Gartenbauwissenschaft, 66 (5). S. 262–269, 2001, ISSN 0016–478X. © Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

# Prüfung von Isolaten der *Bacillus*-Gruppe gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* an Tomatenflanzen in erdeloser Kultur

## Evaluation of isolates of *Bacillus*-group against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomato plants in soilless culture

Rita Grosch[1], H. Junge[2] und A. Kofoet[1]
([1])Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V. und [2])FZB Biotechnik GmbH)

## Zusammenfassung

Der Erreger *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) verursacht an der Tomate eine Stängelbasis- und Wurzelfäule. Probleme durch FORL können insbesondere im intensiven Tomatenanbau unter Gewächshausbedingungen auftreten, wobei primär über kontaminiertes Gießwasser eine Infektion der Jungpflanzen erfolgen kann. Eine Möglichkeit der Bekämpfung des Erregers ist die Behandlung von Tomatenpflanzen mit antagonistisch wirkenden Bakterien. Ziel der Untersuchungen war daher die Selektion von Bakterien-Stämmen, insbesondere der *Bacillus*-Gruppe, mit einer krankheitsunterdrückenden Wirkung gegen FORL.

Aus erdelos kultivierten Tomatenkulturen wurden Bakterien isoliert und zunächst *in vitro* auf ihre antifungale Wirkung gegen verschiedene formae speciales von *Fusarium oxysporum* getestet. Die geprüften *Fusarium*-Isolate zeigten gegenüber den Metaboliten eines Bakterium-Stammes eine unterschiedliche Sensitivität. Die Hemmung des Myzelwachstums war außerdem von dem gewählten Testmedium abhängig. Von *in vitro* antagonistisch wirkenden BakterienStämmen wurde die krankheitsunterdrückende Wirkung gegen FORL an Tomatenjungpflanzen geprüft. Mit FORL infizierte Tomatenpflanzen zeigten signifikante Wachstumsdepressionen, die durch einige der geprüften Stämme der *Bacillus*-Gruppe kompensiert bzw. reduziert werden konnten. Die Formulierung von Antagonisten aus der *Bacillus*-Gruppe ist technologisch soweit entwickelt, daß ein Handelsprodukt in die Pflanzenschutzstrategie gegen bodenbürtige Pathogene in erdeloser Kultur integriert werden kann.

## Summary

The pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) causes crown rot and root rot and is widespread and serious in commercial greenhouse cultivated tomato. Young tomato plants can be infected with contaminated irrigation water. The treatment of plants with antagonistic bacteria is a possibility of pathogen control. The selection of effective bacteria strains against FORL was concentrated especially of isolates of *Bacillus*-group.

Bacteria strains were isolated from tomato cultivated in soilless culture. The antagonistic activity of bacteria strains was tested against different formae speciales of *F. oxysporum*. The *Fusarium*-isolates showed a different sensitivity against the antifungal compounds of a bacteria strain. The inhibition of the mycelial growth was influenced by the test media.

Bacteria strains with antagonistic effects *in vitro* were tested on plants under greenhouse conditions to control FORL on tomato. The treatment of tomato plants with some strains resulted in reduced disease incidence by FORL on tomato in experiments replicated. The strains were members of the *Bacillus*-group and for such strains a formulation technology exists. Formulated products can be used in plant protection strategies for soilless culture.

## Einleitung

*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) ist insbesondere im intensiven Tomatenanbau unter Gewächshausbedingungen ein Problem, tritt aber auch im Freiland auf. Der Erreger FORL verursacht an der Tomate eine Stängelbasis- und Wurzelfäule. FORL wurde erstmals 1969 in Japan isoliert und später in Nord- und Südamerika sowie in West-Europa nachgewiesen (MENZIES und JARVIS 1994). Weltweit können durch FORL beträchtliche Schäden auch an anderen Kulturpflanzen wie Weizen, Mais, Blumenkohl oder Spinat verursacht werden (HARENDER und KAPOOR 1994). Im Unterglasanbau der Tomate sind besonders in Hydroponik immer wieder Verluste durch den Erreger zu beobachten. Die Schwere der Schädigung ist von den jeweils gegebenen klimatischen Bedingungen abhängig, wird jedoch an der Tomate durch niedrige Temperatur (< 20 °C, Optimum 18 °C) und limitierte Lichtbedingungen begünstigt (JONES et al. 1990). Im Gegensatz zu *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* sind resistente Tomatensorten gegen FORL für den kommerziellen Anbau derzeit nicht verfügbar.

In den Niederlanden zeigten Untersuchungen, daß 78 Prozent der zur Wasserversorgung von Gewächs-

hauskulturen genutzten Regenwasserbecken mit FORL verseucht waren (RATTINK 1991). Tomatenkulturen können so durch kontaminiertes Gießwasser bereits sehr frühzeitig mit dem Erreger inokuliert werden. Durch Behandlung der Pflanzen mit antagonistisch wirkenden Bakterien, welche die Wurzeloberfläche bzw. Rhizosphäre besiedeln, könnte ein wirksamer Schutz gegen den Erreger aufgebaut werden. Im Gegensatz zum Boden, entwickelt sich in Hydrokultur die Mikroflora in der Rhizosphäre erst zu Beginn einer Kultur (VAN PEER und SCHIPPERS 1989), so daß zu diesem Zeitpunkt applizierte nützliche Mikroorganismen einer geringeren Konkurrenz ausgesetzt sind und sich daher besser etablieren können (POSTMA 1996).

Die nützliche Wirkung von antagonistisch wirkenden Mikroorganismen wurde vor allem in den letzten 30 Jahren intensiv untersucht (RAAIJMAKERS 2000). Im Ergebnis dieser Forschungen werden derzeit weltweit ca. 37 Produkte genannt, die auf der Basis pilzlicher oder bakterieller Mikroorganismen entwickelt wurden. Unter den Bakterien sind als Nutzorganismen *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. syringae*, *Streptomyces griseoviridis*, *Bacillus subtilis* und *Burkholderia cepacia* zu nennen.

Von den gram-negativen Bakterien wurden insbesondere *Pseudomonas* spp. hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und den zugrundeliegenden Mechanismen gegenüber Phytopathogenen intensiv untersucht (DEFAGO und KEEL 1995). Die Forschung konzentrierte sich hierbei sowohl auf die Analyse antimikrobieller Metabolite (MAURHOFER et al. 1992, THOMASHOW et al. 1990) als auch deren genetische Regulation (KRAUS und LOPER 1995, LAVILLE et al. 1992) sowie auf die ökologische Fitness unter Feldbedingungen (LATOUR et al. 1996, MAZZOLA et al. 1992). Im Vergleich zu den gram-negativen Bakterien wurden gram-positive Bakterien, wie *Bacillus* spp., weniger intensiv erforscht. In der Literatur sind jedoch verschiedene *Bacillus*-Stämme sowohl mit wachstumsfördernden Eigenschaften (RYDER et al. 1999, BOCHOW et al. 1995) als auch mit antagonistischer Aktivität gegenüber bodenbürtigen und samenbürtigen pilzlichen sowie bakteriellen Pathogenen beschrieben (ASAKA und SHODA 1996, BACKMAN 1995, KIM et al. 1997, KREBS et al. 1998, ZHANG et al. 1996). Im Vergleich zu den *Pseudomonas* spp. sind Bakterien der *Bacillus*-Gruppe aufgrund der Fähigkeit Sporen zu bilden gut technisch handhabbar. Neben Belegen für eine vielfältige Wirkung ist dies eine wichtige Voraussetzung für einen erfolgreichen Einsatz im biologischen Pflanzenschutz.

Ziel unserer Untersuchungen war die Selektion von effektiven Bakterien-Stämmen insbesondere der *Bacillus*-Gruppe mit krankheitsunterdrückender Wirkung gegen FORL an der Tomate in erdeloser Kultur. Nach FUNCK JENSEN (1995) sind die ökologischen Bedingungen, in denen ein biologisches Agenz eingesetzt werden soll, von großer Bedeutung für deren Etablierung und Wirksamkeit. Bei Mikroorganismen, die aus erdeloser Kultur isoliert werden, ist davon auszugehen, daß sie an die speziellen Bedingungen in solchen Systemen angepasst sind. Es wurden daher neben bereits charakterisierten *Bacillus*-Stämmen grampositive Bakterien aus erdeloser Kultur isoliert und getestet.

## Material und Methoden

### *Isolierung und Charakterisierung von Bakterien*

#### *Isolierung*

Die Isolierung von Bakterien insbesondere der *Bacillus*-Gruppe erfolgte von Tomatenwurzeln der Sorten 'Counter' und 'Pronto' nach fünfmonatiger erdeloser Kulturhaltung im Gewächshaus. Vergleichbar der Methode nach KLOEPPER et al. (1991) wurden die Bakterien von der Wurzeloberfläche mittels Trypic-Soy-Agar (TSA, SERVA 48080) und des selektiven Mediums Nähragar I (Merck 7881) unter Zusatz von Nystatin (30 mg/l, Cycloheximid 100 mg/l und Kaliumdichromat (100 mg/l) isoliert. Letzt genanntes Medium ist selektiv für gram-positive Bakterien.

#### *Antagonistische Aktivität in vitro*

Alle isolierten Bakterien (mit E gekennzeichnet) als auch die *Bacillus subtilis*-Isolate der Firma FZB Biotechnik GmbH (FZB24, 37, 38, 42 und 44) wurden auf ihre antagonistische Wirkung *in vitro* gegenüber Isolaten verschiedener formae speciales von *Fusarium oxysporum* (*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* FORL, *F. oxysporum* f. sp. *callistephi* FOC, *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* FOCY) in Dualkultur auf Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA, Merck 1.10130) und Standard II-Nähragar (Merck 7883) in Anlehnung an die Methode nach FILIPPI et al (1984) geprüft. Der Standard II-Nähragar wurde in der Hälfte der angegebenen Konzentration verwendet ($^1/_2$ N II). Die Prüfung erfolgte in vier Wiederholungen je Medium und Isolat. Als Maß für die antagonistische Aktivität wurde die Breite der Hemmzone ermittelt.

#### *Fettsäureanalyse*

Mikroorganismen, die *in vitro* eine antifungale Wirkung zeigten, wurden mittels Fettsäureanalyse charakterisiert. Die Extraktion der Lipide und Separation der Phospholipide erfolgte nach der Methode von SASSER (1990).

#### *Bestimmung des Lysotyps*

Als weiterer Parameter der Charakterisierung der isolierten Stämme wurde der Lysotyp bestimmt. Der Test, durchgeführt nach KREBS et al. (1998), erlaubt, anhand der Reaktion gegenüber Bakteriophagen, eine Differenzierung zwischen Stämmen. Die verwendeten Bakteriophagen (PZA, PZE, Pta, PZF, PA2, PC1, Phi3T, Ps40, SPP1, Ppt und Pp2) wurden von der FZB Biotechnik GmbH zur Verfügung gestellt.

#### *Prüfung der antagonistischen Wirkung in vivo*

Die antagonistische Wirkung gegen FORL wurde unter Gewächshausbedingungen an der anfälligen Tomatensorte 'Hildares' geprüft. Die mittlere Tages- und Nachttemperatur betrug 20 bzw. 18 °C. Kultiviert wurden die Tomaten in inertem Substrat (Quarzsand), wobei jede Variante 8 Wiederholungen umfasste, die randomisiert angeordnet waren.

Tab. 1. Durchschnittliche antifungale Wirkung (Hemmhof, HH) verschiedener Bakterien-Stämme gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL), *F. oxysporum* f. sp. *cyclaminis* (FOCY) und *F. oxysporum* f. sp. *callistephi* (FOC) auf Kartoffeldextrose-Agar (PDA) und Standard-Nähragar II (1/2 N II) nach zweiwöchiger Inkubation bei 25 °C *in vitro*
*Average antifungal activity (inhibition zone, HH) of different bacteria-strains against* Fusarium oxysporum *f. sp.* radicis-lycopersici *(FORL),* F. oxysporum *f. sp.* cyclaminis *(FOCY) und* F. oxysporum *f. sp.* callistephi *(FOC) on potato dextrose agar medium (PDA) and standard nutrient agar medium II (1/2 N II) after incubation time of two weeks at 25 °C* in vitro

| Bakterien-Stamm | HH [mm] auf PDA | | | HH [mm] auf 1/2 N II | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | FORL | FOCY | FOC | FORL | FOCY | FOC |
| E6 | 9,0 | 8,0 | 1,3 | 0 | 0 | 0 |
| E21 | 0 | 0 | 0 | 6,0 | 3,0 | 3,0 |
| E22 | 9,3 | 8,7 | 9,7 | 14,0 | 5,0 | 5,0 |
| E23 | 2,5 | 1,0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E26 | 1,0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| E28 | 5,0 | 0 | 0 | 8,0 | 0 | 3,0 |
| E44 | 0 | 0 | 0 | 8,0 | 15,0 | 0 |
| E61 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5,0 |
| E75 | 13,0 | 7,0 | 2,0 | 0 | 5,0 | 3,0 |
| FZB24 | 10,5 | 8,5 | 8,5 | 0 | 0 | 5,0 |
| FZB37 | 0 | 0 | 0 | 3,0 | 0 | 10,0 |
| FZB38 | 10,0 | 8,5 | 11,0 | 0 | 0 | 0 |
| FZB42 | 11,0 | 10,0 | 11,0 | 3,0 | 4,0 | 3,0 |
| FZB44 | 9,5 | 8,5 | 10,0 | 0 | 0 | 0 |

Die Aussaat der Tomaten erfolgte ebenfalls in Quarzsand. Im 2-Blattstadium wurden jeweils drei Keimlinge in die Versuchsgefäße (∅ 9 cm²) gepflanzt. Sechs (Versuch 1) bzw. neun (Versuch 2) Wochen nach der Inokulation mit FORL wurden die Frisch- und Trockenmassen von Spross und Wurzeln der Tomatenpflanzen bestimmt.

### *Inokulation mit F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Einen Tag vor der Pflanzung wurde das Substrat mit FORL inokuliert, wobei eine Dichte von $10^5$ Mikrokonidien/g Quarzsand eingestellt wurde. Der Einfluss der Konidiendichte ($10^4$; $10^5$; $10^6$; $10^7$ Konidien/g Quarzsand) auf das Pflanzenwachstum wurde zuvor geprüft.

Die Mikrokonidien wurden in Kartoffel-Dextrose-Brühe (PDB, SIGMA P-6685) produziert. Zur Erhaltung der Pathogenität wurde das FORL-Isolat (F 48) eine Woche vor der Inokulation der PD-Brühe auf Wasseragar bei 8 °C angezogen. Die Inokulation der PD-Brühe erfolgte mit Myzelmaterial der Wasseragarplatte. Für eine Woche wurde die beimpfte PD-Brühe bei 25 °C im Schüttelinkubator kultiviert.

Zur Herstellung der Mikrokonidiensuspension wurde das Myzel aus der PD-Brühe abgesiebt und die Konidien einmal mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (0,3 %) gewaschen. Die Bestimmung der Anzahl der Mikrokonidien erfolgte anschließend mikroskopisch mittels eines Haemocytometers.

### *Bakterisierung*

Nach der Pflanzung wurde jede Tomatenpflanze (2-Blattstadium) mit 20 ml der zu testenden Bakteriensuspension ($10^7$ cfu/ml) angegossen. Die Anzucht der Bakterien erfolgte zuvor für 48 h in Nährbouillon (Merck 1.05443) im Schüttelinkubator bei 28 °C. Die Suspensionen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung (0,3 %) gewaschen und durch Ausplattieren die Keimzahl bestimmt, die auf jeweils $10^7$ cfu/ml in der Suspension eingestellt wurde. Die FZB-Stämme standen als Granulat zur Verfügung, was eine einfache Handhabung bei der Herstellung der Suspensionen erlaubte. Die *Bacillus subtilis*-Stämme wurden ebenfalls in der Keimdichte von $10^7$ cfu/ml appliziert.

Folgende Bakterien-Stämme wurden *in vivo* im Jungpflanzentest gegen FORL geprüft: E6; E21; E22; E23; E26; E28; FZB24, FZB37; FZB38; FZB42 und FZB44. Die Stämme, die eine krankheitsunterdrückende Wirkung gegen FORL zeigten, wurden in einem weiteren Versuch nochmals getestet.

## Ergebnisse

### *Charakterisierung der Bakterien in vitro*

In Tabelle 1 sind von den insgesamt 145 aus erdeloser Kultur isolierten Bakterien nur die Ergebnisse der Stämme, einschließlich der *B. subtilis*-Stämme der FZB Biotechnik GmbH, aufgeführt, die gegenüber einer der formae speciales von *F. oxysporum* eine antifungale Wirkung zeigten.

Von den geprüften Bakterien-Isolaten zeigten lediglich die Stämme E22 und FZB42 auf beiden Medien gegenüber allen geprüften formae speciales von *F. oxysporum* eine antagonistische Wirkung. Die Hemmung des Myzelwachstums von FORL durch den Stamm E22 auf 1/2 N II-Agar war im Vergleich zu FOCY und FOC deutlich höher. Auf PDA zeigten die drei *F. oxysporum*-Isolate gegenüber den antagonistisch wirkenden Metaboliten von FZB42 eine höhere Sensitivität im Vergleich zu dem nährstoffärmeren Medium 1/2 N II.

In der Empfindlichkeit zwischen den formae speciales waren auf beiden Medien keine deutlichen Unterschiede zu beobachten.

Die Hemmung des Myzelwachstums der einzelnen *Fusarium*-Isolate durch die antagonistisch wirkenden Metabolite eines Bakterien-Stammes erfolgte in verschiedener Intensität. Auffallende Sensitivitätsunterschiede zeigten sich bei den Isolaten FORL und FOC gegenüber den Metaboliten von E6 und E75 auf PDA bzw. FZB37 und E22 auf 1/2 N II (Tab. 1). FORL wurde stärker von den Isolaten E6 und E75 auf PDA im Vergleich zu FOC gehemmt. Sehr empfindlich gegenüber den Metaboliten von E44 reagierte FOCY auf 1/2 N II. Im Gegensatz dazu wurde das Myzelwachstum von FOC durch den Stamm E44 nicht unterdrückt.

Das Wachstum von FORL auf PDA wurde bei Auftreten einer Hemmwirkung durch die geprüften Bakterien am stärksten gehemmt.

Die Bakterien E21, E44, E61 und FZB37 verursachten eine Reduktion des Myzelwachstum von *Fusarium* zwar auf 1/2 N II-Agar jedoch nicht auf PDA. Umgekehrt gilt dies für die Stämme E6, E23, E26, FZB38 und FZB44.

Die Bakterien E23, E26 und E61 zeigten insgesamt nur eine schwache antagonistische Wirkung auf den Testmedien.

Anhand der Fettsäureanalyse war der Stamm E75 *Pseudomonas aeruginosa* und der Stamm E44 *P. putida* zuzuordnen. Die Similaritätskoeffizienten von 0,94 und 0,76 zeigten eine gute Übereinstimmung zu den in der Datenbank charakterisierten Bakterien (Tab. 2). Bei den Stämmen E6, E21, E22, E23, E26, E28 und E61 handelt es sich um gram-positive sporenbildende Bakterien, deren Zuordnung zur *Bacillus*-Gruppe durch die Fettsäureanalyse bestätigt wurde. Der Similaritätskoeffizient des ermittelten Fettsäuremusters zu den gegebenen taxonomischen Vorschlägen zeigte keine hohe Übereinstimmung für die Stämme E6, E21, E23 und E26, so daß mit dieser Methode keine Artbestimmung möglich war. Zur genauen taxonomischen Charakterisierung müssten weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Die Stämme E28 und E61 konnten mit relativ hoher Sicherheit der Species *B. subtilis* zugeordnet werden.

Tab. 2. Charakterisierung von Bakterien mittels Fettsäureanalyse
*Characterization of bacteria by fatty acid analysis*

| Bakterien-stamm | Vorschlag der taxonomischen Zuordnung | Similaritäts-koeffizient* |
|---|---|---|
| E6 | *Paenibacillus alvei* | 0,188 |
| E21 | *Bacillus pumilus* | 0,310 |
| E22 | *Paenibacillus macerans* | 0,506 |
| E23 | *Paenibacillus macerans* | 0,288 |
| E26 | *Paenibacillus macerans* | 0,251 |
| E28 | *Bacillus subtilis* | 0,658 |
| E44 | *Pseudomonas putida* | 0,764 |
| E61 | *Bacillus subtilis* | 0,687 |
| E75 | *Pseudomonas aeruginosa* | 0,942 |

*Der Similaritätskoeffizient gibt die Übereinstimmung zu den in der Datenbank vorhandenen charakterisierten Mikroorganismen an. Bei einem Wert von > 0,5 ist von einer guten Übereinstimmung auszugehen.

Die Bestimmung des Lysotyps erlaubt eine Differenzierung von Stämmen und wurde daher für die Bakterien E6, E21, E22, E23, E26 und E28 durchgeführt. Die Reaktionen der *B. subtilis*-Stämme FZB24, 37, 38, 42 und 44 gegenüber den Bakteriophagen wurden bereits beschrieben (KREBS et al. 1998).

Die Stämme E21 und E28 sowie E23 und E26 zeigten gegenüber den geprüften Bakteriophagen identische Muster an Lysiszonen (Tab. 3). Im Vergleich zum Stamm E21 oder E28 unterscheidet sich der Stamm E22 in der Empfindlichkeit gegenüber den Bakteriophagen Phi3T und Pp2. Der Stamm E6 weicht nur in der Reaktion gegenüber dem Phagen Ps40 von den Lysisreaktionen der Stämme E23 und E26 ab.

### *Prüfung der antagonistischen Wirkung in vivo*

#### *Einfluss der Inokulumdichte von F. oxysporum f. sp. radicis-lycopersici auf das Wachstum der Tomate*

Für die Prüfung der Wirksamkeit von Bakterien gegen FORL an Tomatenjungpflanzen ist die Wahl einer geeigneten Inokulumdichte des Erregers eine wichtige Voraussetzung. Bei einer zu hohen Inokulumdichte ist keine Wirksamkeit der Antagonisten zu erwarten. Vor der Prüfung der Mikroorganismen wurde daher der Einfluss der Konidiendichte von FORL (Isolat F 48) auf das Pflanzenwachstum der Tomatensorte 'Hildares' geprüft (Tab. 4).

In der Variante, inokuliert mit $10^4$ Konidien/g Quarzsand war bei einer Gesamttrockenmasse von 2,01 g/Pflanze eine Verminderung um 16 Prozent und in der Variante, inokuliert mit $10^5$ Konidien/g Quarzsand, mit

Tab. 3. Charakterisierung von Stämmen der *Bacillus*-Gruppe als Lysotypen mit Hilfe von Bakteriophagen
*Characterization of strains of* Bacillus*-group as lysotypes by bacteriophages*

| Bakterien-Stamm | Bakteriophagen | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | PZA | PZE | Pta | PZF | PA2 | PC1 | Phi3T | Ps40 | SPP1 | Ppt | Pp2 |
| E6 | O | O | O | O | X | O | O | O | O | O | X |
| E21 | X | X | X | X | O | O | O | X | O | O | O |
| E22 | X | X | X | X | O | O | X | X | O | O | X |
| E23 | O | O | O | O | X | O | O | X | O | O | X |
| E26 | O | O | O | O | X | O | O | X | O | O | X |
| E28 | X | X | X | X | O | O | O | X | O | O | O |

(X = Reaktion; O = keine Reaktion)

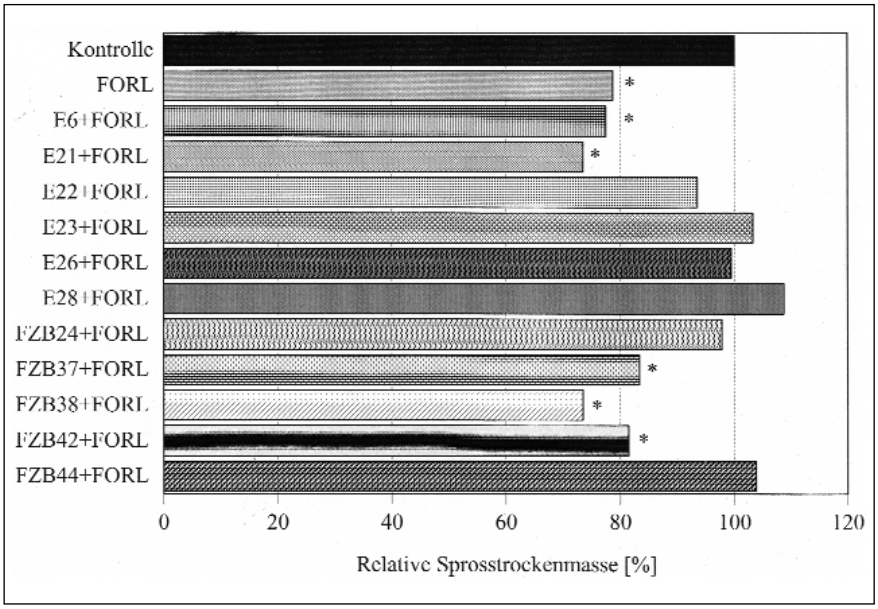



Abb. 1. Relative Sprosstrockenmasse der Tomate 'Hildares' 6 Wochen nach Inokulation mit *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL, Isolat F 48) und Bakterisierung mit verschiedenen Bakterien-Stämmen (*Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle, Newman-Keuls-Test, $p < 0,1$)
*Relative shoot dry mass of tomato 'Hildares' six weeks after inoculation with* Fusarium oxysporum *f. sp.* radicis-lycopersici *(FORL, isolate F 48) and bacterization by different bacteria-strains (*significant in comparison to control, Newman-Keuls-test, $p < 0,1$)*

1,95 g/Pflanze eine Reduktion von nahezu 18 Prozent zu verzeichnen. In diesen Varianten war mit 1,55 und 1,56 g/Pflanze jedoch signifikant nur die Sprosstrockenmasse um 22 bzw. 21 Prozent reduziert. Das Wurzelwachstum war signifikant erst nach Inokulation von $10^6$ bzw. $10^7$ Konidien/g Quarzsand beeinflusst. In diesen Varianten (4 und 5) wurde eine Biomasse von 1,04 und 0,11 g/Pflanze ermittelt, die damit im Vergleich zur Kontrolle um 56 bzw. 95 Prozent vermindert war (Tab. 4).

Tab. 4. Trockenmasse von Spross (STM), Wurzel (WTM) und Gesamttrockenmasse (BTM) der Tomate 'Hildares' in Abhängigkeit von der Inokulumdichte von *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (F 48) sieben Wochen nach der Inokulation *Shoot (STM), root dry mass (WTM) and biomass (BTM) of tomato 'Hildares' in dependent of inoculum density of* Fusarium oxysporum *f. sp.* radicis-lycopersici *(F 48) seven weeks after inoculation*

| Inokulumdichte (Konidien /g Quarzsand) | STM (g/Pfl.) | WTM (g/Pfl.) | BTM (g/Pfl.) |
|---|---|---|---|
| 1 Kontrolle | 1,97 | 0,42 | 2,39 |
| 2 FORL $10^4$ | 1,55* | 0,46 | 2,01 |
| 3 FORL $10^5$ | 1,56* | 0,39 | 1,95 |
| 4 FORL $10^6$ | 0,85* | 0,19* | 1,04* |
| 5 FORL $10^7$ | 0,09* | 0,02* | 0,11* |

* Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (Newman-Keuls-Test, $p < 0,1$)

Für die Prüfung der Wirkung der Bakterien gegen FORL wurde eine Inokulumdichte von $10^5$ Konidien/g Quarzsand gewählt.

*Wirkung der Bakterien gegen F. oxysporum f. sp. radicis-lycopersici in vivo*

Die Untersuchungen konzentrierten sich insbesondere auf die Selektion von antagonistisch wirkenden *Bacillus*-Stämmen, so daß in die Prüfung *in vivo* die *Pseudomonas*-Stämme E44 und E75 nicht mit einbezogen wurden. Der Stamm E75 (*P. aeruginosa*) war außerdem als humanpathogenes Isolat von weiteren Anwendungen auszuschließen. Der Stamm E61 zeigte *in vitro* keine antagonistische Wirkung gegen FORL und wurde ebenfalls nicht *in vivo* getestet.

Im ersten Versuch war die Sprosstrockenmasse der Tomate durch die Infektion mit FORL nach ca. sechs Wochen Kulturdauer im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant um 21 Prozent reduziert (Abb. 1). Durch die Behandlung der Tomatenjungpflanzen mit den Bakterien-Stämmen E22, E23, E26, E28, FZB24 und FZB44 konnte die Wachstumsdepression, verursacht durch FORL, vermindert bzw. vollständig kompensiert werden. In diesen Behandlungsvarianten zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle in der Sprosstrockenmasse keine signifikanten Unterschiede (Abb. 1). Nach Bakterisierung mit den Stämmen E6, E21, FZB37, FZB38 und FZB42 war keine krankheitsunterdrückende Wirkung gegen FORL zu beobachten.

Bakterien mit einer krankheitsunterdrückenden Wirkung wurden nochmals gegen FORL an Tomatenjungpflanzen geprüft. Nach einer Kulturdauer von neun Wochen war die Sprosstrockenmasse in diesem Versuch durch FORL signifikant um 76 Prozent vermindert (Abb. 2). Im Vergleich zum Versuch 1 war damit ein sehr hoher Befallsdruck gegeben. In allen bakterisierten Varianten (E22, E23, E26, E28, FZB24 und FZB44) konnte der Pathogeneinfluss auf das Tomatenwachstum deutlich reduziert werden. Der Stamm FZB24 zeigte im Vergleich zu den anderen Bakterienstämmen in diesem Versuch die geringste Effektivität.

Nach Behandlung der Pflanzen mit den Isolaten E28 oder FZB44 waren insgesamt die besten krankheitsunterdrückenden Effekte zu beobachten.

## Diskussion

In der Literatur wurden bereits Ergebnisse zur biologischen Bekämpfung von FORL durch Einsatz von pilzlichen Mikroorganismen wie apathogene *Fusarium*-Isolate oder *Trichoderma harzianum* vorgestellt (VAN STEEKELENBURG 1990, LEMANCEAU und ALABOUVETTE

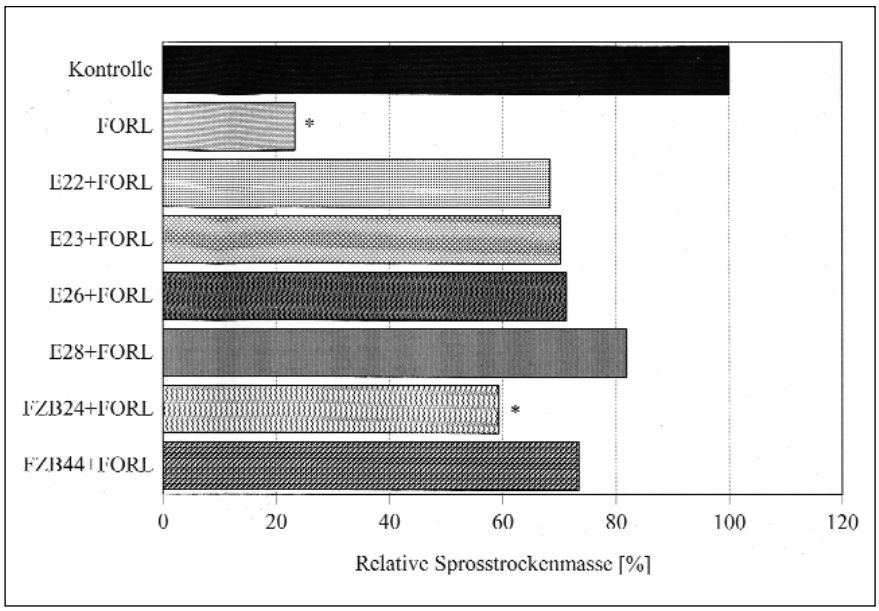



Abb. 2. Relative Sprosstrockenmasse der Tomate 'Hildares' 9 Wochen nach Inokulation mit *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* und Bakterisierung mit verschiedenen Bakterien-Stämmen (*Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle, Newman-Keuls-Test, $p < 0,1$)
*Relative shoot dry mass of tomato 'Hildares' nine weeks after inoculation with* Fusarium oxysporum *f. sp.* radicis-lycopersici *(FORL, isolate F 48) and bacterization by different bacteria-strains (*significant in comparison to control, Newman-Keuls-test, $p < 0,1$)*

1991). Erdelose Kulturverfahren bieten in bezug auf Applikation und Verbreitung günstige Voraussetzungen für den Einsatz von Bakterien.

Untersuchungen zur Mikroflora von BERKELMANN (1991) und VAN PEER und SCHIPPERS (1989) zeigten, daß in Hydroponik insbesondere *Pseudomonaden* vorkommen. Aus den von uns untersuchten Zufallsproben aus erdeloser Kultur wurden auch Bakterien der *Bacillus*-Gruppe isoliert (Tab. 2), die *in vitro* gegenüber verschiedenen formae speciales von *F. oxysporum* eine antifungale Wirkung aufwiesen (Tab. 1). Die Untersuchungen erlauben keine Aussagen dazu, ob die isolierten Bakterien charakteristisch bzw. von Bedeutung sind für erdelose Systeme. Es ist jedoch davon auszugehen, daß die Bedingungen in Hydroponik auch für Bakterien der *Bacillus*-Gruppe nicht ungünstig sind.

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen zeigten eine unterschiedliche Sensitivität der geprüften formae speciales von *F. oxysporum* gegenüber den antagonistisch wirkenden Metaboliten eines Bakterium-Stammes. Vergleichbare Ergebnisse waren nach Prüfung der antifungalen Wirkung gegenüber verschiedenen *Pythium* spp. zu beobachten (GROSCH et al. 2001). Für den praktischen Einsatz eines biologischen Agenz ist eine Wirkung gegen mehrere Zielpathogene vorteilhaft, doch eine optimale Wirkung wird nicht in gleicher Weise gegenüber einer Vielzahl pilzlicher Erregerarten zu erreichen sein.

Ebenfalls war zu beobachten, daß das Ausmaß der Hemmung des Myzelwachstums *in vitro* deutlich vom gewählten Medium und damit vom Nährstoffangebot bestimmt wurde (Tab. 1). GUPTA und UTKHEDE (1987) wiesen bereits darauf hin, daß die Bildung antifungaler Metabolite durch *B. subtilis* von bestimmten Nährstoffkombinationen beeinflusst werden kann.

In der Rhizosphäre von erdelosen Kulturen sind die Wurzelexsudate die Hauptnährstoffquelle für Mikroorganismen und beeinflussen somit die Bildung von antagonistisch wirkenden Metaboliten. Die Selektion von wirksamen Stämmen der *Bacillus*-Gruppe könnte verbessert werden, wenn zum einen Kenntnisse darüber vorhanden wären, welche antifungalen Metabolite für die krankheitsunterdrückende Wirkung *in vivo* von Bedeutung sind und zum anderen welche Nährstoffe für deren Bildung essentiell sind. Bei effektiven *Pseudomonas*-Stämmen hat sich gezeigt, daß z.B. 2,4-Diacetylphloroglucinol für die krankheitsunterdrückende Wirkung gegen bodenbürtige Pathogene verantwortlich ist (ZALA et al. 1997). Ein Peptid, ähnlich dem Bacillomycin-D, konnte bei *in vitro* antifungal wirkenden *B. subtilis*-Stämmen isoliert werden, doch deren Nachweis *in vivo* war bisher nicht möglich (KREBS et al. 1996).

Die Bildung bestimmter Peptidmetabolite ist sowohl qualitativ als auch quantitativ eine stammspezifische Eigenschaft. Der Lysotyp der Stämme E21und E28 entsprach dem Lysotyp der *B. subtilis*-Stämme FZB24 und FZB42 (KREBS et al. 1998). Insgesamt zeigten diese Stämme jedoch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine unterschiedliche antifungale Wirkung gegenüber FORL. Im Gegensatz dazu war die Reaktion der Stämme E6 und FZB38 mit gleichem Lysotyp sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gegenüber FORL vergleichbar. Schlussfolgernd kann anhand des Lysotyps nicht auf eine vergleichbare antifungale Wirkung weder *in vitro* noch *in vivo* gegenüber FORL geschlossen werden. Ein effektives Screening von antifungal wirkenden Mikroorganismen kann nur erfolgen, wenn die direkten Wirkmechanismen *in vivo* bekannt sind und Korrelationen zu Ergebnissen von *in vitro* Versuchen bestehen.

Für die Prüfung von Bakterien-Stämmen *in vivo* ist die Wahl einer geeigneten Inokulumdichte des Erregers von Bedeutung. Unter Praxisbedingungen baut sich das Infektionspotential, ausgehend von überdauerndem Inokulum, zu Beginn der Kultur erst auf. Durch den Einsatz von Antagonisten soll dies verhindert werden. Der Einfluss von FORL auf das Pflanzenwachstum der Tomate war von der Inokulumdichte abhängig (Tab. 4), wobei Spross- und Wurzelmasse nicht in gleicher Weise beeinflusst waren. Die Sprossmasse wurde vor der Wurzelmasse signifikant reduziert. Dies weist darauf hin, daß durch die Infektion mit FORL die Funktion der Wurzel in bezug auf Nährstoff- oder Wasseraufnahme primär beeinflusst wird und nicht das Wurzelwachstum selbst. Es ist jedoch auch möglich, daß die mit FORL

infizierte Wurzel zunächst einen größeren 'sink' für Assimilate darstellt und daher für das Sprosswachstum weniger Assimilate zur Verfügung stehen. Untersuchungen zur Assimilatverteilung nach Infektion mit FORL könnten diese Fragen beantworten.

Die Versuchsergebnisse bestätigen, daß durch Behandlung von Tomatenjungpflanzen mit geeigneten Bakterienstämmen eine krankheitsunterdrückende Wirkung gegen FORL erreicht werden kann (Abb. 1 und 2). Es können jedoch keine Aussagen dazu gemacht werden, ob die Effekte der eingesetzten Bakterien auf eine direkte antagonistische Wirkung gegen FORL, auf induzierte Abwehrreaktionen der Pflanze oder eine Stimulation des Pflanzenwachstums durch die Bakterien zurückzuführen sind. Eine Förderung des Pflanzenwachstums war in bereits durchgeführten Versuchen nur nach Bakterisierung der Tomaten mit den Stämmen E22 und FZB44 in erdeloser Kultur zu beobachten und nicht nach Behandlung mit den Stämmen E23, E26, E28 und FZB24, so daß die Wirkung dieser Stämme auf einer antagonistischen Aktivität gegen FORL in der Rhizosphäre beruhen könnte (GROSCH et al. 1999).

In beiden Versuchen wurde nicht geprüft, ob durch die Bakterisierung die Infektion der Wurzeln mit FORL verhindert werden konnte. Es ist jedoch davon auszugehen, daß infolge der antifungalen Wirkung der Bakterien das Krankheitspotential vermindert und der Infektionsprozess, einschließlich der Ausbreitung des Erregers in der Wurzel, insgesamt verzögert wurde. Dafür sprechen die Ergebnisse des Versuches 2, in welchem in allen bakterisierten Varianten eine reduzierte Biomasse zu beobachten war (Abb. 2). In diesem Versuch konnte der Erregereinfluss, infolge des hohen Befallsdruckes, durch die Bakterisierung nicht vollständig kompensiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Anwendung eines effektiven Isolates der *Bacillus*-Gruppe Teil der Bekämpfungsstrategie von Wurzelpathogenen in erdeloser Kultur sein kann. Stämme der *Bacillus*-Gruppe sind, aufgrund ihrer Fähigkeit Sporen zu bilden, gut zu formulieren. Von der FZB Biotechnik wurde ein Verfahren zur Formulierung von *Bacillus*-Stämmen entwickelt, so daß geeignete Stämme gegen Pathogene wie FORL als formulierte Produkte zur Verfügung gestellt werden könnten.

Die Untersuchungen wurden durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (Förderkennzeichen 0311047) unterstützt.
Für die sorgfältige Durchführung der Versuche danken wir Kerstin Fischer und Uwe Rieckmann.

## Literatur

ASAKA, O. and M. SHODA 1996: Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmemtal Microbiology (Nov.). 4081-4085.

BACKMAN, P. A. 1995: Development and commercialisation of *Bacillus subtilis* (GB03) as rhizosphere inoculant. Abstract XIII Internat. Plant Protec. Congress. The Hague, The Netherland 02-07 July, 27

BERKELMANN, B. 1991: Charakterisierung der Bakterienflora und des antagonistischen Potentials in der zirkulierenden Nährlösung einer Tomatenkultur (*Lycopersicon esculentum* MILL.) in Steinwolle. Diss. des Fachbereiches Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen, Geisenheimer Berichte Bd. 10, 119S.

BOCHOW, H., S. DOLEJ, I. FISCHER and A. MELKAMU 1995: Plant health promoting effects by *Bacillus subtilis* and its mode of action. In: LYR, RUSSELL and SISSLER: Modern Fungicides and Antifungal Compounds, Intercept Ltd, Andover, Hampshire, UK, 549-554.

DEFAGO, G. and C. KEEL 1995: *Pseudomonads* as biocontrol agents of diseases caused by soilborne pathogens. In: HOKKANEN, H. M. T. and J. M. LYNCH (Eds.): Benefits and Risks of Introducing Biocontrol Agents. Cambridge University Press, England, 137-148.

FILIPPI, C., G. BAGNOLI, G. TREGGI and G. PICCI 1984: Antagonistic effect of soil bacteria on *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* (Prill and Dell.) Snyd. and Hans. I *In vitro* experimental and preliminary assays on carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). Plant and Soil 80, 119-125.

FUNCK JENSEN, D. 1995: Screening effective antagonists. Biological and integrated control of root diseases in soilless cultures, Fourth IOBC/EFPP Workshop.

GROSCH, R.; D. SCHWARZ; S. RUPPEL und A. KOFOET 1999: Einfluss bakterieller Mikroorganismen auf die Wurzelmorphologie der Tomate unter Pathogeneinwirkung. In: MERBACH, W., L. WITTENMAYER und J. AUGUSTIN (Eds.): Stoffumsatz im wurzelnahen Raum, 9. Borkheider Seminar zur Ökophysiologie des Wurzelraumes, B.G. Teubner, Stuttgart, Leipzig, 137-143.

GROSCH, R.; H. JUNGE; A. KOFOET 2001: Biological control of root pathogens in soilless culture. Acta Horticulturae 548, 393-400.

GUPTA, V. K. and R. S. UTKHEDE 1987: Nutritional requirements for production of antifungal substances by Enterobacter aerogenes and *Bacillus subtilis* antagonists of *Phytophthora cactorum*. J. Phytopath. 120, 143-153.

HARENDER, R. and I. J. KAPOOR 1994: Behaviour of tomato wilt pathogen (*Fusarium oxysporum* Schl.) in rhizosphere of some field crops. Annals of Agricultural Research; 15; 379-382.

JONES, J. P., S. S. WOLTZ and J. W. SCOTT 1990: Factors affecting development of *Fusarium* crown rot of tomato. