingungen und der Beeinflussung der Sklerotienkeimung von *R. solani* auch darauf geachtet, dass die Isolate eine gute Sporulationsfähigkeit aufweisen. Mit Blick auf eine wirtschaftliche Formulierung der Isolate ist dies ein wichtiges Auswahlkriterium. Von den 15 selektierten Isolaten zeigten 6 Isolate eine gute Sporulation. Von diesen pilzlichen BCAs wurde die krankheitsunterdrückende Wirkung gegen *R. solani* an der Pflanze *in vivo* untersucht.

In einem ersten Gefäßversuch, in dem das Substrat nur mit Konidien der BCAs zum Zeitpunkt der Pflanzung behandelt wurde, konnten keine krankheitsunterdrückenden Effekte beobachtet werden. Durch Inokulation eines Myzelinokulums der pilzlichen BCAs war in den mit den pilzlichen BCAs inokulierten Varianten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine Reduktion der Trockenmasse von Salat zu beobachten (Abb. 10). In der Pathogenkontrolle war die Trockenmasse durch *R. solani* signifikant vermindert. Zwei Wochen nach der Inokulation von *R. solani* wiesen in der Pathogenkontrolle alle Pflanzen Symptome durch den Erreger auf (Abb. 11). In den Varianten behandelt mit den pilzlichen BCAs P4, P10 und P11 war eine signifikant geringere Befallshäufigkeit gegeben.

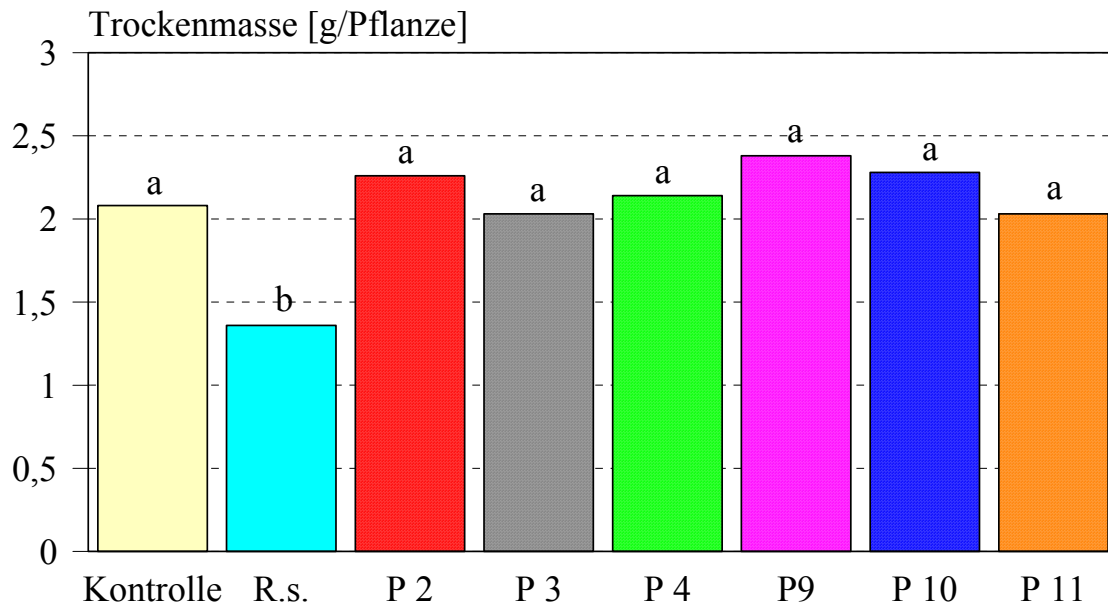


Abb. 10: Wirkung pilzlicher BCAs auf die Trockenmasse von Salat (cv. Dagan) vier Wochen nach Inokulation mit *R. solani* (Isolat 7/3) unter kontrollierten Bedingungen (20/15 °C). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test,  $P = 0.05$ .

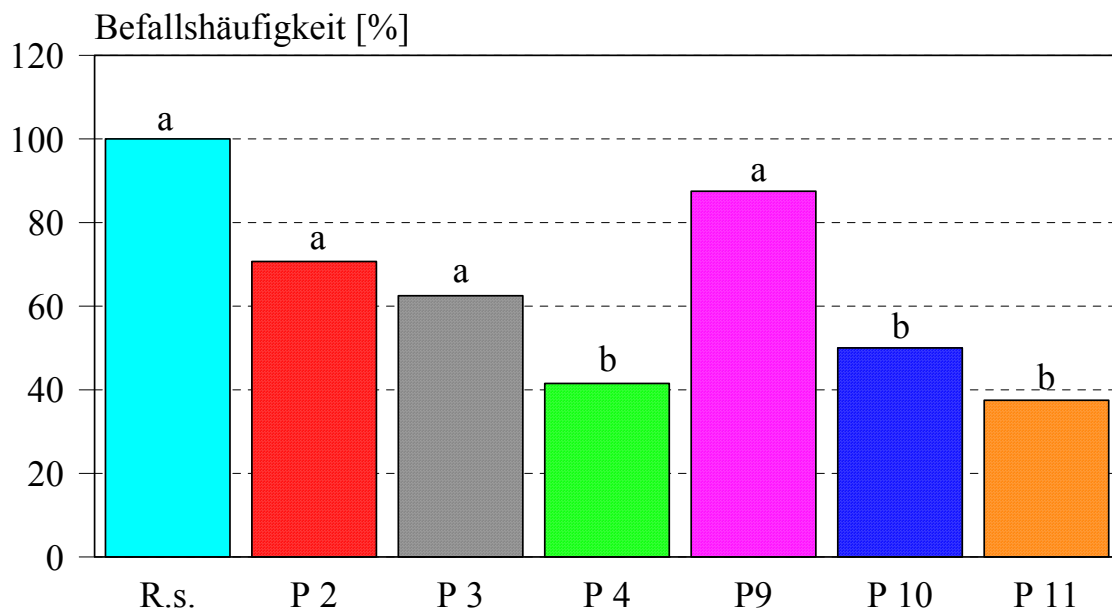


Abb. 11: Wirkung bakterieller BCAs auf die Befallshäufigkeit von Salat (cv. Dagan) mit *R. solani* (Isolat 7/3) zwei Wochen nach der Inokulation unter kontrollierten Bedingungen (20/15 °C). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Werte unterscheiden sich nicht signifikant nach dem Tukey-Test,  $P = 0.05$ .



### 3.5.1.1 Prüfung von bakteriellen BCAs an Salatblattscheiben

Es wurde die unterdrückende Wirkung von 18 BCAs gegen *R. solani* an Salatblattscheiben im Boxtest untersucht. Die Blattscheiben der Kontrollvariante (ohne Pathogen) wiesen im Versuchszeitraum keine Symptome auf. Nach einer Inkubationszeit von 6 d waren die Salatblattscheiben in der Pathogenkontrolle (R.s.) zu annähernd 60 % mit *R. solani* besiedelt. Eine unterdrückende Wirkung zeigten insgesamt 6 bakterielle BCAs.

Nach Behandlung mit den BCAs 3R14-18, L13-6-12, 4Rx13, 3Rc3 und 1Pe4-13 wurde die Besiedlung der Blattscheiben mit *R. solani* signifikant (57 bis 75 %) reduziert (Abb. 12). Die bakteriellen BCAs 5RE14-12 und 4Rr41 begünstigten die Blattbesiedlung durch *R. solani*.

