

# Bakterien aus dem Wurzelbereich hemmen den Erreger der Kraut- und Knollenfäule

Denise Bönisch, Lukas Hunziker und Laure Weisskopf

Agroscope, Institut für Nachhaltigkeitswissenschaften INH, 8046 Zürich, Schweiz

Auskünfte: Laure Weisskopf, E-Mail: laure.weisskopf@agroscope.admin.ch



Hemmung des Myzelwachstums von *Phytophthora infestans* durch Kartoffel-assoziierte Bakterienstämme. Links die Kontrolle, rechts der durch den Bakterienstamm R47 gehemmte Oomyzet.

(Fotos: Denise Bönisch)

In der biologischen Landwirtschaft ist es besonders schwierig, Kartoffelpflanzen vor Krankheiten zu schützen, da keine synthetischen Fungizide eingesetzt werden dürfen. In dieser Studie wurde das Hemmpotenzial von Bakterien aus der Kartoffelpflanze und ihrer Rhizosphäre gegen den Erreger der Kraut- und Knollenfäule *in vitro* getestet. Die Hälfte von ihnen zeigte eine vielversprechende Wirkung.

Der Oomyzet *Phytophthora infestans* ist eines der weltweit bedeutendsten Kartoffelpathogene. Im schweizerischen Biokartoffelanbau wird der Erreger der Kraut- und Knollenfäule häufig mit Kupfer bekämpft. Kupfer wirkt effizient gegen *P. infestans*, aber die Anreicherung von Kupfer im Boden hat negative Auswirkungen auf Bodenorganismen (Kula und Guske 2003). Aus diesem Grund soll der Einsatz von Kupfer bis 2016 in der EU möglichst reduziert werden (EU 2009).

Natürlich vorkommende Bakterien können sich sehr gut zur Regulierung von Krankheitserregern eignen: Das bereits auf dem Markt vorhandene Produkt Cerall® (Lantmännen, BioAgri, Schweden) zum Beispiel basiert auf einem *Pseudomonas*-Stamm und wirkt gegen *Tilletia caries*, den Erreger des Stinkbrands im Getreide. Ein anderer *Pseudomonas*-Stamm wird als Proradix® (Sourcon Padena, Tübingen, Deutschland) gegen Silberschorf

bei Kartoffeln eingesetzt. Bis jetzt sind keine Antagonisten bekannt, die den Erreger der Kraut- und Knollenfäule effizient regulieren können. In diesem Bericht wird die Isolierung und Charakterisierung von Kartoffel-assoziierten Bakterien beschrieben, sowie die Fähigkeit dieser Stämme, das Wachstum von *P. infestans* entweder direkt oder indirekt, durch Freisetzung von flüchtigen Verbindungen, *in vitro* zu hemmen.

## Isolierung des Oomyzets und der Bakterienstämme

Das zu testende Polysporenisolat des Oomyzeten *P. infestans* wurde 2001 isoliert. Im Oktober 2012 wurden Bakterienstämme aus der Rhizosphäre und der Phyllosphäre von drei mit *P. infestans* befallenen Kartoffelpflanzen des Standorts Reckenholz gewonnen. Um die kultivierbare Diversität zu erhöhen, wurde die Isolierung auf verschiedenen Medien durchgeführt (Luria-Bertani, Actinomycete Agar, Malzagar). Bakterien, die sich innerhalb einer Probe morphologisch voneinander unterschieden, wurden auf separaten Platten vermehrt. Insgesamt konnten 137 verschiedene Bakterienstämme isoliert werden. Die Mehrzahl dieser Stämme wurde durch Sequenzierung der 16S rRNA oder des RpoD-Gens phylogenetisch identifiziert (Hunziker 2013).

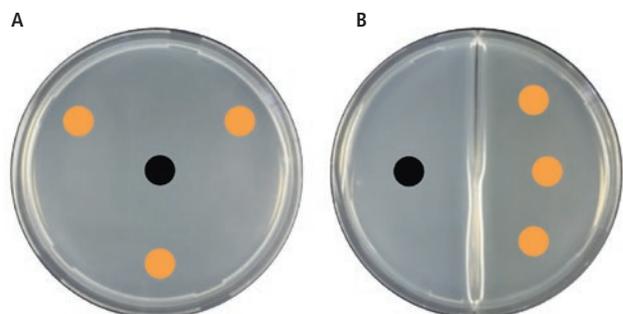
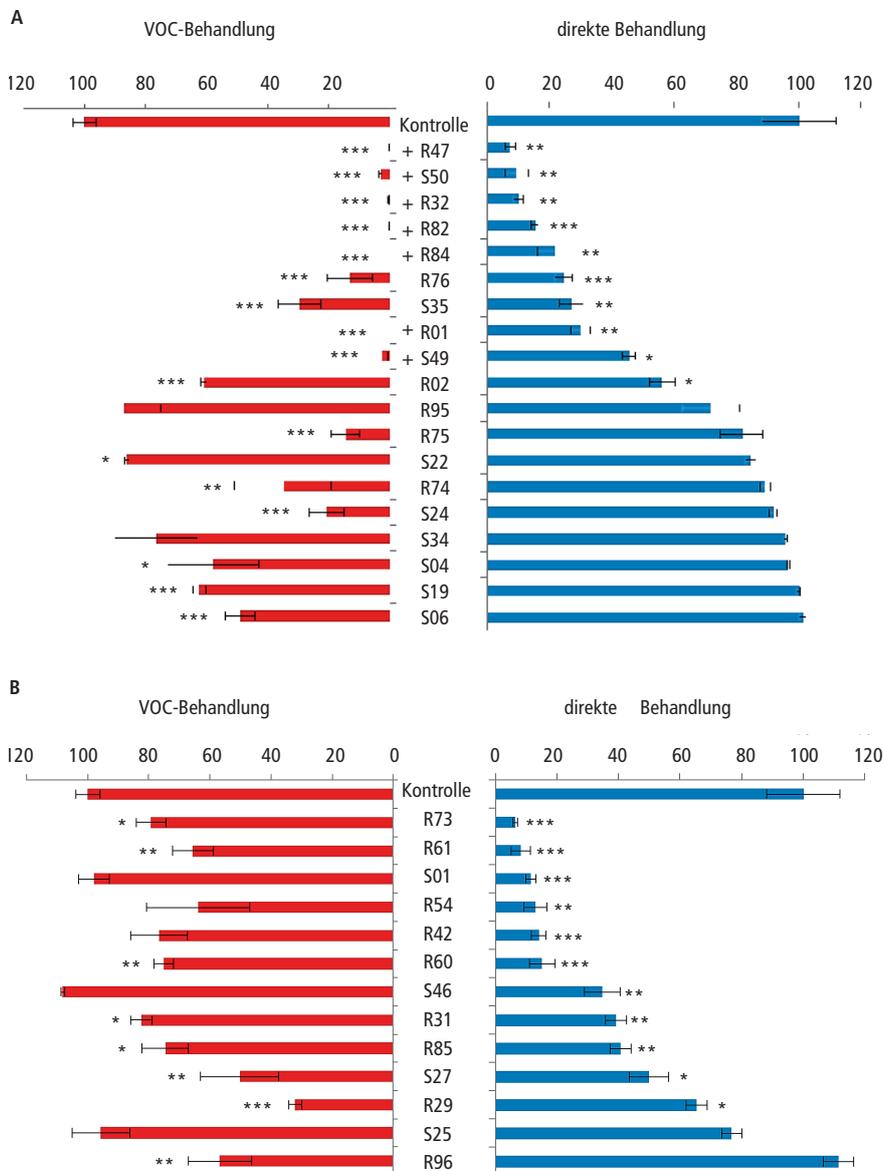


Abb. 1 | Schematische Darstellung der beiden Ansätze, um das wachstumshemmende Potenzial der Bakterienstämme zu testen. Schwarz: Myzelstück von *Phytophthora infestans*, orange: Bakterientropfen der zu testenden Isolate. A: direkter Ansatz, B: VOC-Ansatz (volatile Stoffe).

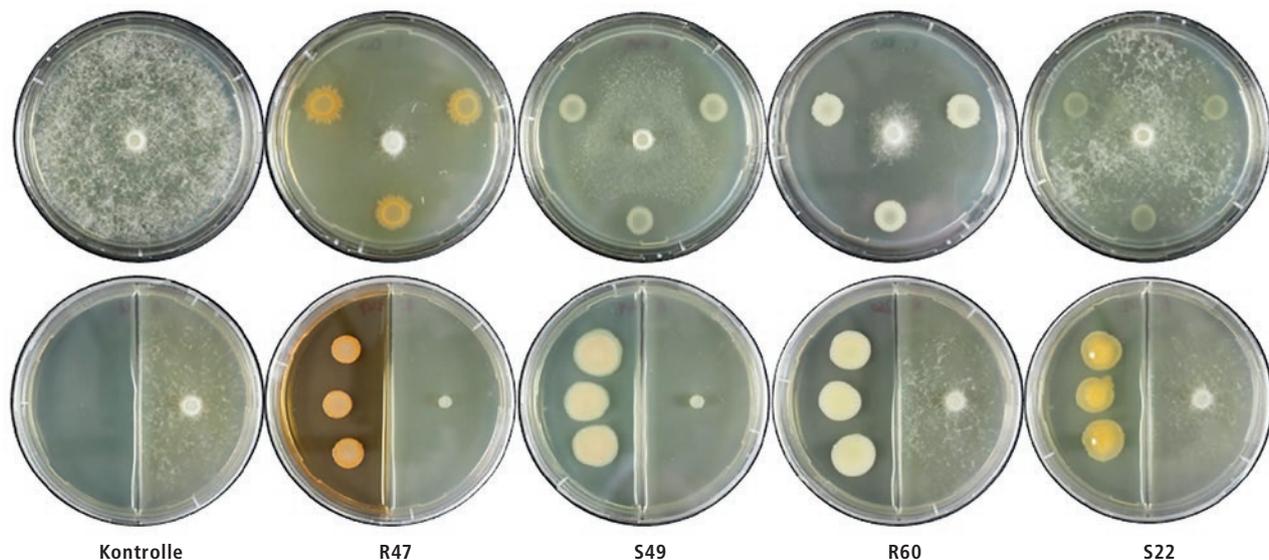
### Antagonistisches Potenzial der Bakterienstämme

Das antagonistische Potenzial der Stämme wurde in einer ersten Vorstudie gegen drei Krankheitserreger (*P. infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*) *in vitro* evaluiert. Dieses Screening führte zu einer Auswahl von 32 Stämmen, deren Aktivität gegen *Phytophthora* in zwei unterschiedlichen Ansätzen bestimmt wurde: Im direkten Ansatz wurde ein Myzelstück von 5 mm Durchmesser in die Mitte einer Petrischale und in gleichmässigen Abständen drei Tropfen mit je 10 µl der bakteriellen Flüssigkultur (optische Dichte = 1) platziert (Abb. 1A). In einem zweiten Ansatz wurde nur der Effekt der flüchti-

gen Stoffe der Bakterien (VOC = volatile organic compound) getestet. Dazu wurde das Myzelstück in einer zweigeteilten Petrischale auf der einen Seite platziert, und auf der anderen Seite wurden drei Bakterientropfen zu je 10 µl pipettiert (Abb. 1B). *Phytophthora infestans* wurde immer auf Roggenagar und die Bakterienstämme wurden entweder auf Roggenagar (direkter Ansatz, Abb. 1A) oder auf Luria-Bertani-Medium (LB) (VOC-Ansatz, Abb. 1B) kultiviert. Nach 14 Tagen wurde die Wachstumsfläche von *P. infestans* mittels digitaler Bildanalyse (ImageJ) gemessen und mit der Kontrolle (ohne Bakterien) verglichen. Die Ergebnisse werden als



**Abb. 2 |** Myzelwachstum von *Phytophthora infestans* 14 Tage nach der Inokulation mit den isolierten Bakterienstämmen. R steht für die isolierten Bakterienstämme aus der Rhizosphäre und S für Stämme vom Spross der Kartoffelpflanzen (mit Standardfehlerbalken). +: Blausäureproduzenten, Sterne: signifikante Unterschiede zur Kontrolle (T-Test, n = 3–4; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001). **A:** Wirkung von *Pseudomonaden* auf das Myzelwachstum (in Prozent der Kontrolle), **B:** Wirkung von *Nicht-Pseudomonaden* auf das Myzelwachstum (in Prozent der Kontrolle). VOC: volatile Stoffe.



**Abb. 3 |** Hemmung des Myzelwachstums von *Phytophthora infestans* durch verschiedene Bakterienstämme. Die Bilder wurden 14 Tage nach der Inokulation aufgenommen. Oben die Wirkung nach der direkten und unten nach der VOC-Behandlung.

Prozent der Kontrolle dargestellt, und die Signifikanz wurde mittels Student's T-Test bestimmt ( $n = 3-4$ ,  $P < 0,05$ ). Die gleichen Platten wurden unter dem Mikroskop visuell ausgewertet um festzustellen, ob die bakteriellen Einflüsse eine Änderung in der Struktur des Myzels hervorrufen können.

#### Hemmpotenzial der antagonistischen Bakterienstämme

Die getesteten Bakterien wurden in Pseudomonaden und Nicht-Pseudomonaden aufgeteilt (Abb. 2A und B). In der ersten Gruppe hemmten insgesamt neun Stämme das Myzelwachstum von *P. infestans*, so dass der Oomyzet in der direkten Behandlung nur zwischen 8 % und 50 % des Wachstums der Kontrolle erreichte, und alle diese Stämme zeigten auch durch die volatilen Stoffe einen sehr guten Hemmeffekt (0–30 % des Wachstums der Kontrolle). Zehn weitere *Pseudomonas*-Stämme zeigten nur eine geringe oder gar keine Wachstumshemmung (56–101 % des Wachstums der Kontrolle) im direkten Ansatz. Von diesen Bakterien hemmten jedoch vier Stämme durch die volatilen Stoffe bis zu 50 % des Wachstums. Bei den Nicht-Pseudomonaden inhibierten zehn Stämme den Oomyzeten (7–50 % des Wachstums der Kontrolle) in der direkten Behandlung. Drei Stämme hemmten nur wenig oder gar nicht. Bezüglich der volatilen Stoffe hatten die Nicht-Pseudomonaden nur einen geringen oder keinen Einfluss, und nur zwei Stämme inhibierten das Wachstum bis zu 50 %.

Dass die Pseudomonaden im VOC-Ansatz aktiver als die Nicht-Pseudomonaden waren, ist wahrscheinlich auf die Produktion von Blausäure zurückzuführen. In der Tat waren alle Stämme, die das Myzelwachstum komplett

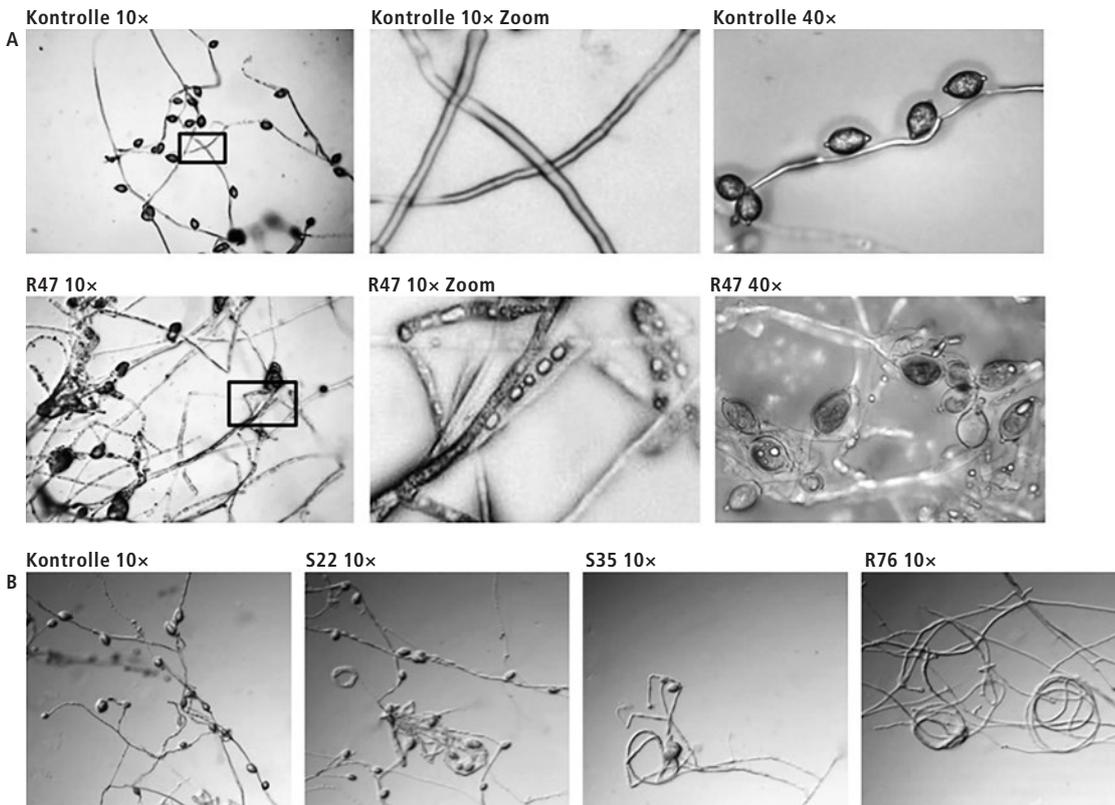
unterbanden, cyanogen (Blausäure-bildend). Allerdings zeigten auch nicht cyanogene Bakterien sehr gute Hemmeffekte, z.B. die Stämme S35, R76, R73 oder R54. Welche andere Stoffe die Inhibition auslösen können, wird in weiteren Versuchen erforscht.

Es war bemerkenswert, dass die bakteriellen Stämme je nach Behandlungsansatz das Myzel von *P. infestans* unterschiedlich hemmten. Der *Pseudomonas*-Stamm R47 z.B. hemmte den Pilz sowohl in der direkten als auch in der VOC-Behandlung hervorragend (Abb. 3), während der Stamm S49 nur im VOC-Ansatz und R60 nur in der direkten Behandlung eine sehr gute Inhibition zeigte. Hingegen wirkte der Stamm S22 in beiden Behandlungen schwach. Dies zeigt, wie sensibel der Oomyzet auf unterschiedliche Wirkstoffe reagiert, ob sie nun vom selben Bakterium stammen oder nicht, und ob sie gasförmig sind oder durch das Medium diffundieren können.

Stämme wie die Pseudomonaden R47, S50, R32, R82 und R84, die in beiden Ansätzen gute Effekte zeigen, sind für eine potenzielle Anwendung als Antagonisten gegen die Kraut- und Kartoffelfäule von Interesse.

#### Bakterien verändern die Myzelstruktur

Durch die Einwirkung der abgegebenen Stoffe der Bakterien in das Medium oder in die Gasphase konnten Veränderungen in der Struktur des Myzels sowie der Sporangien beobachtet werden. Abbildung 4A zeigt das Myzel von *P. infestans* in der direkten Behandlung. Im Gegensatz zur Kontrolle sind in den Hyphen des durch den Stamm R47 gehemmten Oomyzets vakuolenartige Strukturen zu erkennen. Durch diese Strukturen könnte der Stofftransport in den Hyphen und dadurch das Wachstum des Myzels



**Abb. 4 |** Strukturveränderung von *Phytophthora infestans* bei **A** direkter Behandlung und **B** VOC-Behandlung. Die Fotos der direkten Behandlung wurden nach drei Wochen, jene der VOC-Behandlung nach sechs Wochen aufgenommen. **A** Oben die Kontrolle, unten der Stamm R47. **B** Von links nach rechts: Kontrolle, Stämme S22, S35 und R76, aufsteigend nach ihrem Hemmpotential.

gehemmt werden. Die Sporangien waren im Vergleich zur Kontrolle teilweise mit vakuolenartigen Bläschen gefüllt, und das Zoosporenmaterial in den Sporangien sah zersetzt aus. Die Keimung von *P. infestans* könnte durch diese Veränderungen durchaus beeinträchtigt sein.

In Abbildung 4B wird der volatile Einfluss von unterschiedlichen Bakterienstämmen auf das Myzel von *P. infestans* dargestellt. Der Stamm S22 zeigte nur eine geringe Hemmung auf das Wachstum: Bis auf ein paar wenige Hyphenkreise sah hier das Myzel demjenigen der Kontrolle sehr ähnlich. Der mittelgut hemmende Stamm S35 (Myzelwachstum um 35 % reduziert) hatte einen grösseren Einfluss auf die Struktur des Myzels. Es wurden deutlich mehr kreisförmige Hyphen und weniger Sporangien beobachtet. Beim stark inhibierenden Stamm R76 waren die Kreisstrukturen noch ausgeprägter, und es wurden keine Sporangien mehr gefunden. Die Stärke der Wachstumshemmung scheint mit sichtbaren Veränderungen der Hyphenstruktur sowie mit der Reduzierung der Sporangienanzahl einherzugehen. Diese Wirkungen auf die Sporangienbildung sind in Hinsicht auf eine Regulierung des Erregers beachtenswert, da die Sporangien und die darin enthaltenen Zoo-

sporen eine wesentliche Rolle bei der Ausbreitung der Epidemie spielen.

## Schlussfolgerungen

- Von den 32 getesteten Bakterienstämmen hemmte etwa die Hälfte der Stämme das Myzelwachstum von *P. infestans* bis zu 50 % (direkte und VOC-Behandlung).
- Die Behandlung mit den aktiven Bakterienstämmen hemmte nicht nur das Myzelwachstum, es hatte auch einen Einfluss auf die Bildung der Sporangien.
- Das Hemmpotenzial dieser Stämme wird zurzeit in Gewächshausversuchen getestet. ■

### Literatur

- EU, 2009. Amtsblatt der Europäischen Union. Richtlinien der Kommission 2009/37/EG, vom 23. April 2009, Anhang I, 91/414 EWG, Nr. 282.
- Hunziker L., 2013. Bacteria as biocontrol agents of *Phytophthora infestans*: Evaluating the putative role of volatile organic compounds in late blight control. Masterarbeit. Universität Zürich.
- Kula C. & Guske S., 2003. Auswirkungen von Kupfer auf Bodenorganismen bei langjähriger Anwendung. In: Alternativen zur Anwendung von Kupfer als Pflanzenschutzmittel. 7. Fachgespräch am 6. Juni 2002 in Berlin-Dahlem. *Berichte aus der biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*. Heft 118, 11–16.