



UFOP-SCHRIFTEN | AGRAR

ABSCHLUSSBERICHT

Biologische Kontrolle der Kohlhernie in resistenten und anfälligen
Rapssorten durch endophytische Pilze

Autoren

Nazanin Zamani-Noor, Julius Kühn-Institut Braunschweig
Jutta Ludwig-Müller, Technische Universität Dresden

Biologische Kontrolle der Kohlhernie in resistenten und anfälligen Rapsorten durch endophytische Pilze

Nazanin Zamani-Noor¹ und Jutta Ludwig-Müller²

¹Julius Kühn-Institut Braunschweig

²Technische Universität Dresden

Einleitung und Aufgabenstellung

Die Kohlhernie ist weltweit eine der Pflanzenkrankheiten, die zu sehr hohen Ernteverlusten führen. Die Rapsanbaufläche hat in Deutschland in den vergangenen Jahren bis auf die letzten stetig zugenommen. Durch diese Intensivierung treten verstärkt Fruchtfolgekrankheiten auf. Dazu gehört u. a. die Kohlhernie, die auch in Deutschland in immer größeren Arealen auftritt und die vom bodenbürtigen Parasiten *Plasmodiophora brassicae* verursacht wird. Der Anbau von Raps wird durch unterstützende Maßnahmen wie Kalkung verbessert. Die Kalkung wird vom Boden-pH abhängig gemacht und ist in Abhängigkeit vom Boden-pH in bestimmten Abständen (mehrere Jahre) notwendig. Während die konventionellen Maßnahmen zur Eindämmung der Kohlhernie stark von Umweltfaktoren abhängig sind, ist der Anbau von resistenten Sorten basierend auf ‚Mendel‘ unabhängig von solchen Faktoren und daher immer weiter verbreitet. Aber auch auf ‚Mendel‘ kommt es zur Entwicklung von Kohlhernie-Gallen. Neue Pathotypen von *P. brassicae*, die sich in den letzten Jahren auf ‚Mendel‘ entwickeln konnten, sind das neue, große Problem.

Generell ist die Herstellung resistenter Sorten langwierig. Es gibt für Raps nur sehr limitierte genetische Ressourcen als Kohlhernieresistenz und die Einkreuzung aus naheverwandten Arten ist durch Barrieren nicht gut möglich, sodass hier nur die ‚Mendel‘-basierende Resistenz zum Einsatz kommt. In Kombination mit endophytischen Pilzen, die pflanzlichen Abwehrreaktionen induzieren können und allgemein das Pflanzenwachstum verbessern, können die Belastungen im Wurzelbereich durch den Erreger reduziert werden. Außerdem wurde eine allgemeine Verbesserung des Rapswachstums beobachtet (Auer und Ludwig-Müller 2014), sodass „Resistenzeffekte“ (die Beobachtung, dass der Ertrag bei resistenten Pflanzen geringer ist als bei anderen Sorten) auch reduziert werden können. Eine Anwendung von endophytischen Pilzen bei anderen Rapsorten mit ökonomischer Bedeutung oder auch im Gemüsekohlanbau ist natürlich auch möglich.

Kontrollmechanismen für die Kohlhernie im Feld zeichnen sich durch teilweise nur schlecht wiederholbare Effekte aus und sind immer abhängig von der Boden- und Wettersituation. Daher sind die Ergebnisse nicht immer vorhersehbar und bei Kombinationen, die die Etablierung und Ausbreitung der Kohlhernie fördern werden, große Teile eines befallenen Feldes in Mitleidenschaft gezogen. Aus diesen Gründen wird verstärkt auf Kohlhernie-resistente Sorten zurückgegriffen, die bei Raps alle auf der Resistenz der Sorte ‚Mendel‘ beruhen. In dieser Studie wird die Sorte ‚Mentor‘ verwendet. Diese Konzentration auf eine Resistenz führte in der jüngsten Vergangenheit dazu, dass sich neue virulente *P. brassicae* Isolate entwickeln konnten. Diese Tendenz ist in Deutschland, aber auch weltweit, z.B. in Kanada, beobachtet worden. Diese neuen virulenten Isolate sind auch hochvirulent auf anfälligen Raps-Sorten wie z.B. ‚Visby‘. Da insbesondere die Erhaltung der

Resistenz gegen die Kohlhernie gewährleistet werden soll, ist das Einbeziehen der resistenten Hybridsorte ‚Mentor‘ für die Durchführung der Experimente essentiell. In den letzten Jahren wurden sowohl Bakterien als auch Pilze auf ihr Biokontrollpotential getestet. Für Bakterien gibt es bereits eine auf *Bacillus subtilis* basierende Formulierung auf dem Markt (Serenade), die auch gegen die Kohlhernie getestet wurde, jedoch soweit bekannt nicht im Feld (Lahlali et al. 2011). Endophytische Pilze wurden ebenfalls von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. (Narisawa et al. 2000, Lahlali et al. 2014, Lahlali und Peng 2014). Ein Pilz, *Gliocladium catenulatum*, wird bereits kommerziell eingesetzt (Prestop) (Peng et al. 2011). Wir konnten für den Endophyten *Acremonium alternatum* zeigen, dass er in der Lage ist, den Wirt komplett zu besiedeln, was für die Bekämpfung von Vorteil sein könnte (Jäschke et al. 2010). Außerdem wirken nicht nur der Pilz selber, sondern auch autoklavierte Sporen und Zellwandextrakte (unveröffentlichte Ergebnisse), sodass sich zwei mögliche Ansätze für spätere Formulierungen daraus ergeben können. Die Samenbehandlungen mit Endophyten ist ebenfalls in der Literatur beschrieben (Roberts et al. 2014). Allerdings finden sich, soweit uns dies bekannt ist, bisher keine Angaben darüber, dass neue virulente Erregerstämme mit Endophyten untersucht und bekämpft wurden und ob es da ein Kontrollpotential gibt. Daher ist unser vorgeschlagener Ansatz komplett neu.

In dem Projekt soll das Biokontrollpotential des endophytischen Pilzes *Acremonium alternatum* im Vergleich mit einer anfälligen und einer resistenten Rapsorte sowie verschiedenen virulenten *P. brassicae* Isolaten untersucht werden. Als weiteres Ziel des Projektes sind Ermittlung des Zeitpunktes der Applikation sowie Optimierung der Methoden zur Saatgut-„Beizung“ mit dem Pilz zu nennen. Die Versuche sollen unter zwei unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt werden: 1. Im Gewächshaus und 2. Unter Semi-Feldbedingungen in großen Tischen.

Material und Methoden

Rapsorten, Pathogenisolate und Biokontrollpilz

Die Kohlhernie-anfällige Raps (*Brassica napus*)-Sorte ‚Visby‘ und die resistente Sorte ‚Mentor‘ wurden aus dem Deutschen Saatgutkatalog in 2018 herausgesucht. Sie wurden für alle Versuche des Projektes verwendet. Samen beider Kultivare wurden von der Norddeutschen Pflanzenzucht, Holtsee bezogen.

Zwei Feldisolate von *Plasmodiophora brassicae* wurden auf Grund ihres Verhaltens auf den beiden Rapsorten ausgewählt (Abb. 1); ein Isolat war auf der anfälligen Sorte virulent und auf der resistenten Sorte „Mentor“ avirulent (P1), das zweite auf der Sorte ‚Mentor‘ auch virulent (P1+). Die Isolate wurden nach dem ECD Set als 16/31/12 sowie 17/31/31 und nach Somé et al. als Pathotyp 1 bzw. 1+ klassifiziert (Zamani Noor 2017). Das P1 Isolat stammte aus natürlich infiziertem Boden eines Rapsfeldes aus Hoisdorf, Schleswig-Holstein, in 2012 und das P1+ Isolat stammte ursprünglich von einem Feld in Grävenwiesbach, Hessen, in 2013. Beide Isolate wurden als gefrorene Gallen bei -20°C aufbewahrt und für die Präparation des Inokulums verwendet. Als Kontrolle in einem ersten Versuch wurde an der TU Dresden auch das *P. brassicae* Einsporisolate e3 eingesetzt, das in Vorversuchen mit *A. alternatum* eingesetzt wurde (Auer und Ludwig-Müller 2014, Jäschke et al. 2010). Die Methode war identisch wie für Experiment 1 beschrieben.

Acremonium alternatum ist der in Jäschke et al. (2010) beschriebene Stamm MUCL No. 12012 (Mycothèque de L’Université Catholique de Louvain, Belgien). Das Isolat wurde auf Kartoffel-Dextrose Agar bei 19°C unter Schütteln kultiviert und bei 4°C gelagert, bevor es zur Gewinnung von Inokulum verwendet wurde. Für die Gewinnung von Sporen zur Inokulation war eine Kultivierung von ca. 3 Wochen notwendig.

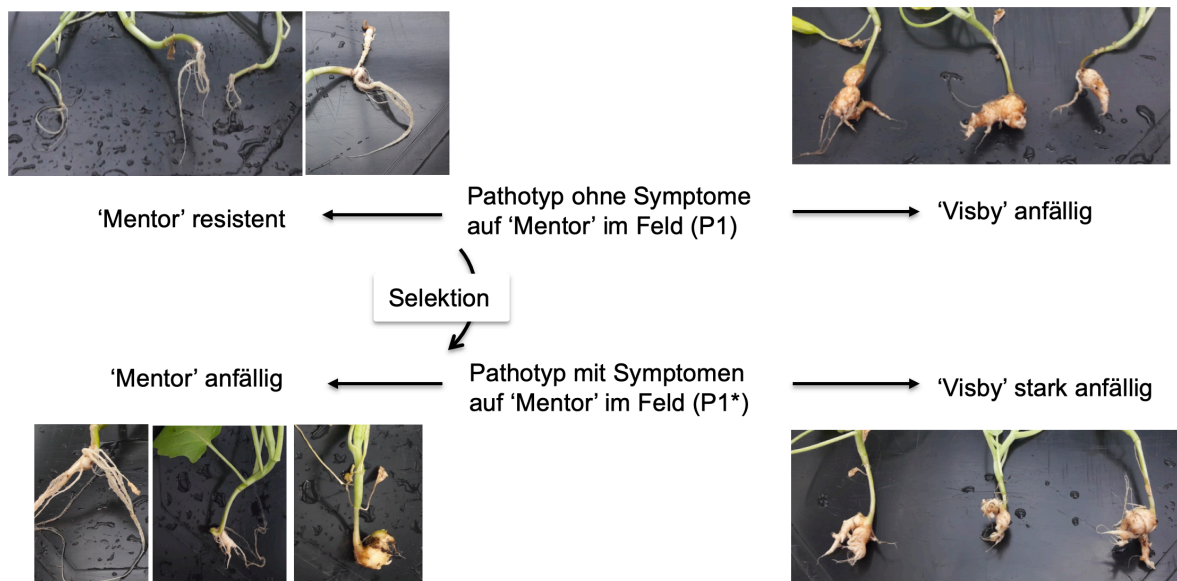


Abb. 1. Die beiden verwendeten Isolate und Rapssorten im Vergleich zueinander, ihre Eigenschaften bezüglich der Infektion sind dargestellt.

Kultivierung der Pflanzen und Inokulation

Eine Zusammenfassung aller erfolgreich durchgeführter Versuche ist in Tabelle 1 zu sehen.

Tabelle 1. Übersicht über alle erfolgreich durchgeführten Versuche.

Experiment Nr.	Art des Experimentes	Evaluierung (Tagen nach Inokulation)	Institution
1	Kombination verschiedener Sporenkonzentrationen zweier Isolate von <i>P. brassicae</i> (P1, P1+) und eines von <i>A. alternatum</i> auf die Kohlhernieentwicklung von <i>B. napus</i> 'Visby' und 'Mentor'	45	TUD
2	Direkte Inokulation der Pflanzen mittels Pipette	35	JKI
3	Inokulation des Bodens	56	JKI
4	Saatgutbeschichtung Methode I	45	TUD
5	Saatgutbeschichtung Methode II	56	JKI

Kultivierung in Töpfen

Alle Gewächshaus-Versuche wurden in großen Töpfen (TU Dresden: handelsübliche Plastikware, Durchmesser (13 cm x 13 cm x 13 cm), pro Topf eine Pflanze, durchgeführt, um die optimalen Konditionen möglichst schnell im Versuchsplan zu ermitteln. Die Anzucht erfolgte in dampfsterilisierter (100°C, 120 Minuten) Komposterde (Einheitserde Type P, pH 5.8; Hermina Samen), die im Verhältnis 4:1 mit Sand (Sahara Spielsand; Hornbach) gemischt wurde. Die Anzucht erfolgte im Gewächshaus unter teilweise kontrollierten Bedingungen bei 18-27°C (Nacht/Tag), einer relativen Luftfeuchte zwischen 20 und 70% und mit einer Lichtintensität von ca. 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pro Topf wurden 3 Pflanzen vorgekeimt und später auf eine Pflanze pro Topf ausgedünnt.

Kultivierung in Hochbeeten

Am JKI werden, um eine Feldsituation so weit wie möglich zu imitieren, die Versuche unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus in großen Tablett (200 × 100 × 25 cm) auf Hochbeettischen durchgeführt. Die eingesetzte Erde war eine Mischung aus Pflanzerde, Sand und Torf (5:1:1; pH<6.5; FloraSelf®). Für Experiment 2 wurden die Samen mit einem Abstand von 7.5 cm zueinander und in Reihen, die in 11.5 cm voneinander entfernt waren, ausgebracht. Insgesamt wurden 17-20 Samen pro Reihe angezogen und bei Auskeimen ausgedünnt, damit 13 Pflanzen pro Reihe (insgesamt 5 Reihen pro Sorte) verblieben. Die Anzucht erfolgte unter kontrollierten Gewächshausbedingungen bei 20/16°C, 70 % relativer Luftfeuchte und 16/8 h Tag/Nacht Regime mit einer Lichtintensität von 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Für Experiment 3 wurden die Samen ein Tag nach der Inokulation des Bodens mit den Sporenlösungen (siehe unten) in 2 cm tiefe Löcher ausgelegt. Sie wurden in denselben Abständen ausgebracht, aber es wurde jeweils abwechselnd eine Reihe 'Visby' und eine Reihe 'Mentor' gesät, mit 12 Reihen Pflanzen pro Tablett. Die Anzucht erfolgte über 8 Wochen bei einer Lichtintensität von 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Die Pflanzen wurden jeden zweiten Tag bewässert, um die Feuchtigkeit zu halten, aber die Erde war nicht mit Wasser gesättigt.

Inokulation mit *P. brassicae*

Experimente TUD (Experiment 1; Abb. 2, 3): Für die Inokulation mit *P. brassicae* wurde eine Sporenlösung hergestellt. Dafür wurden Dauersporen von gefrorenem Gallen-Material in einem Mixer und H₂O extrahiert, durch eine Gaze (25 μm Porenweite) filtriert und anschließend für 10 Minuten bei 2500g zentrifugiert (Jäschke et al. 2010). Die Sporen wurden in Kaliumphosphatpuffer gelöst (50 mM KH₂PO₄, pH 5.8). Die Konzentration wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop eingestellt (10⁹ Sporen/ml) und für die Versuche entsprechend den in den Abb. 2 und 3 gezeigten Konzentrationen verdünnt. Es wurden pro Pflanze 1 ml der Sporenlösung an den Wurzelhals jeder Pflanze pipettiert.

Experimente JKI (Experiment 2, Abb. 4): Pflanzen wurden im Wachstumsstadium BBCH 12-12 (junger Keimling) inokuliert und vor der Inokulation gut gewässert. Das Inokulum wurde nach Zamani-Noor (2017) präpariert. Die Dauersporen von *P. brassicae* wurden aus 100 g Gallenmaterial mit 200 ml sterilem deionisiertem Wasser in einem Mixer (Vital Mixer Pro, Hollenstedt) für 5 Minuten bei 20,000 rpm extrahiert. Die Sporenlösung wurde filtriert durch einige Lagen Absehtuch, bis der Extrakt frei von Pflanzenrückständen war. Danach wurde die Lösung auf 1×10⁵, 1×10⁶ und 1×10⁷ Sporen pro ml mittel Fuchs Haemocytometer Objektträger (Hecht-Assistent, Sondheim) unter einem Mikroskop eingestellt. Davon wurden 1 ml Lösung an jede Pflanze pipettiert.

Experimente JKI (Experiment 3 und 5, Abb. 5): Das Inokulum wurde identisch hergestellt, aber es wurde in der entsprechenden Konzentration (10⁶ und 10⁷ Dauersporen pro g Boden) direkt mit der Erde vermischt. Darauf wurden dann die Samen ausgebracht (siehe oben) und die Inokulation erfolgte direkt in der so vorbereiteten Erde.

Inokulation mit *A. alternatum*

Die Sporensuspension von *A. alternatum* wurde für alle Versuche gleich hergestellt. Dafür wurden Agarstücke mit dem Pilz in ein steriles flüssiges Kartoffel-Dextrose Medium überführt und diese bei 19°C auf einem Schüttler im Dunkeln für ca. 3 Wochen inkubiert (Jäschke et al. 2010). Danach konnten die Konidien des Pilzes abgeerntet werden. Dafür wurden sie unter Vakuum abfiltriert, ausgezählt und als 1×10⁹ Sporen pro ml kühl aufbewahrt. Die Inokulation fand durch Pipettieren von 2 × 1 ml Sporensuspension der gewünschten Verdünnung (10⁶ und 10⁷) statt, indem zuerst die Sporen von *A. alternatum* in der Nähe einer Pflanze (wieder im

Entwicklungsstadium BBCH 11-12) in ca. 2 cm Tiefe appliziert wurden und anschließend die von *P. brassicae*. Kontrollpflanzen wurden nur mit Wasser behandelt. Um ein Auswaschen zu verhindern, wurden die Pflanzen für 72 Std. nicht gegossen. Sie wurden vorübergehend bei 24°C gehalten, um die bestmögliche Infektion zu erzielen. Die Pflanzen wurden wie oben beschrieben weiter kultiviert. Inokulation von *A. alternatum* direkt im Boden fand zusammen mit der Sporenlösung von *P. brassicae* statt. Es wurde dabei eine Sporendichte von 10^7 Sporen pro g Erde eingesetzt.

Beize des Saatgutes mit *A. alternatum*

Für eine erste Applikation ist es geplant, das Saatgut mit Konidien direkt zu beschichten. Die Samenbeschichtung wurde nach zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt.

Die Methode nach Hussain et al. (2019) verwendet folgende Lösungen: 10% Polyvinyl alcohol (PVA) (Fluka, 40-88) MW 205 kDA, 15% PVP (Sigma), 110µm 77627, 18% Glycerol in deionisiertem Wasser gelöst und autoklaviert. Ca. 10^7 Sporen / ml von *A. alternatum* und 50 Samen werden in einem 2 ml Gefäß zusammen mit der Beschichtungslösung für 1 Std. bei Raumtemperatur und schütteln inkubiert. Danach wurden die Samen aus dem Gefäß herausgeholt, voneinander separiert und direkt unter einer Sterilbank für ca. 1.5 Std. getrocknet. Diese wurden dann auf Erde ausgebracht und nach dem Keimen direkt mit *P. brassicae* inokuliert.

Die Samenbeschichtung wurde in einem zweiten Ansatz nach einer Methode von Müller und Berg (2008) durchgeführt. Dafür wurden einige Modifikationen vorgenommen. Nach Kultivierung von *A. alternatum* in Kartoffel-Dextrose Medium wurden die Sporen durch Zentrifugation bei 7,500g abgetrennt und in einer 1.5% (w/v) Methylcellulose Lösung (Roth, Karlsruhe) resuspendiert. Die Lösung wurde auf 10^7 Sporen / ml eingestellt und 1 ml Sporen wurde zu 2.0 g Samen gegeben, die wiederum in eine Labor-Saatgut Beschichtungs-Maschine gebracht wurden. Verbliebene Flüssigkeit wurde durch Zugabe von 1.0 g Talcum gebunden. Die Samen wurden in der Maschine rotiert, bis die Beschichtung gleichmäßig aussah. Danach wurden die beschichteten Samen für 5 Std. lyophilisiert. Kontrollen wurden nur mit Wasser und Talcum behandelt. *P. brassicae* wurde zur Inokulation mit der Erde gemischt.

Bonitur der Krankheitssymptome

Alle Pflanzen wurden geerntet und bonitiert. Dafür wurden die Wurzeln von Erde befreit, um Erdpartikel zu entfernen und anschließend erst anhand der Krankheitsklassen ausgewertet. Diese waren wie folgt eingeteilt: 0 = keine Galle, 1 = wenige kleine Gallen, 2 = moderate Gallenbildung und 3 = schwere Gallenbildung (Kuginuki et al. 1999). Die Befallshäufigkeit (DI) und die Befallsstärke (Infektionsrate) (KI) wurden entweder nach Horiuchi und Hori 1980 und Strelkov et al. 2006) bestimmt:

$$\text{Befallshäufigkeit (\%)} = \frac{\sum(n_1 + n_2 + n_3)}{N} \times 100$$
$$\text{Befallsstärke} = \frac{\sum(n \times 0 + n \times 1 + n \times 2 + n \times 3)}{N \times \text{No. Klassen mit Symptomen}} \times 100$$

Hierbei ist n die Anzahl der Pflanzen in jeder Klasse, N die Gesamtzahl der Pflanzen und 0, 1, 2 und 3 sind die Krankheitsklassen.

Alternativ wurde der der Krankheitsindex (DI) nach Siemens et al. (2002) mit einer modifizierten Skala, die außer 0 noch vier weitere Boniturstufen verwendet.

Danach wurden in einigen Experimenten (2, 3, 5) die Pflanzen in Spross und Wurzel getrennt und das Frischgewicht der Sprossanteile bestimmt, um den Effekt auf das Pflanzenwachstum zu bestimmen.

Ergebnisse

Krankheitsentwicklung in Töpfen

Um die optimalen Bedingungen für die Ko-Inokulation herauszufinden, wurden Gewächshausversuche in Töpfen mit Einzelpflanzen durchgeführt (TU Dresden). Folgende Bedingungen wurden getestet: Kontrolle, nur *A. alternatum* (Aa) 10^6 , 10^7 , 10^8 (nur bei einem Versuch), nur *P. brassicae* P1, P1+ 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , e3 10^6 , 10^7 Ko-inokulation P1, P1+ 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 / Aa 10^6 , 10^7 , 10^8 (nur bei einem Versuch), e3 10^6 , 10^7 / Aa 10^7 . Das *P. brassicae* Isolat e3 diente als Kontrolle für die Inokulation mit 'Visby', 'Mentor' sollte damit nicht inokulierbar sein. Außerdem war für dieses Isolat der Effekt mit *A. alternatum* beschrieben (Auer und Ludwig-Müller 2014, Jäschke et al. 2010).

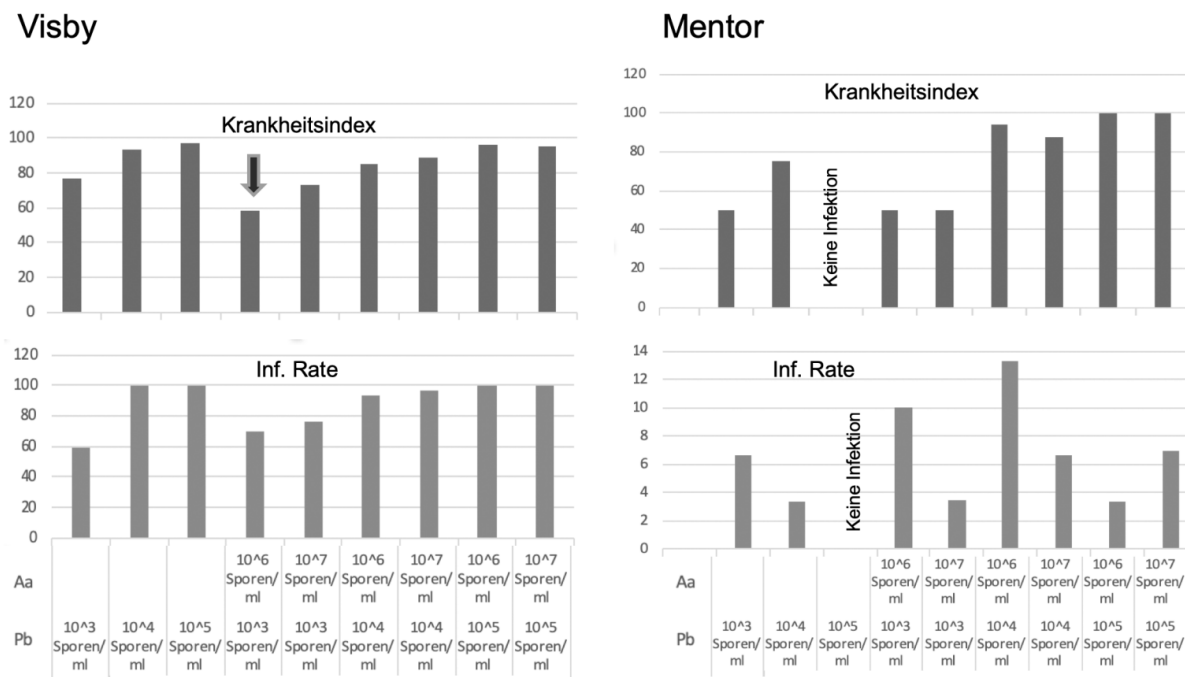


Abb. 2. Inokulation von 'Visby' und 'Mentor' mit verschiedenen Konzentrationen des *P. brassicae* Isolates P1. *A. alternatum* wurde mit jeder in zwei Konzentrationen kombiniert. P1 sollte 'Mentor' nicht oder nur schwach befallen.

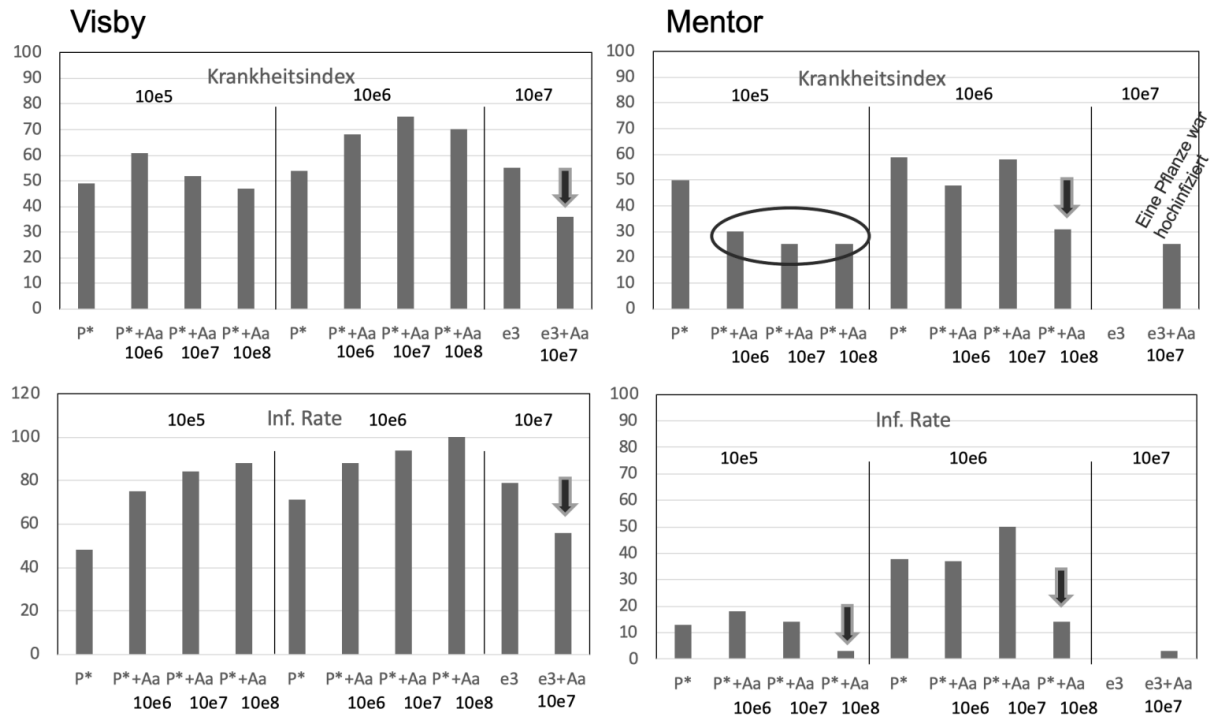


Abb. 3. Inokulation von 'Visby' und 'Mentor' mit verschiedenen Konzentrationen des *P. brassicae* Isolates P1. *A. alternatum* wurde mit jeder in zwei Konzentrationen kombiniert. P1 sollte 'Mentor' nicht oder nur schwach befallen. Die Pfeile deuten auf Unterschiede, die sich für die Ko-Inokulation mit *A. alternatum* gezeigt haben.

Es wurde gezeigt, dass die beiden Genotypen mit den verschiedenen Isolaten die erwarteten Unterschiede bei der Inokulation mit *P. brassicae* alleine zeigten. Das Isolat P1 ist in Abb. 2 zu sehen, das Isolat P1+ in Abb. 3. Für die Ko-Inokulation wurde gefunden, dass es stärkere Unterschiede bei der Sorte 'Mentor' gab (Abb. 2 und 3). Die Daten wurden über verschiedene Experimente bestätigt. Leider konnte für das Isolat P1 bei 'Mentor' in zwei Konzentrationen keine Infektion gefunden werden. Dieses Isolat war entgegen der Erwartungen im Gewächshausversuch auch bei 'Mentor' virulent, auch wenn die Raten niedriger als bei 'Visby' erschienen. Der Krankheitsindex war auch hoch, allerdings war die Infektionsrate wesentlich niedriger als bei der Inokulation von 'Visby'. Es konnten keine wirklich reproduzierbaren Unterschiede bei der Behandlung von *A. alternatum* auf die Krankheitsentwicklung gefunden werden. Dies war anders für das Isolat P1+, das bei 'Mentor' auch zu Infektionen führte und dessen Befallsstärke durch die Gabe von *A. alternatum* reduziert werden konnte (Abb. 3).

In den weiteren Versuchen sollte nun auch das Frischgewicht erfasst werden, um eine Aussage zu den oberirdischen Teilen und deren Entwicklung nach Zugabe eines oder beider Mikroorganismen zu analysieren (Abb. 4, 5).

Krankheitsentwicklung auf Hochbeettischen

Beide Winterraps-Sorten zeigten Unterschiede in allen getesteten Parametern in Bezug auf die Inokulumdichte und des Pathotypes von *P. brassicae*. Allerdings konnten keine Unterschiede im Befallsgrad gemessen werden, wenn die hohe *P. brassicae* Sporenkonzentration (2×10^7) verwendet wurde (Abb. 4). Für niedrigere *P. brassicae* Sporenkonzentrationen konnten nach Ko-Inokulation mit *A. alternatum* Unterschiede gefunden werden, allerdings waren diese nicht signifikant. Im Gegensatz dazu konnten signifikante

Unterschiede für beide *P. brassicae* Isolate, das normal virulente Isolat P1 und das hochvirulente P1+ und beide Rapssorten nach *A. alternatum* Ko-Inokulation bezüglich des Frischgewichtes gefunden werden (Abb. 4). Dies zeigte sich durch erhöhtes Frischgewicht bei ko-inokulierten Pflanzen im Vergleich zu alleiniger Inokulation mit *P. brassicae*.

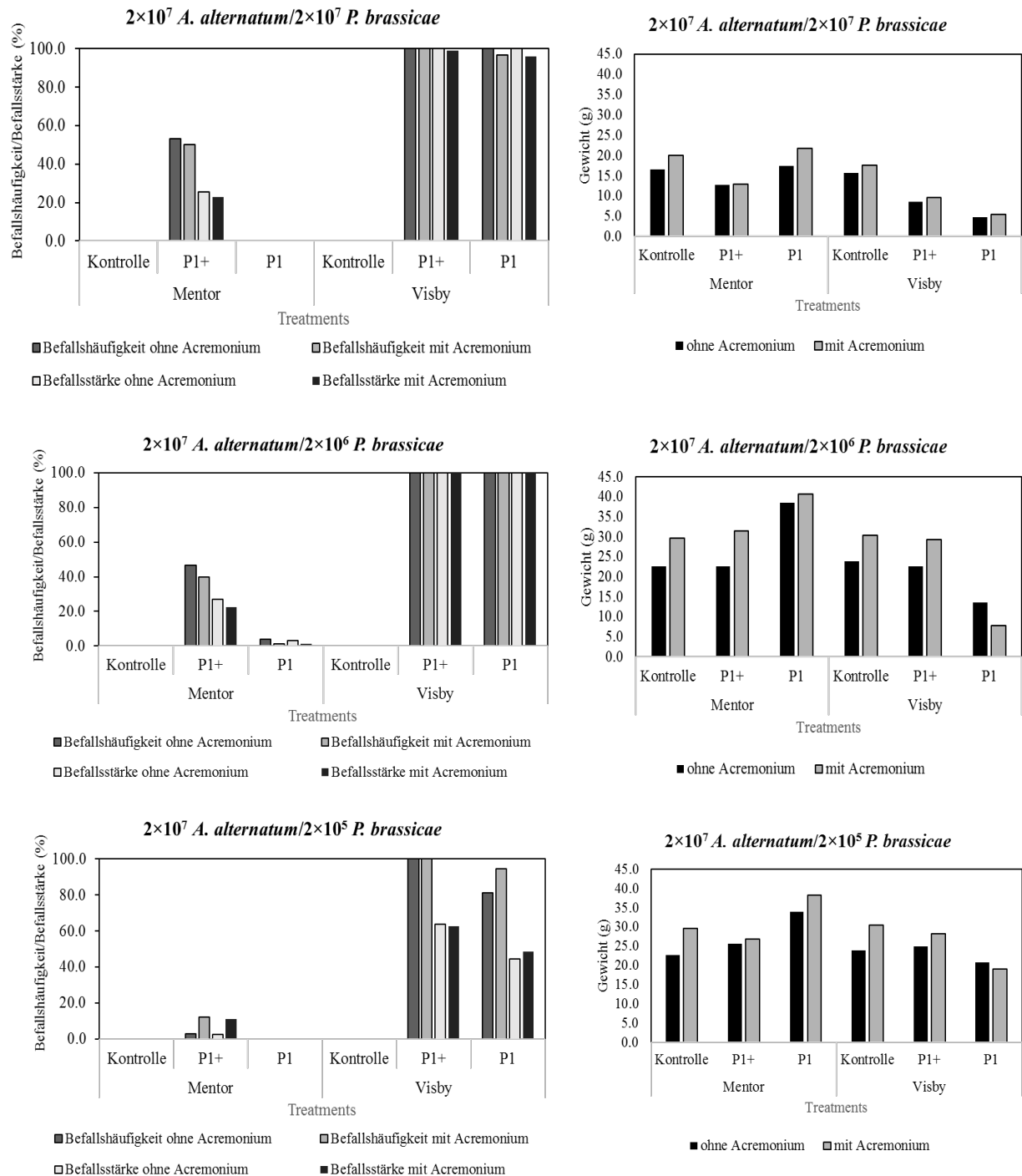


Abb. 4. Effekt einer 10⁷ ml Sporensuspension von *A. alternatum* auf Befallsstärke, Befallshäufigkeit und Spross-Frischgewicht einer Kohlhernie-anfälligen und resistenten Rapssorte 'Visby' und 'Mentor' 35 Tage nach Inokulation. Pflanzen wurden artifiziiell inokuliert (es wurden die Sporenlösungen der beiden Mikroorganismen direkt zu den Pflanzen pipettiert) Die Kombination bestand aus 2x10⁷ Sporen pro ml von *A. alternatum* und verschiedenen Konzentrationen des weniger virulenten Isolates P1 oder des stärker virulenten Isolates P1+

von *P. brassicae* (2×10^5 , 2×10^6 und 2×10^7 Sporen pro ml). Kontrollpflanzen wurden nur mit Wasser behandelt.

Ähnlich wie für das vorherige Experiment beschrieben wurden die Rapssorten 'Visby' und 'Mentor' hinsichtlich ihres Verhaltens einer Doppelinokulation mit *P. brassicae* und *A. alternatum* untersucht, jedoch wurde hier das *P. brassicae* Inokulum direkt in den Boden eingebracht, um noch näher an die Feldbedingungen zu kommen. Die Sporensuspension von *A. alternatum* wurde in diesem Experiment zum gleichen Zeitpunkt wie die Dauersporen von *P. brassicae* mit Substrat in einer Konzentration von 10^7 pro ml vermischt. Es konnten keine Unterschiede in der Krankheitsausprägung nach Behandlung mit *A. alternatum* gefunden werden (Abb. 5), jedoch war auch hier wieder eine Erhöhung des Sprossgewichtes bei den *A. alternatum* behandelten Pflanzen zu sehen. Dieser Effekt auf das Frischgewicht erscheint also reproduzierbar und könnte auch infizierten Pflanzen im Feld einen Vorteil verschaffen. Hierzu müsste über längere Anzuchtzeiträume der Ertrag erfasst werden.

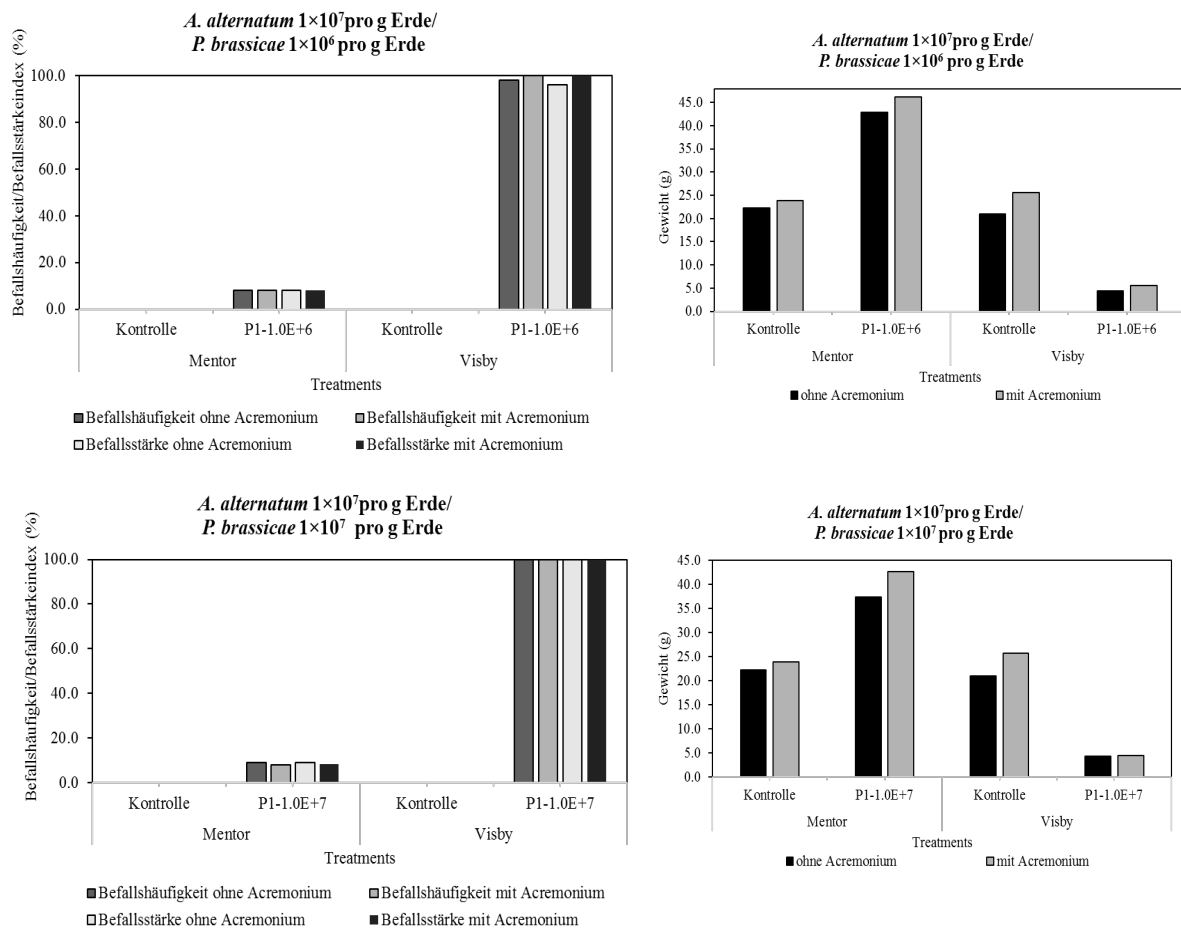


Abb. 5. Effekt von *A. alternatum* auf Befallsstärke, Befallshäufigkeit und Spross-Frischgewicht einer Kohlhernie-anfälligen und resistenten Rapssorte 'Visby' und 'Mentor' 56 Tage nach Inokulation. Samen wurden auf mit den *P. brassicae* Isolaten P1 und P1+ (1×10^6 oder 1×10^7 Sporen pro g Erde) inokulierter Erde aufgebracht. Die Sporensuspension von *A. alternatum* wurde auch in den Boden gebracht. Kontrollpflanzen wurden nur mit Wasser behandelt.

Krankheitsentwicklung nach Beize des Saatguts mit *A. alternatum*

Die Versuche wurden mit zwei etwas unterschiedlichen Methoden zur Beize an den beiden Versuchsstandorten durchgeführt. Eine Variante zeigte im ersten (Vor-)Versuch gute Ergebnisse hinsichtlich der Krankheitsreduktion (Abb. 6), konnte aber nicht wiederholt werden, da in beiden Wiederholungen leider nur sehr wenige Pflanzen insgesamt infiziert waren, sodass eine Bonitur nicht sinnvoll erschien. Die Pflanzen waren gekeimt, aber die Infektion war schlecht. Keine der ausgetesteten Methoden hatte einen negativen Einfluss auf die Keimrate.

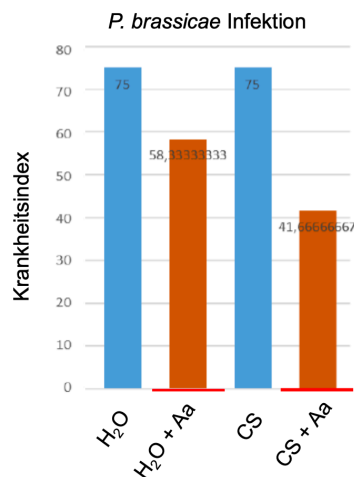


Abb. 6. Die Saatgutbehandlung nach Hussain et al. (2019) zeigt in einem Vorversuch mit einer kleinen Pflanzenzahl eine Reduktion der Krankheitssymptome. Allerdings wurde hier das *P. brassicae* Isolat e3 eingesetzt. Es fand immer eine Kontrollbehandlung mit Wasser oder der Beschichtungslösung (CS) statt.

In einem zweiten Ansatz wurde eine etwas andere Methode genutzt und die Samen in Hochbeeten ausgebracht. Hier konnten weder Unterschiede beim Krankheitsindex noch beim Frischgewicht zwischen behandelten und unbehandelten Pflanzen gefunden werden (Abb. 7).

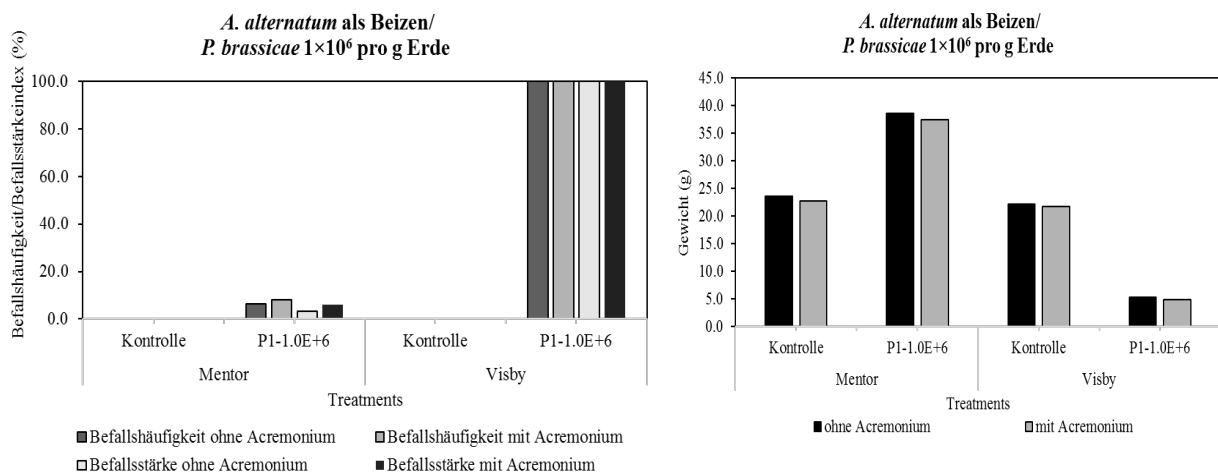


Abb. 7. Der Effekt von *A. alternatum* als Samenbeschichtung nach Müller und Berg (2008) gegen die Kohlhernie. Infektionsrate, Krankheitsindex und Frischgewicht wurden für die anfällige Sorte 'Visby' und die resistente Sorte 'Mentor' 56 Tage nach Aussaat bonitiert. Die Samen wurden mit *A. alternatum* (10⁷ Sporen pro ml) beschichtet und direkt in Erde gegeben,

die mit 10^6 Sporen / g Erde mit Dauersporen von *P. brassicae*-P1 versetzt war. Kontrollpflanzen waren nur mit Wasser behandelt.

Fazit: Die Erwartung, dass in alle Versuchen *A. alternatum* eine Reduktion der *P. brassicae* Infektion erreichen kann wurde nicht erfüllt, aber es wurde gezeigt, dass die Frischgewichte immer höher waren und die infizierten Pflanzen besser aussahen. Die Beschichtung der Samen war leider nicht reproduzierbar, da in zwei folgenden unabhängigen Serien sowohl an der TU Dresden als auch am JKI leider keine Infektion in den Pflanzen gefunden wurde. Es war nicht möglich die Gewebe molekular auszuwerten. *P. brassicae* konnte nachgewiesen werden, jedoch war eine Quantifizierung in dem vorliegenden Material nicht möglich. *A. alternatum* konnte in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die Semi-Feldversuche konnten aus Zeitgründen am Ende pandemiebedingt nicht mehr durchgeführt werden.

Diskussion

Kontrollmechanismen für die Kohlhernie im Feld zeichnen sich durch teilweise nur schlecht wiederholbare Effekte aus und sind immer abhängig von der Boden- und Wettersituation. In den letzten Jahren wurden sowohl Bakterien als auch Pilze auf ihr Biokontrollpotential getestet. Ein Pilz mit hohem Kontrollpotential (*Heteroconium chaetospora*) zeigte jedoch so schlechte Wachstumseigenschaften, dass er nicht kommerziell nutzbar erscheint (Narisawa et al. 2000, Lahlali et al. 2014). Für weitere Pilze, z.B. *Clonostachys roseus*, wurden in der Literatur ebenfalls einige Erfolge bei der Kohlhernie berichtet (Lahlali und Peng 2014). Ein weiterer Pilz, *Gliocladium catenulatum*, wird ebenfalls bereits kommerziell eingesetzt (Prestop) (Peng et al. 2011). Zhu et al. (2020) beschreiben weitere Biokontrollorganismen für die Kohlhernie, darunter auch Pilze. Das Potential eines weiteren Endophyten, *Acremonium alternatum* wurde an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gezeigt (Jäschke et al. 2010).

Die Ergebnisse des Projektes zeigen, dass die Reduktion der Krankheitssymptome der Kohlhernie durch den Pilz *A. alternatum* teilweise möglich ist. Dies scheint jedoch zum jetzigen Zeitpunkt abhängig vom Rapskultivar und auch der *P. brassicae* Isolate zu sein. Während ‚Visby‘ mit dem Einsporisolat e3 und *A. alternatum* eine Reduktion der Symptome zeigte (Auer und Ludwig-Müller 2014, 2015), war dies hier bei Verwendung der Isolate P1 und P1+ (Zamani-Noor 2017) nicht zu beobachten. Jedoch zeigte ‚Mentor‘ bis zu einem gewissen Grad eine Reduktion der Symptome. Reproduzierbar waren die Effekte auf die Sprossmasse, die durch gleichzeitige Behandlung mit *P. brassicae* und *A. alternatum* sichtbar wurde. Dies könnte den Pflanzen im Feld einen Vorteil, selbst bei vorhandenen Krankheitssymptomen verschaffen. Versuche zur Applikation des endophytischen Pilzes über Samen konnte keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielen, jedoch muss hier zukünftig auf professionelle Methoden der Beschichtung zurückgegriffen werden. Aus der Literatur wurden für andere Pilze Ansätze mit Konidien beschrieben (Roberts et al. 2014, Colla et al. 2015), wie wir sie auch für *A. alternatum* verwendet haben. Veröffentlichte Methoden müssen jedoch immer wieder für die jeweiligen Mikroorganismen und auch Typen von Samenschalen angepasst werden, was einen hohen Zeitfaktor beinhaltet.

Als weiteren Biokontrollorganismus hatten wir auch *Serendipita* (vormals *Piriformospora*) *indica* vorgeschlagen. Während des Projektes wurden zwei Arbeiten veröffentlicht, die auf der einen Seite ein Biokontrollpotential von *S. indica* bei einer Kohlart (*Brassica campestris*) bestätigten (Khalid et al. 2020), aber auf der anderen Seite zeigten, dass eine Beschichtung von *B. napus* Samen mit diesem endophytischen Pilz nicht zu den gewünschten Phänotypen auf dem Feld führten (Sedaghatkish et al. 2020). Die Methode zur

Beschichtung wurde nur als ‚proprietär‘ beschrieben, sodass diese nicht nachzumachen wäre. Dies zeigt, dass viele Optimierungen notwendig sein werden, um die Anwendung in das Feld zum Landwirt zu bringen.

Schlussfolgerungen

Nach erfolgreicher Evaluierung der besten Applikationsmethode mit der größten Induktion von Toleranz auf ‚Mentor‘ und anderen Sorten sollen die Voraussetzungen für eine umweltverträgliche Kontrolle der Kohlhernie geschaffen werden. Die Produktion von Raps wird durch genaueres Wissen über eine gezieltere Bekämpfung und durch bessere Kenntnisse über *Plasmodiophora brassicae* besser planbar und sicherer. Nur bei funktionierenden Prognosesystemen sind gezielte Maßnahmen möglich. Diese sind für einen nachhaltig funktionierenden Rapsanbau wegen des Auftretens von hoch virulenten Isolaten und der bisher fehlenden Pflanzenschutzmaßnahmen notwendig.

- *Acremonium alternatum* wirkt am besten bei direkter Gabe zusammen mit *Plasmodiophora brassicae*
- Oft war keine Reduktion der Krankheits Symptome zu sehen, aber das Frischgewicht war erhöht -> bessere Leistung der Pflanzen
- Die Wirkung konnte bei der Sorte ‚Mentor‘ ebenfalls gefunden werden und ist im Vergleich zu ‚Visby‘ höher -> wahrscheinlich handelt es sich um eine sorten- und isolatabhängige Kombination

Zusammenfassung

Kontrollmechanismen für die Kohlhernie im Feld zeichnen sich durch teilweise nur schlecht wiederholbare Effekte aus und sind immer abhängig von der Boden- und Wettersituation. Daher sind die Ergebnisse nicht immer vorhersehbar und bei Kombinationen, die die Etablierung und Ausbreitung der Kohlhernie fördern werden, große Teile eines befallenen Feldes in Mitleidenschaft gezogen. Aus diesen Gründen wird verstärkt auf Kohlhernie-resistente Sorten zurückgegriffen, die bei Raps alle auf der Resistenz der Sorte ‚Mentor‘ beruhen. Diese Konzentration auf eine Resistenz führte in der jüngsten Vergangenheit dazu, dass sich neue virulente *Plasmodiophora brassicae* Isolate entwickeln konnten, die auch auf anfälligen Raps-Sorten wie z.B. ‚Visby‘ eine hohe Virulenz zeigen. In dem Projekt wurde ein möglicher Biokontrollorganismus, die sich im Gewächshaus bereits als geeignet erwiesen hat, die Kohlhernie zu reduzieren, auf eine mögliche Anwendung im Feld untersucht. Das Potential des endophytischen Pilzes *Acremonium alternatum* wurde im Vergleich mit einer anfälligen und einer resistenten Rapsorte sowie verschiedenen virulenten *P. brassicae* Isolaten untersucht. Hierzu wurden zunächst in Gewächshausbedingungen die geeigneten Sporenkonzentrationen für die Behandlung mit den beiden Organismen ermittelt. Danach erfolgten Versuche in Hochbeeten, einmal mit einer direkten Inokulation der Pflanzen und einmal mit einer Inokulation bei der sich die *P. brassicae* Sporen bereits bei der Keimung in der Erde befanden. Während keine starken Effekte auf die Krankheitssymptome zu beobachten war, konnten beide Rapsorten in den Ansätzen mit beiden Organismen ein verbessertes oberirdisches Wachstum zeigen. Dies könnte im Feld zu einer Verbesserung des Ertrages trotz Wurzelsymptomen führen. Um den Pilz besser für die Anwendung nutzen zu könne, wurden Versuche mit Beschichtung von Samen unternommen. Die Beschichtung des Saatgutes mit *A. acremonium* gelang mit zwei verschiedenen Methoden, jedoch wurde eine reproduzierbare Krankheitsreduktion noch nicht beobachtet.

Summary

Control mechanisms for clubroot in the field is characterized by hardly reproducible effects and are usually dependent on weather and soil conditions. Therefore, the results are not always predictable and in combinations that would increase chances for the establishment and emergence of clubroot large areas of fields, which are showing the disease symptoms. Based on such observations the clubroot resistant cultivars based on the 'Mendel' resistance, such as 'Mentor' in Germany are used more and more in the field. Exhaustive usage of these resistances has led to the development of new and highly virulent isolates of *Plasmodiophora brassicae* that can overcome the resistant in current commercial clubroot-resistant cultivars. In this project, a promising biocontrol organism was investigated for its potential to control clubroot in the field, because it had already shown its capability to reduce clubroot symptoms under greenhouse conditions. The potential of the endophytic fungus *Acremonium alternatum* was investigated in combination with different *P. brassicae* isolates with varied virulences and with two different oilseed rape cultivars. In the greenhouse the optimal conditions for the combination of the two microbes in terms of spore concentration was determined. Afterwards, the effect of *A. alternatum* in more field-like conditions was investigated using two different inoculation methods with *P. brassicae*. One was direct inoculation and the other by mixing the soil with resting spores of *P. brassicae*. While in all combinations no strong effects on clubroot disease symptoms were observed, a reproducible effect on the upper plant parts was visible, which could give the infected plants nevertheless an advantage in the field to endure pathogens better. This could lead in the field to better yield despite the presence of the pathogen. To find a better solution for the administration of the endophyte, a seed coating approach using two different methods was employed. While both methods yielded successfully coated seeds, the reduction of disease symptoms and growth was not yet reproducible.

Quellenangabe

Auer, S., Ludwig-Müller, J. (2014) Effects of the endophyte *Acremonium alternatum* on oilseed rape (*Brassica napus*) development and clubroot progression. Albanian J. Agric. Sci. 13: 15-20

Auer, S., Ludwig-Müller, J. (2015) Biological control of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) by the endophytic fungus *Acremonium alternatum*. J. Endocytobiosis Cell Res. 26: 43-49

Buczacki, S.T., Toxopeus, H., Mattusch, P. (1975) Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. Transactions of the British Mycological Society 65, 295–303

Colla, G., Roupael, Y., Bonini, P., Cardarelli, M. (2015) Coating seeds with endophytic fungi enhances growth, nutrient uptake, yield and grain quality of winter wheat. Int. J. Plant Product. 9: 171-190

Doan, T.T., Jäschke, D., Ludwig-Müller, J. (2010) An endophytic fungus induces tolerance against the clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa* roots. Acta Hort. 867: 173-180

- Hussain, Z., Khan, M.A., Iqbal, F., Raffi, M., Hafeez, F.Y. (2019) Electrospun microbial-encapsulated composite-based plasticized seed coat for rhizosphere stabilization and sustainable production of Canola (*Brassica napus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 67: 5085–5095
- Jäschke, D., Dugassa-Gobena, D., Karlovsky, P., Vidal, S., Ludwig-Müller, J. (2010) Suppression of clubroot development in *Arabidopsis thaliana* by the endophytic fungus *Acremonium alternatum*. *Plant Pathol.* 59: 100-111
- Lahlali, R., Peng, G., McGregor, L., Gossen, B.D., Hwang, S.F., McDonald, M. (2011) Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) in suppressing clubroot. *Biocontrol Science and Technology* 21: 1351–1362
- Lahlali, R., Peng, G. (2014) Suppression of clubroot by *Clonostachys rosea* via antibiosis and induced host resistance. *Plant Pathol.* 63: 447–455
- Lahlali, R., McGregor, L., Song, T., Gossen, B.D., Narisawa, K., Peng, G. (2014) *Heteroconium chaetospira* induces resistance to clubroot via upregulation of host genes involved in jasmonic acid, ethylene, and auxin biosynthesis. *PLoS ONE* 9: 1–9
- Müller, H., Berg, G. (2008) Impact of formulation procedures on the effect of the biocontrol agent *Serratia plymuthica* HRO-C48 on *Verticillium* wilt in oilseed rape. *BioControl* 53: 905–916.
- Narisawa, K., Ohki, K., Hashiba, T. (2000) Suppression of clubroot and *Verticillium* yellows in Chinese cabbage in the field by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*. *Plant Pathol.* 49: 141–146
- Peng, G., Mcgregor, L., Lahlali, R., Gossen, B.D., Hwang, S.F., Adhikari, K.K., Strelkov, S.E., Mcdonald, M.R. (2011). Potential biological control of clubroot on canola and crucifer vegetable crops. *Plant Pathol.* 60: 566–574
- Roberts, D.P., Lakshman, D.K., Maul, J.E., McKenna, L.F., Buyer, J.S., Fan, B. (2014) Control of damping-off orf organic and conventional cucumber with extracts from a plant-associated bacterium rivals a seed treatment pesticide. *Crop Protect.* 65: 86-94
- Siemens, J., Nagel, M., Ludwig-Müller, J., Sacristan, M.D. (2002) The interaction of *Plasmodiophora brassicae* and *Arabidopsis thaliana*: parameters for disease quantification and screening of mutant lines. *J. Phytopathol.* 150: 592–605
- Somé, A., Manzanares, M.J., Laurens, F. (1996) Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathol.* 45: 432–439
- Zamani-Noor, N. (2017) Variation in pathotypes and virulence of *Plasmodiophora brassicae* populations in Germany. *Plant Pathol.* 66: 316–324
- Zamani-Noor, N., Rodemann, B. (2018) Reducing the build-up of *Plasmodiophora brassicae* inoculum by early management of oilseed rape volunteers. *Plant Pathol.* 67: 426-432

Zamani-Noor, N., Wallenhammar, A.-C., Cordsen-Nielsen, G., Orgeur, G., Burnett, F., Dussart, F., Konradyová, V., Malgorzata, J. (2018) Overview of the clubroot incidence and variation in the pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* populations in Europe. IOBC-WPRS Bulletin Vol. 136: 133-135



Herausgeber:

UNION ZUR FÖRDERUNG VON
OEL- UND PROTEINPFLANZEN E.V. (UFOP)

Claire-Waldoff-Straße 7 · 10117 Berlin

info@ufop.de · www.ufop.de