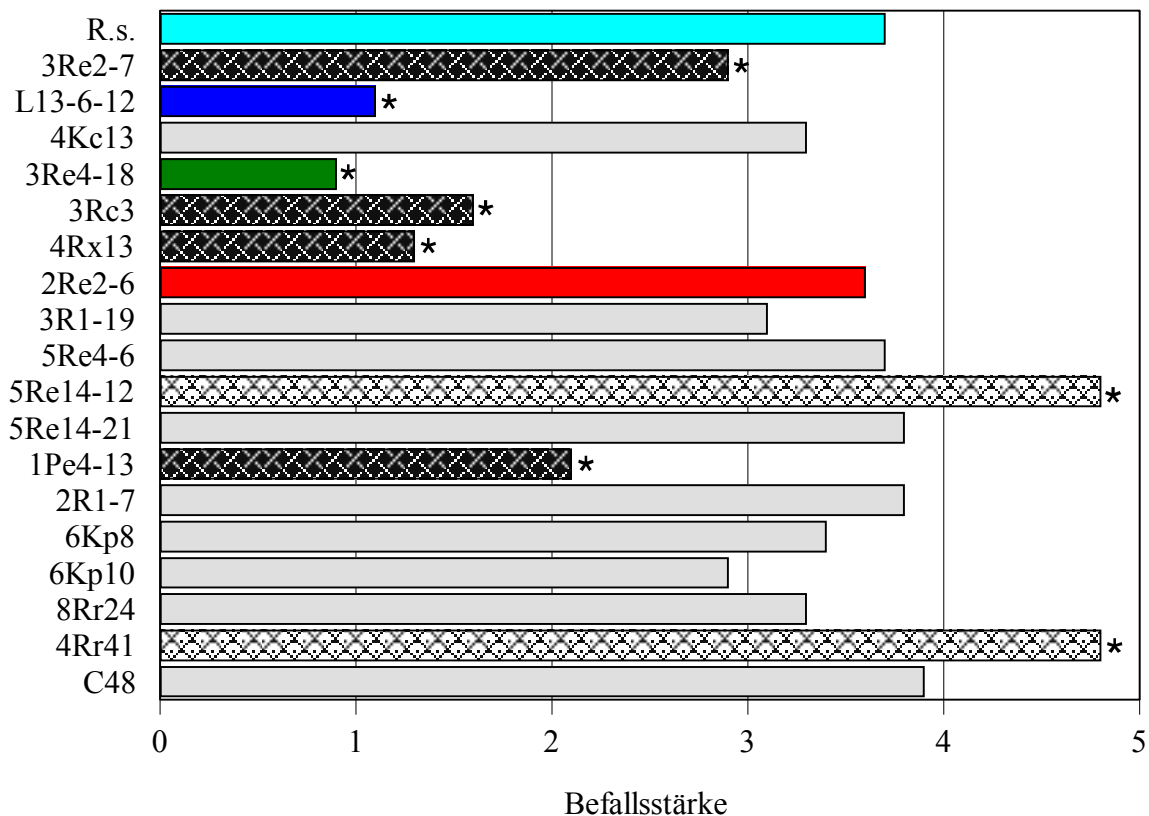


Abb. 12: Wirkung bakterieller BCAs auf die Befallsstärke (0 = keine Nekrose, 1 = < 20 %, 2 = 21-40 %, 3 = 41-60 %, 4 = 61-80 %, 5 = > 80 %) an Salatblattscheiben (cv. Dagain) durch *R. solani*. \*Signifikanz im Vergleich zur Pathogenkontrolle (*R. solani*) nach dem Kruskal-Wallis Test,  $P < 0.05$ .

### 3.5.2 Kartoffel / AG 3

#### Bakterielle BCAs

Die krankheitsunterdrückende Wirkung von 19 bakteriellen BCAs wurde an Kartoffeln nach künstlicher Inokulation der Knollen mit *R. solani* unter günstigen Bedingungen für die Entwicklung des Erregers getestet. Von den untersuchten BCAs bewirkten 10 Stämme eine Befallsreduktion von über 26 % (Abb. 13 und 14). Von 6 BCAs, die auch an Salat oder an der Zuckerrübe eine krankheitsunterdrückende Wirkung zeigten, wurde eine wiederholte Prüfung durchgeführt. Die befallsreduzierende Wirkung der geprüften BCAs konnte bestätigt werden (Abb. 14). Die besten Ergebnisse in Bezug auf die Befallsreduktion von *R. solani* waren nach Behandlung mit dem BCA L13-6-12 zu verzeichnen. In beiden Versuchen konnte der Befall signifikant reduziert werden.

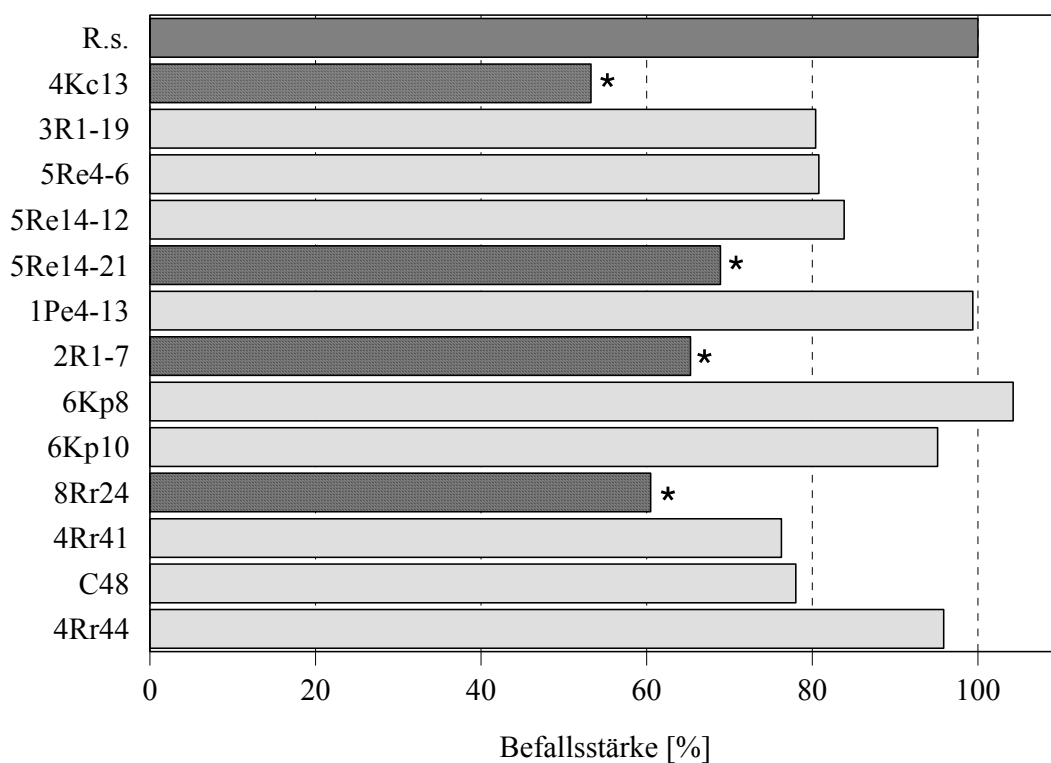


Abb. 13: Wirkung bakterieller BCAs auf die Befallsstärke von Kartoffelkeimen (cv. Exquisia) mit *R. solani*, 3 Wochen nach der Inokulation von *R. solani* (Ben3). \*Signifikanz im Vergleich zur Pathogenkontrolle (R. s.) nach dem Kruskal-Wallis Test,  $P < 0.05$ .

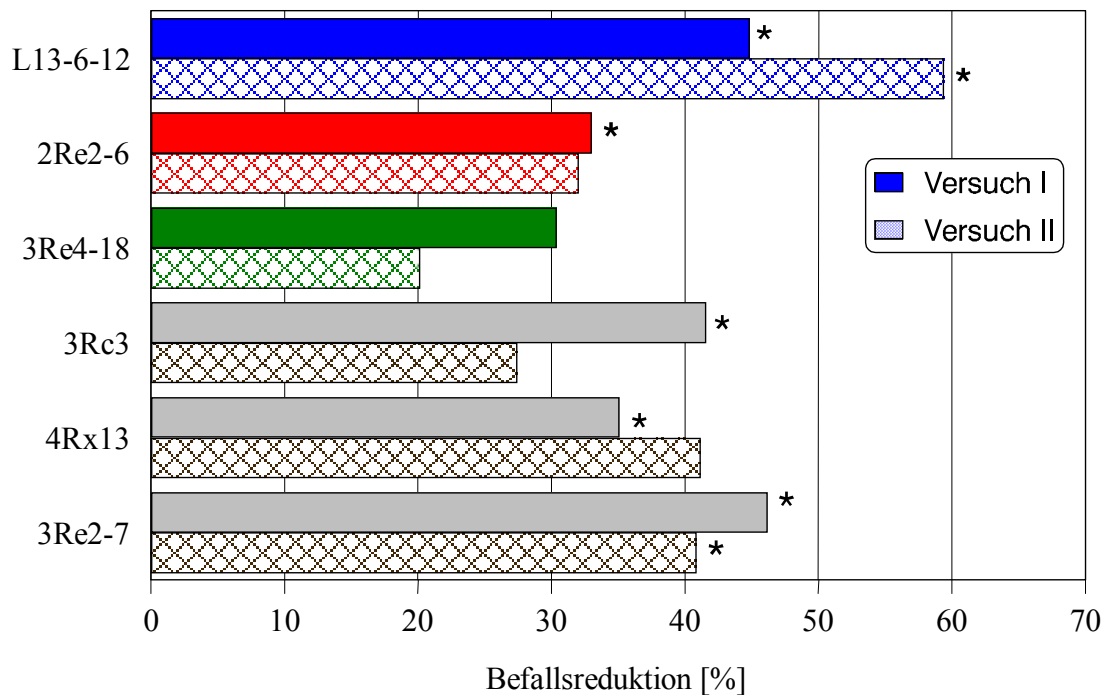


Abb. 14: Befallsreduktion von *R. solani* an Kartoffelkeimen (cv. Exquisa) nach Bodenapplikation mit bakteriellen BCAs, 3 Wochen nach der Inokulation von *R. solani* (Ben3). \*Signifikanz im Vergleich zur Pathogenkontrolle nach dem Kruskal-Wallis Test,  $P < 0.05$ .

### Pilzliche BCAs

Die befallsreduzierende Wirkung gegen *R. solani* an der Kartoffel der *in vitro* selektierten pilzlichen BCAs wurde in zwei Versuchen getestet. Während im ersten Versuch, wie beschrieben, eine künstliche Inokulation mit *R. solani* vorgenommen wurde, waren die Knollen im zweiten Versuch natürlicherweise mit Sklerotien von *R. solani* befallen. Die getesteten pilzlichen BCAs zeigten in beiden Versuchen eine krankheitsunterdrückende Wirkung von 15 bis 53 %, die im ersten Versuch bei allen BCAs signifikant war, ausgenommen das BCA P11 (Abb. 15). Im zweiten Versuch zeigte das BCA P11 jedoch mit 53 % Befallsreduktion die beste Wirkung.

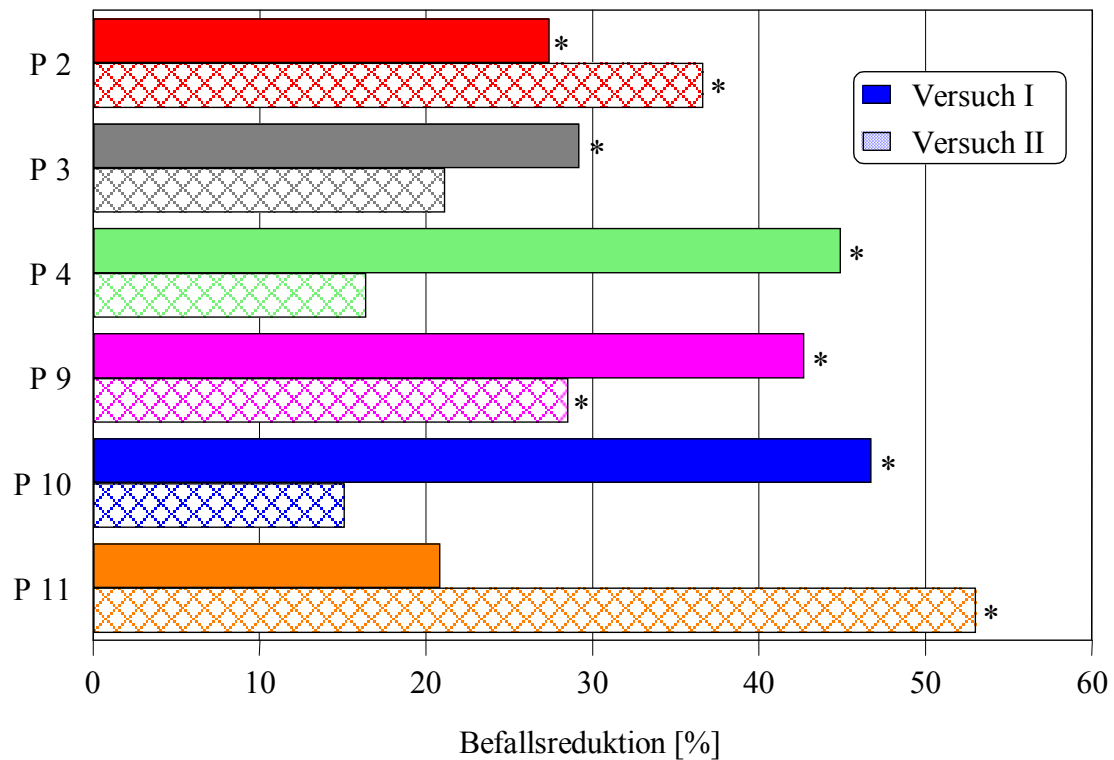


Abb. 15: Befallsreduktion von *R. solani* an Kartoffelkeimen (cv. Exquisita) durch pilzliche BCAs nach Bodenapplikation und künstlicher Inokulation mit *R. solani* (Ben3) (Versuch I) und Boden- und Knollenapplikation von natürlich mit Sklerotien befallenen Knollen (Versuch II), 21 d nach der Inokulation. \*Signifikanz im Vergleich zur Pathogenkontrolle, Kruskal-Wallis Test,  $P < 0.05$ .

### 3.5.3 Zuckerrübe / AG 4

Von allen *in vitro* ausgewählten bakteriellen BCAs wurde die Wirkung auf die AR und die BH von *R. solani* (Ben4) an der Zuckerrübe getestet. Durch *R. solani* wurde eine signifikante BH von nahezu 30 % in allen Versuchen verursacht. Die AR der Zuckerrübe wurde nur im Versuch III durch das Isolat 5Re4-12 im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Das gleiche Isolat beeinflusste im Versuch I nicht die AR, in welchem allerdings eine geringe AR in der Kontrolle zu verzeichnen war. Die Wirkung der BCAs wurde wiederholt an der Zuckerrübe getestet. Lediglich die Isolate 3Re2-7 und L13-6-12 reduzierten signifikant in beiden Versuchen die BH mit *R. solani* an den Zuckerrübenkeimlingen. Die Isolate 4Rx13, 6Kp8 und 2 Re2-6 zeigten ebenfalls eine Reduktion in der BH, die jedoch nicht in beiden Versuchen signifikant war.

Tab. 12: Auflauftrate (AR) sowie Befallshäufigkeit (BH) der Zuckerrübe (cv. Dorena) 10 Tage nach Inokulation mit *R. solani* unter kontrollierten Bedingungen (20/15 °C)

Versuch I			Versuch II			Versuch III		
Varianten	AR	BH	Varianten	AR	BH	Varianten	AR	BH
	[%]	[%]		[%]	[%]		[%]	[%]
Kontrolle	66.7	0	Kontrolle	93.3	0	Kontrolle	91.7	0
<i>R. solani</i>	75.0	28.9	<i>R. solani</i>	91.7	30.9	<i>R. solani</i>	91.7	29.1
3Re2-7	88.3	1.9*	3Re2-7	85.0	5.9*	2R1-7	73.3	18.2
L13-6-12	76.7	8.7*	L13-6-12	88.3	7.5*	6Kp8	80.0	14.6
4Kc13	73.3	4.6*	4Kc13	81.7	32.6	6Kp10	85.0	37.2
3Re4-18	83.3	30.0	3Re4-18	91.7	16.4	8Rr24	80.0	29.2
3Rc3	71.7	20.9	3Rc3	86.7	21.1	4Rr41	90.0	42.6
4Rx13	78.3	17.0	4Rx13	90.0	1.8*	1Pe4-13	86.7	30.8
5Re4-12	80.0	12.5	2R1-7	86.7	28.8	5Re4-12	66.7*	42.5
5Re4-21	76.7	19.6	6Kp8	86.7	5.8*	5Re4-21	85.0	17.6
5Re4-6	90.0	7.4*	6Kp10	85.0	5.9*	5Re4-6	81.7	32.6
1Pe4-13	81.7	4.1*	8Rr24	91.7	18.2	2Re2-6	93.3	5.4*
2Re2-6	81.7	16.3	4Rr41	83.3	14.0*	3R1-19	78.3	21.3
3R1-19	71.7	16.3	1Pe4-13	83.3	6.0*	C48	78.3	19.2

- \*Signifikanz im Vergleich zur Pathogen-Kontrolle (*R. solani*) nach dem Tukey-Test, P = 0.05.

### 3.6 Evaluation der ausgewählten BCAs unter Feldbedingungen

Unter Feldbedingungen wurde die krankheitsunterdrückende Wirkung der bakteriellen BCAs L13-6-12, *Pseudomonas putida*, 2Re2-6, *P. fluorescens* und 3Re4-18, *Serratia plymuthica* gegen *R. solani* an Salat und Kartoffel geprüft. Die genannten BCAs zeigten unter kontrollierten Bedingungen in vivo gegen *R. solani* eine Wirkung an Salat, Kartoffel und Zuckerrübe.

### 3.6.1 Prüfung der antifungalen Wirkung an Salat

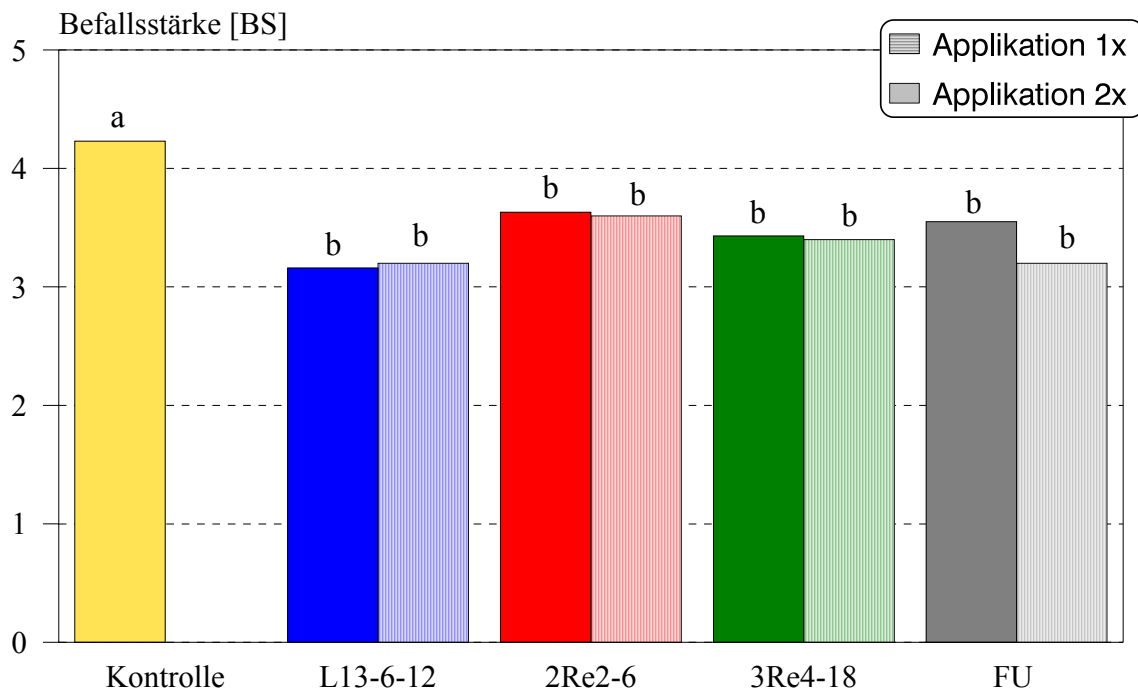
Die Prüfung der krankheitsunterdrückenden Wirkung der bakteriellen BCAs L13-6-12, 2Re2-6 und 3Re4-18 an Salat erfolgte auf den zwei Standorten, Golzow und Großbeeren. Um die Wirksamkeit der bakteriellen BCAs besser beurteilen zu können, wurde eine Fungizidvariante in die Untersuchungen einbezogen. Auf beiden Standorten war nach Behandlung mit den BCAs eine höhere Trockenmasse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu beobachten (Tab. 13). Auf dem Standort Golzow waren die Unterschiede in der Trockenmasse im Vergleich zur Kontrolle sowohl nach einmaliger als auch nach zweimaliger Behandlung signifikant. Nach zweimaliger Behandlung mit dem Fungizid war auf dem Standort Großbeeren keine Verbesserung des Wachstums gegeben.

Tab. 13: Wirkung bakterieller BCAs (L13-6-12, *Pseudomonas putida*, 2Re2-6, *P. fluorescens* und 3Re4-18, *Serratia plymuthica*) und einem Fungizid (BASF 516) auf die Trockenmasse (TM) von Salat 'Nadine' im Feld nach einmaliger (1x Appl.) oder zweimaliger (2x Appl.) Applikation.

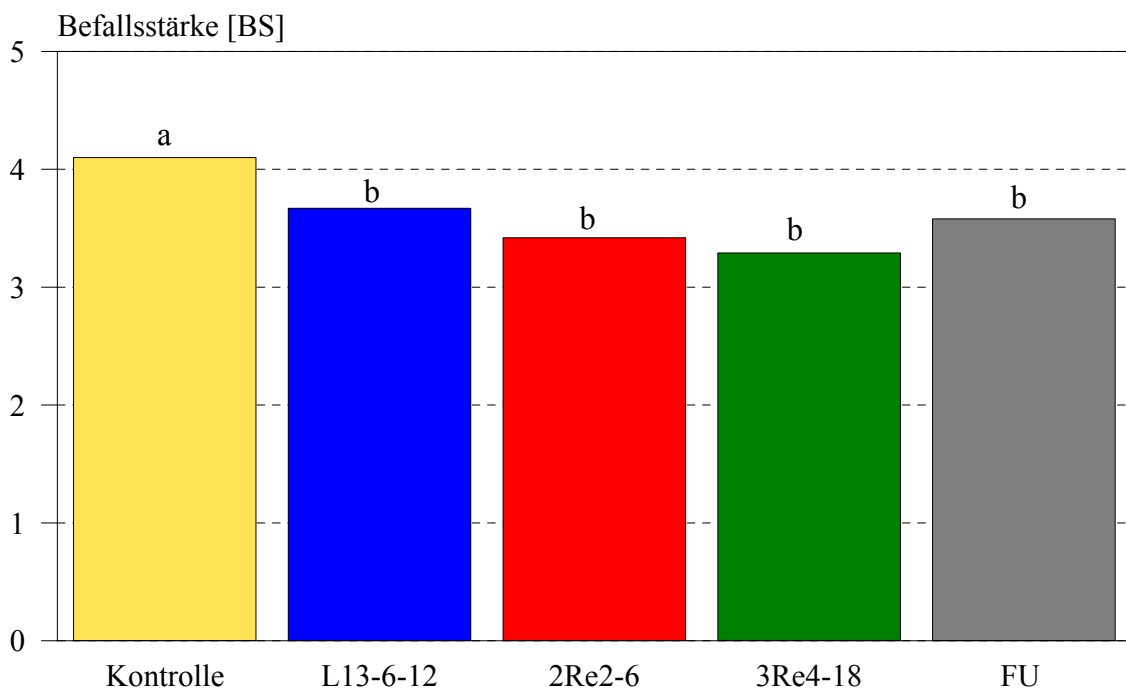
Variante	Standort Golzow				Standort Großbeeren	
	TM g/Pfl.	[%]	TM g/Pfl.	[%]	TM g/Pfl.	[%]
	1x Appl.		2x Appl.		2x Appl.	
Kontrolle	18.8 a	100	18.8 a	100	27.1 a	100
L13-6-12	22.7 b	120.7	23.1 b	122.5	29.3 a	108.4
2Re2-6	23.4 b	124.5	22.8 b	121.4	27.5 a	101.4
3Re4-18	24.7 b	131.4	23.7 b	126.3	29.8 a	110.2
Fungizid	19.9 a	105.8	22.5 b	119.4	25.6 b	94.7

- Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Varianten unterscheiden sich nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle nach dem Tukey-Test, P=0.05.

In der unbehandelten Kontrolle bestanden auf beiden Standorte keine deutlichen Unterschiede in der Befallsstärke (BS) (Abb. 16). Gesunde Pflanzen waren auf beiden Standorten nicht zu beobachten, ausgenommen die zweimalige Applikation des Fungizids auf dem Standort Golzow (Abb. 17). In allen Behandlungsvarianten konnte eine signifikante Reduktion der BS



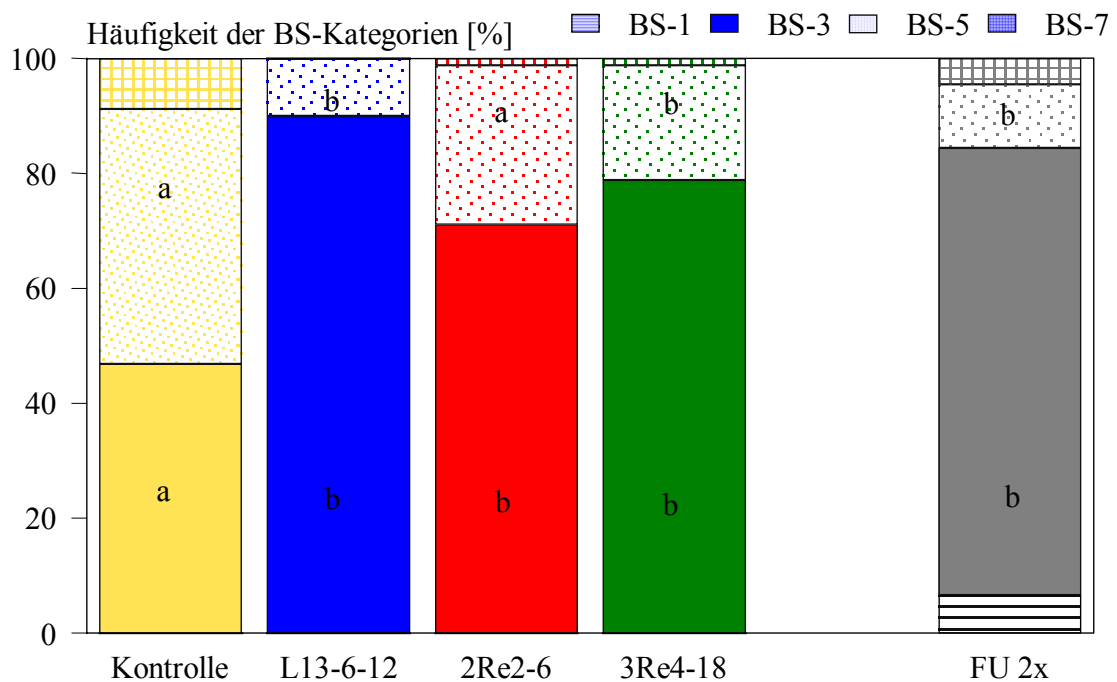
**A**



**B**

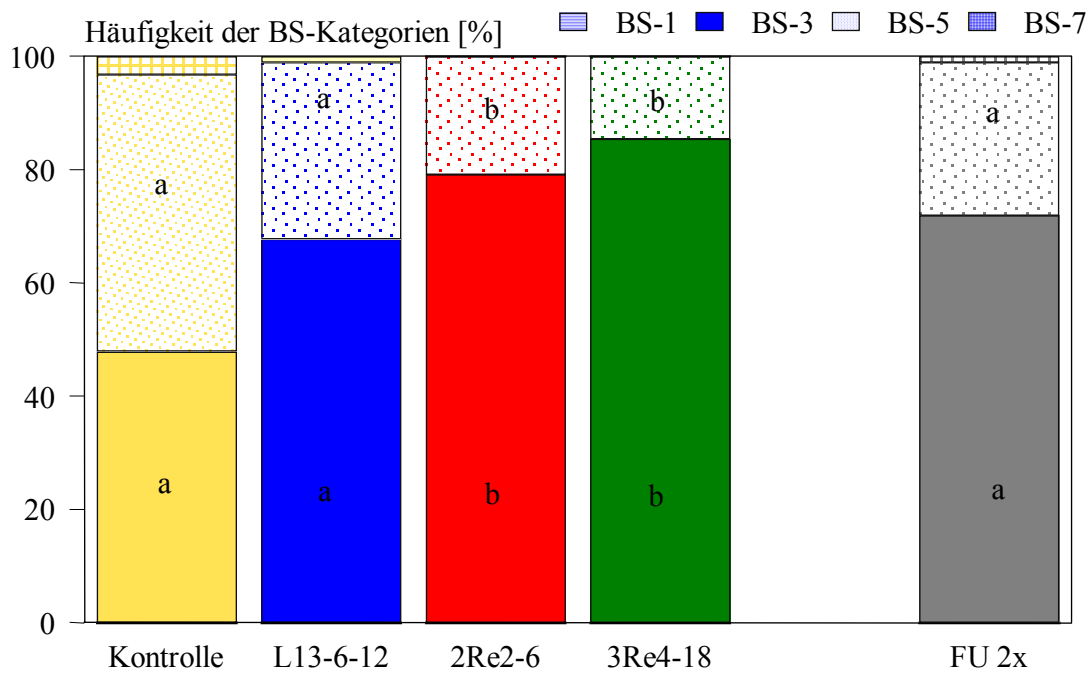
Abb. 16: Befallsstärke von Salat 'Nadine' im Feld (natürlich mit *R. solani* infiziert) nach Behandlung mit bakteriellen BCAs (L13-6-12, *Pseudomonas putida*, 2Re2-6, *P. fluorescens* und 3Re4-18, *Serratia plymuthica*) und einem Fungizid (BASF 516, FU) auf den Standorten Golzow (A) und Großbeeren (B). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Varianten unterscheiden sich nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle nach dem Tukey-Test,  $P = 0.05$ .

erreicht werden. Keine höhere Effektivität in der Krankheitsunterdrückung war nach zweimaliger Behandlung mit den BCAs festzustellen. Nach zweimaliger Applikation des Fungizids war die BS stärker reduziert. Die Reduktion der BS in den Behandlungsvarianten war insbesondere durch signifikante Erhöhung des Anteils leicht befallener Pflanzen gegeben, ausgenommen die Variante L13-6-12 in Großbeeren. Auf beiden Standorten war in allen ermittelten Parametern nach Behandlung mit den bakteriellen BCAs eine der zweimaligen Fungizidbehandlung vergleichbare oder bessere Wirksamkeit gegeben.



A





## B

Abb. 17: Prozentuale Häufigkeit der Befallsklassen (BS) der Salatfäule an Kopfsalat 'Nadine' nach zweimaliger Behandlung mit bakteriellen BCAs (L13-6-12, *Pseudomonas putida*, 2Re2-6, *P. fluorescens* und 3Re4-18, *Serratia plymuthica*) oder einem Fungizid (BASF 516, FU 2x), auf den Standorten Golzow (A) und Großbeeren (B). Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Varianten unterscheiden sich nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle nach dem Tukey-Test,  $P = 0.05$ . (BS1 = Pflanzen gesund, BS-3 = leichter Befall, BS-5 = starker Befall, BS-7 = gesamte Fäule des Kopfes)

### 3.6.2 Prüfung der antifungalen Wirkung an Kartoffel

Zur Prüfung der krankheitsunterdrückenden Wirkung der bakteriellen BCAs L13-6-12, *Pseudomonas putida*, 2Re2-6, *P. fluorescens* und 3Re4-18, *Serratia plymuthica* wurde eine zweimalige Applikation durchgeführt. Deutliche Unterschiede in der Auflafrate konnten bei Vergleich der Varianten nicht festgestellt werden (Tab. 14). Insgesamt war 4 Wochen nach der Pflanzung eine Auflafrate von 98.5 bis 100 % gegeben.

Tab. 14: Auflauftrate der Kartoffel (cv. Exquisa) nach Behandlung der Pflanzknollen mit bakteriellen BCAs (L13-6-12, *Pseudomonas putida*, 2Re2-6, *P. fluorescens* und 3Re4-18, *Serratia plymuthica*), kultiviert im Feld, ohne und nach zusätzlicher Inokulation mit *R. solani* (R.s., Isolat Ben 3).

Variante	Auflauftrate zu den einzelnen Terminen		
	10.06.	17.06.	15.07.
Kontrolle	3.5 a	19.5 a	20.7 a
L13-6-12	4.2 a	19.5 a	21.0 a
2Re2-6	3.8 a	20.5 a	21.0 a
3Re4-18	5.8 a	19.7 a	20.8 a
<i>R. solani</i>	3.7 a	19.8 a	20.7 a
L13-6-12 +R.s.	3.2 a	19.7 a	21.0 a
2Re2-6 +R.s.	2.8 a	20.0 a	20.8 a
3Re4-18 +R.s.	3.3 a	18.7 a	20.8 a

- Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Varianten unterscheiden sich nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle nach dem Krauskal-Wallis Test,  $P < 0.05$ .

Zum Zeitpunkt der Ernte war auch ein Befall der Knollen mit Sklerotien von *R. solani* in den Varianten festzustellen, die nicht zusätzlich mit *R. solani* inokuliert wurden (Tab. 15). Durch die zusätzliche Inokulation von *R. solani* war eine um 46 % signifikant höhere BS gegeben, die zu einer signifikanten Reduktion des vermarktungsfähigen Knollenertrages um 21 % führte. Durch die Behandlung mit den bakteriellen BCAs konnten die Ertragsverluste um 8 bis 12 % reduziert werden. In den Varianten ohne zusätzliche Inokulation mit *R. solani* wurde ein höherer Knollenertrag nach Behandlung mit den BCAs L13-6-12 und 3Re4-18 von 6 und 2 % ermittelt.

Tab. 15: Vermarktungsfähiger Knollenertrag (KE) und Befallsstärke (BS) von *R. solani* an Kartoffelknollen (cv. Exquisa) nach Behandlung der Pflanzknollen mit bakteriellen BCAs (L13-6-12, *Pseudomonas putida*, 2Re2-6, *P. fluorescens* und 3Re4-18, *Serratia plymuthica*), kultiviert im Feld, ohne und nach zusätzlicher Inokulation mit *R. solani* (Isolat Ben 3).

Variante	KE [kg]	KE [%]	BS	BS [%]	BS [%]
Kontrolle	8.7 a	100	2.05 a	100	68.5
L13-6-12	9.2 a	106	1.43 b	69.7	47.8
2Re2-6	8.7 a	100	1.39 b	67.8	46.5
3Re4-18	8.8 a	102	1.45 b	70.7	48.5
<i>R. solani</i>	6.9 b	79	2.99 c	145.9	100
L13-6-12 +R.s.	7.5 a	87	2.11 a	102.9	70.5
2Re2-6 +R.s.	7.3 b	85	2.30 d	112.2	76.9
3Re4-18 +R.s.	7.9 b	91	2.33 ad	113.6	77.9

- Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Varianten unterscheiden sich nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle nach dem Krauskal-Wallis Test,  $P < 0.05$ .
- Knollenbonitur: BS-1 = kein Besatz, BS-2 = < 1%, BS-3 = 1-5%, BS-4 = > 5%

In den Varianten, behandelt mit den BCAs und ohne zusätzliche Inokulation mit *R. solani* wurde im Vergleich zur Kontrolle ein Anteil von nicht befallenen Kartoffelknollen von im Durchschnitt 60 % ermittelt, während in der Kontrolle nur ca. 20 % der Knollen befallsfrei waren (Abb. 18 A). Nach zusätzlicher Inokulation von *R. solani* waren in der Kontrollvariante (*R. solani*) kaum befallsfrei Knollen zu verzeichnen, deren Anteil sich signifikant erhöhte nach Behandlung mit den bakteriellen BCAs (Abb. 18 B). In den Varianten mit zusätzlicher Inokulation war der Anteil an Knollen mit geringem Befall (<1%) in den Varianten mit den BCAs mit 40-50 % signifikant deutlich höher im Vergleich zu 25 % in der Kontrollvariante (*R. solani*).

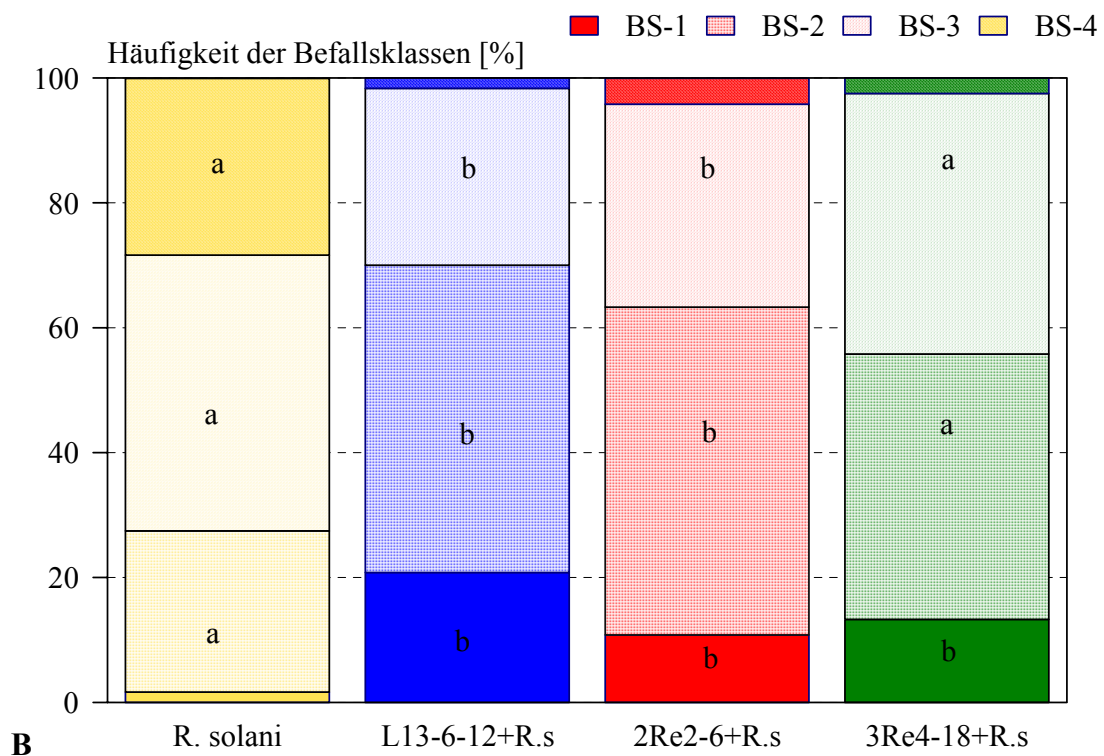
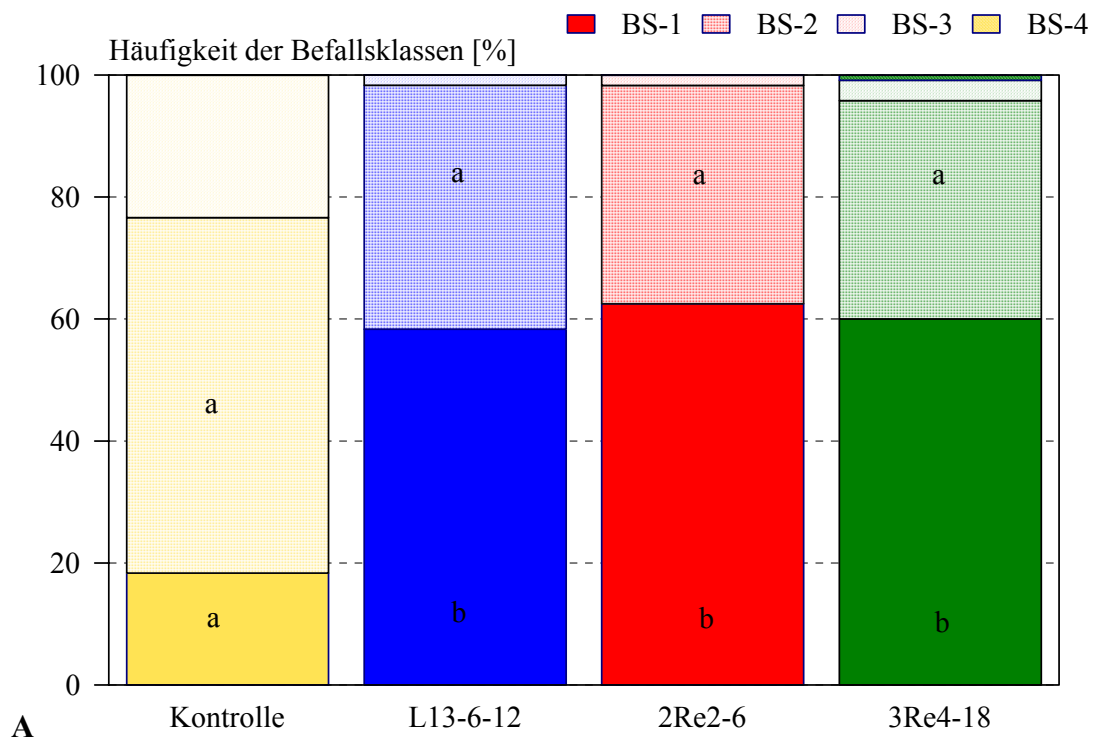


Abb. 18: Prozentuale Häufigkeit der Befallsklassen (BS) von *R. solani* an Kartoffelknollen (cv. Exquisita) nach Behandlung der Pflanzknollen mit bakteriellen BCAs (L13-6-12, *Pseudomonas putida*, 2Re2-6, *P. fluorescens* und 3Re4-18, *Serratia plymuthica*), kultiviert im Feld, A ohne und B nach zusätzlicher Inokulation mit *R. solani* (Isolat Ben 3). Mit gleichen Buch-

staben gekennzeichnete Varianten unterscheiden sich nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle nach dem Tukey-Test,  $P = 0.05$ . (BS1 = kein Besatz, BS-2 = < 1%, BS-3 = 1 – 5 %, BS-7 = > 5 % Sklerotienbesatz)

## 4 Diskussion

Die in dieser Studie angewandte Methodik zur Selektion effektiver Antagonisten gegen *Rhizoctonia solani* erwies sich als sehr erfolgreich. Mit hierarchisch aufeinander abgestimmten Tests wurden am Ende sowohl bei den bakteriellen als auch bei den pilzlichen Isolaten geeignete Kandidaten für die Entwicklung zum biologischen Präparat selektiert. Die ausgewählten bakteriellen BCAs L13-6-12, *Pseudomonas putida*, 2Re2-6, *P. fluorescens* und 3Re4-18, *Serratia plymuthica* zeigten an den Pathosystemen Kartoffel/*R. solani*, Salat/*R. solani* und Zuckerrübe/*R. solani* wiederholt krankheitsunterdrückende Wirkungen unter kontrollierten Bedingungen, die jeweils begünstigend für die Entwicklung von *R. solani* waren. Die Prüfung der BCAs an verschiedenen Pathosystemen soll sicher stellen, dass die BCAs in der Praxis an verschiedenen Kulturen angewendet werden können und nicht nur gegen *R. solani* an einer Kultur wirksam sind. In ersten Feldversuchen konnten sowohl an Kartoffeln als auch an Salat die krankheitsunterdrückenden Effekte der bakteriellen BCAs L13-6-12, 2Re2-6 und 3Re4-18 gegen *R. solani* bestätigt werden.

Die *in vitro*-Screeningbedingungen wurden so ausgerichtet, dass die selektierten Mikroorganismen den zu erwartenden ökologischen Ansprüchen gerecht werden. So wurde insbesondere beim Screening der pilzlichen Organismen berücksichtigt, dass sie eine antifungische Aktivität auch unter bodenrelevanten Temperaturen entfalten. Die pilzlichen BCAs sollen vor allem im Boden gegen *R. solani* antifungisch aktiv sein können. Der Erreger *R. solani* kann jahrelang in Form von Sklerotien im Boden überdauern. Daher sollen die pilzlichen BCAs in der Lage sein sowohl die Dauerorgane als auch das auskeimende Myzel des Erregers zu parasitieren. Der Einfluss auf die Keimung der Sklerotien bzw. die Parasitierung des Myzels war daher ein entscheidendes Selektionskriterium für die pilzlichen BCAs. Die auf der Basis der *in vitro* Ergebnisse ausgewählten pilzlichen BCAs P2, P3, P4, P9, P10 und P11 (*Trichoderma* spp.) zeigten sowohl an der Kartoffel als auch an Salat signifikante krankheitsunterdrückende Effekte. An Kartoffeln war eine signifikante Reduktion des Befalls der Kartoffelkeime mit *R. solani* selbst bei einem sehr hohen Befallsdruck gegeben. In der Praxis würden Kartoffelknollen mit einem Besatz an Sklerotien von 10 % normalerweise nicht als Pflanzkartoffeln ver-

wendet, so dass bei latentem Befall der Knollen mit *R. solani* eine Krankheitsunterdrückung durch Behandlung mit effektiven pilzlichen BCAs gegeben sein müsste. In unseren Versuchen wurde die Wirkung der BCAs nach künstlicher Inokulation mit *R. solani*, unter Bedingungen die in kurzer Zeit einen sichtbaren Befall der Keime ermöglichten. Keine Informationen stehen zu gegebenen Erregerdichten unter Praxisbedingungen zur Verfügung sowie deren Relevanz auf den Ertrag. So ist auch die Bedeutung des latenten Befalls der Kartoffelknollen mit *R. solani* für die Praxis unklar. In den Gefäßversuche konnten wir immer wieder einen Befall der Keime mit *R. solani* in der Kontrollvariante beobachten, die nicht mit *R. solani* künstlich inokuliert wurde. In diesen Fällen muss der Befall von einer nicht sichtbaren Infektion der Knollen ausgegangen sein. Die Ergebnisse der Feldversuche zeigen, dass der Befall mit *R. solani* sowohl an Salat als auch an der Kartoffel zu Ertragseinbußen führt. Die Reduktion des Knollenertrages der Kartoffel korreliert hierbei mit der Befallsstärke. In den Feldversuchen wurden die bakteriellen BCAs als reine Zellsuspensionen eingesetzt. Durch Formulierung der BCAs kann deren Wirkung optimiert werden, zum einen durch Verbesserung der Starbedingungen nach der Applikation und zum anderen durch entsprechende Zusätze, welche die Bildung der Metabolite, die für die krankheitsunterdrückenden Effekte von Bedeutung sind, begünstigen. Bei den durchgeführten Feldversuchen ist auch zu berücksichtigen, dass Aufwandmenge, Applikationshäufigkeit und Applikationszeitpunkt für eine optimale Wirkung der BCAs nicht getestet wurden. Die Applikation orientierte sich an Erfahrungen, wurde jedoch für keines der drei bakteriellen BCAs in Vorversuchen geprüft.

An Salat wurde die Wirksamkeit nach einmaliger und zweimaliger Applikation am Standort Golzow getestet. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass keine Unterschiede in der Wirksamkeit nach einmaliger und zweimaliger Applikation gegeben waren. Nach einmaliger Applikation waren im Vergleich zur zweimaligen Applikation vergleichbare krankheitsunterdrückenden Effekte zu beobachten. Der Versuch wurde nicht orthogonal angelegt, so dass keine Aussage dazu gemacht werden kann, ob die zweite Applikation überhaupt einen krankheitsunterdrückenden Effekt bewirkte. Bei der zweiten Applikation wurden die Zellsuspensionen der bakteriellen BCAs auf die Bodenoberfläche gesprüht. Es ist zu vermuten, dass in der durchgeführten Weise, die Bakterien keine ausreichende Aktivität gegen *R. solani* entfalten konnten. Dies gilt auch für die durchgeführte zweite Applikation an der Kartoffel. Auch hier ist nicht sicher, ob der gewählte Zeitpunkt die Besiedlung der Kartoffelkeime oder –wurzel mit den BCAs positiv beeinflusste oder ob im Endeffekt nur die Applikation der Kartoffelknollen zum tragen kam. Möglich ist auch, dass die bakteriellen BCAs eine Wirkung vor allem über die Pflanze induzieren. Sowohl an Salat als auch an der Kartoffel war eine Verbesse-

rung des Ertrages bzw. des Pflanzenwachstums zu beobachten. Insofern hätte eine zweite Applikation direkt an die Pflanze erfolgen müssen. Durch Kombination verschiedener Wirkmechanismen, wie erhöhte Widerstandsfähigkeit der Pflanze gegenüber *R. solani* durch Applikation bakterieller BCAs und Einsatz pilzlicher BCAs, die den Erreger direkt im Boden bekämpfen, könnte eine effektive Krankheitskontrolle erzielt werden.

In der vorliegenden Studie konnte jedoch eine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen der *in vitro*-Tests und der Wirkung an den Pflanzen gezeigt werden. Ähnlich positive Ergebnisse erhielten Knudsen et al. (1997) durch die Adaptation von Screeningverfahren, obwohl die Mehrzahl der Studien Diskrepanzen in der *in vitro* und *ad planta* Wirkung aufzeigten (Weller & Cook 1983, Reddy et al. 1993).

Die Einbeziehung molekularer Methoden erwies sich als vorteilhaft um einerseits die Arbeit bei der Selektion der Isolate zu reduzieren (Vermeidung der Mehrfachtestung bei genetisch identischen Isolaten). Des weiteren ist der Nachweis eines individuellen „genetischen Fingerabdruckes“ Voraussetzung für die Patentierung und Qualitätssicherung von Biological Control Agents (BCAs).

Oftmals werden bei Screeningverfahren zur Selektion von Antagonisten nur die Wechselwirkungen zwischen Pathogen und Antagonist betrachtet (z. B. Dualkulturtest). Die Kenntnisse der Interaktionen zwischen den BCAs und der behandelten Pflanze sind jedoch auch von sehr großer Bedeutung, da vor allem Dosis-abhängige Effekte auf die Pflanzenentwicklung bekannt sind (Suckstorff & Berg 2003). Mit dem in dieser Studie entwickelten Keimlingstest wurde somit ein Beitrag geleistet, um auch die Interaktionen zwischen der Pflanze und den bakterielle Antagonisten zu bewerten und so Hinweise für die spätere Applikationsmenge zu bekommen.

Die genaue Identifizierung der BCAs ist für eine spätere Zulassung als Präparat von großer Bedeutung. Neben Methoden die auf physiologischen oder zellspezifischen Parametern beruhen (API, BIOLOG, FAME), stellt die Sequenzierung der 16S rDNA die Methode der Wahl für die Identifizierung von Bakterien dar. Die rechtzeitige und genaue Identifizierung der BCAs ist vor allem in Hinblick auf die Risikobeurteilung wichtig. Es konnte z. B. bei dem Isolat 3Rc3 festgestellt werden, dass es sich um ein Pathogen des Champignons handelt und dieses wurde somit von der weiteren Prüfung ausgeschlossen. Voraussetzung für die Evaluation eines Bakterienisolates als BCA ist, dass von dem Organismus kein Risiko für die menschliche Gesundheit und die Umwelt ausgeht. Für die Identifizierung von Pilzen stellt die Sequenzierung der 18S rDNA ebenfalls eine sehr moderne Methode dar. Neben der morphologischen Charakterisierung wurden so ausgewählte Pilzisolat eindeutig identifiziert und Or-

ganismen, die nicht eindeutig der Risikoklasse I zugeordnet werden können, wie die Bakterienisolate 3Re2-7 und 4Rx13 wurden aus weiteren Versuchen heraus genommen. Die Arbeiten der Identifizierung und der Prüfungen *in vivo* unter kontrollierten Bedingungen wurden z.T. parallel durchgeführt, so dass die genannten Isolate aufgrund ihrer guten Wirkung gegen *R. solani* in den ersten Versuchen wiederholunt untersucht wurden. In die Prüfung unter Feldbedingungen wurden jedoch nur BCAs der Risikoklasse I einbezogen, die für die Umwelt unbedenklich sind. Eine ökologische Unbedenklichkeit der letztlich selektierten bakteriellen und pilzlichen BCAs ist damit gewährleistet.

#### **4.1 Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse für den ökologischen Landbau**

Die Ergebnisse der Arbeiten haben gezeigt, dass durch die Anwendung von bakteriellen und pilzlichen BCAs der Krankheitsentwicklung durch *R. solani* an Kartoffel, Salat und der Zuckerrübe entgegen gewirkt werden kann. Insofern kann die Anwendung von BCAs auf mikrobieller Basis Teil einer Bekämpfungsstrategie gegen *R. solani* an verschiedenen gartenbaulichen oder landwirtschaftlichen Kulturen sein. Die geprüften BCAs wurden in den durchgeführten Versuchen nicht optimal eingesetzt. Die Anwendung beruhte auf Erfahrungen. Trotz des Wissens, dass die Wirksamkeit von Isolaten sich in Abhängigkeit von der Zellzahl und Applikationshäufigkeit deutlich unterscheiden kann, wurde die Applikation für alle Isolate in gleicher Weise gehandhabt. Insofern kann die Wirksamkeit durch eine optimale Anwendung sowie Formulierung verbessert werden. Die optimale Applikationsmenge und –häufigkeit ist unter Feldbedingungen zu evaluieren.

Aus dem gegenwärtigen Stand der Arbeiten ergibt sich kein direkter Nutzen für den ökologischen Landbau. Dies wäre erst möglich, wenn die effektivsten BCAs als formulierte Produkte der Praxis zur Verfügung gestellt werden. Die ausgewählten BCAs, wurden aus natürlichen Habitaten isoliert und durch die taxonomische Charakterisierung der Isolate ist sicher gestellt, dass diese für Mensch und Umwelt unbedenklich sind. Erfahrungen für die Formulierung von derartigen Isolaten liegen bei den Firmen e-nema (Gesellschaft für Biotechnologie und biologischen Pflanzenschutz mbH) und ProPhyta GmbH vor, so dass die Voraussetzungen, der Praxis einfach handhabbare Produkte zur Verfügung zu stellen, gegeben sind.



## 5 Zusammenfassung

*Rhizoctonia solani* Kühn ist ein weitverbreiteter bodenbürtiger Erreger, der aufgrund seiner sowohl saprophytischen als auch parasitischen Eigenschaften sowie seiner persistenten Dauerorgane (Sklerotien) schwer zu bekämpfen ist. Seine Fähigkeit auch an Nichtwirtspflanzen seinen Lebenszyklus vollenden zu können, erschwert die Kontrolle über Fruchtfolgen. Probleme durch *R. solani* treten im ökologischen Anbau vor allem an Kartoffeln auf. Derzeit stehen dem ökologischen Anbau keine geeigneten Strategien zur Bekämpfung des Erregers zur Verfügung. Ziel des Projektes ist daher die Entwicklung einer biologischen Methode zur Kontrolle des Erregers auf der Basis eines bakteriellen und pilzlichen Antagonisten. Durch Einsatz eines bakteriellen Antagonisten soll die Widerstandsfähigkeit der Pflanze gegenüber *R. solani* erhöht und durch Anwendung eines pilzlichen Antagonisten die Dauerorgane im Boden oder an Kartoffelknollen bekämpft werden.

Im Rahmen des Projektes wurden 440 bakterielle und 390 pilzliche Isolate auf der Basis eines hierarchischen Screeningschemas aus verschiedenen *in vitro* und *ad planta* Methoden hinsichtlich ihrer Eignung als Biological Control Agents (BCAs) zur Kontrolle von *R. solani* geprüft. Insgesamt konnten durch *in vitro* Untersuchungen 18 bakterielle und 12 pilzliche Isolate mit effizienter antifungischer Wirkung gegen das Zielpathogen selektiert werden. Ihre Wirkung wurde bislang an natürlich mit *Rhizoctonia*-Sklerotien infizierten Kartoffelknollen, künstlich infizierten Kartoffelknollen sowie Salatpflanzen und Zuckerrübensämlingen unter krankheitsbegünstigenden Bedingungen geprüft. In diesen Versuchen zeigten insbesondere die bakteriellen BCAs L13-6-12, *Pseudomonas putida*, 2Re2-6, *P. fluorescens* und 3Re4-18, *Serratia plymuthica* und die pilzlichen BCAs P2, P3, P4, P9, P10 und P11 (*Trichoderma* spp.) eine wiederholte, signifikante krankheitsunterdrückende Wirkung, z. B. bis zu 60 % durch B1 oder über 50 % durch P11 an Kartoffelkeimlingen. Das Myzel von *R. solani* wird von den pilzlichen Antagonisten parasitiert und die Sklerotienkeimung vollständig gehemmt. Die Ergebnisse erster Feldversuche mit den bakteriellen Antagonisten L13-6-12, 2Re2-6 und 3Re4-18 an Kartoffel und Salat bestätigten deren krankheitsunterdrückende Wirkung.

Durch Formulierung des gegen *R. solani* wirksamsten bakteriellen und pilzlichen BCA können dem ökologischen Landbau Präparate zur Bekämpfung von *R. solani* zur Verfügung gestellt werden. Gemeinsam mit verschiedenen Unternehmen (e-nema Gesellschaft für Biotechnologie und biologischen Pflanzenschutz mbH, ProPhyta GmbH, KWS AG) sind geeignete Formulierungen zu entwickeln, die eine optimale Wirksamkeit gegen den Erreger gewährleisten. In Zusammenarbeit mit Betrieben des ökologischen Landbaus ist die optimale Appli-

kationsdichte und –häufigkeit der formulierten BCAs unter praxisrelevanten Bedingungen zu evaluieren. Bei der Beurteilung der Wirksamkeit sind sowohl Standortbedingungen (Bodeneigenschaften, Witterungsbedingungen) als auch die Ausgangsbelastung des Pflanzgutes (Kartoffel) zu berücksichtigen.

Mit diesen Kooperationen können dem ökologischen Landbau schnellstmöglich geeignete Präparate zur Kontrolle von *R. solani* zur Verfügung gestellt werden.

## **6 Gegenüberstellung der geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen**

### **Evaluation der ausgewählten BCAs unter kontrollierten Bedingungen**

- Von den geplanten Arbeiten konnten an der Kartoffel unter kontrollierten Bedingungen aufgrund der Verfügbarkeit von Kartoffelknollen nur bis Juni 2003 Versuche durchgeführt werden. Die Verwendung von frischen Kartoffelknollen war aufgrund der Keimruhe nicht möglich.
- Die krankheitsunterdrückende Wirkung der pilzlichen BCAs an der Zuckerrübe war aufgrund des Pathogenitätsverlustes des verwendeten Isolates nicht möglich. Es wurden zwei versuche mit unterschiedlicher Inokulumdichte durchgeführt, die keine Aussagen ermöglichen. Die Versuche sind mit einem neuen pathogenen Isolat zu wiederholen.
- Der Einfluss der selektierten BCAs auf das Pflanzenwachstum war aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

### **Evaluation der ausgewählten BCAs unter kontrollierten Bedingungen**

- Die Prüfung der pilzlichen BCAs unter kontrollierten Bedingungen war mit Beginn der jeweiligen Anbauperiode von Salat und Kartoffel noch nicht abgeschlossen, so dass noch keine entsprechende Auswahl an BCAs zur Prüfung unter Feldbedingungen vorgenommen werden konnte.

## 7 Literaturverzeichnis

- Berg, G. 2000. Diversity of antifungal and plant-associated *Serratia plymuthica* strains. *J. Appl. Microbiol.* 88: 952-60.
- Berg G., Fritze A., Roskot N., Smalla K. 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *J Appl Microbiol.* 91:963-71.
- Benker, M. und G. Büttner. 2000. Rhizoctonia-Resistenz bei Zuckerrüben – Prüfverfahren und erste Ergebnisse. *Proceedings of the 63rd IIRB Congress, Interlaken: 257-266.*
- Chet, I., Ordentlich, A., Shapira, R. and A. Oppenheim. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and Soil* 129: 85-92.
- Chet, I. 1987. Trichoderma – application, mode of action, and potential as a bio-control of soil-borne plant pathogenic fungi. In: *Innovative Approaches to Plant Disease control* (Chet, I., Ed.), pp. 137-160. Wiley, New York.
- Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 75-91.
- Gupta, V. P., Tewari, S. K. Govindaiah and A. K. Bajpai 1999. Ultrastructure of Mycoparasitism of *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Laetisaria* Species on *Botryodiplodia theobromae*, *J. Phytopathol.* 147, 19-24.
- Govan, J. R. W., Balendreau, J. and P. Vandamme. 2000. *Burkholderia cepacia* – friend and foe. *ASM News* 66: 124-125.
- Knudsen, I.M.B., Hockenhull, J., Funk Jensen, D., Gerhardson, B., Hökeberg, M., Tahvonen, R., Teperi, E., Sundheim, L. and Henriksen, B. 1997. Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. *European. J. of Plant Pathol.*, 103: 775-784.
- Kurze, S., Dahl, R., Bahl, H. and Berg, G. 2001. Biological control of soil-borne pathogens in strawberry by *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Plant Disease* 85, 529-534.
- Lewis J. A. und M. M. Kulik 1996. Introduced biocontrol agents to suppress diseases caused by *Rhizoctonia*. In: Sneh B., Jabaji-Hare S., Neate S.M. and Dijst G. (eds.) *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology; Pathology and Control* (pp 37-43) Kluwer, Dordrecht

- Marten, P., Brückner, S. und G. Berg 2001. Biologischer Pflanzenschutz mit Rhizobakterien – eine umweltfreundliche Alternative zur Kontrolle boden- und samenbürtiger Pilze. *Gesunde Pflanzen* 53: 224-234.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D. A., Boulnois, G. J., Claverys, J.-P. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 20, 3479-3483.
- Rademaker, J. L. W., and F. J. De Bruijn. 1997. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: *DNA markers: Protocols, Applications and Overviews*. (Caetano-Anollés G. and P. M. Gresshoff, eds.) J. Wiley & Sons, Inc.
- Reddy, M.S., Hynes, R.K. and Lazarovits, G. 1993. Relationship between *in vitro* growth inhibition of pathogens and suppression of preemergence damping-off and postemergence root rot of white bean seedlings in the greenhouse by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 40, 113-119.
- Schönbeck, F. 1998. Induced Resistance - A Phytomedical Progress? 51, *Deutsche Pflanzenschutztagung Halle, Mitt. a. d. Biol. Bundesanst.* 357: 147.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. (1994) A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 846-849
- Suckstorff, I. and Berg, G. (2003) Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. *J Appl Microbiol.* 95: 656-63.
- Weller, D.M. and Cook, R. (1983) Suppression of take-all of wheat by seed-treatment with fluorescent pseudomonads. *Phytopathol.* 73, 463-469.
- Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.
- Weller D.M., Raaijmakers J.M., Gardener B.B., Thomashow L.S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:309-48.
- Wolf, P. F. J. und J.-A. Verreet. 1999. Untersuchungen zur Epidemiologie und Schadrelevanz der Rhizoctonia-Rübenfäule (*Rhizoctonia solani* Kühn). *Gesunde Pflanzen* 51 (5): 133-140.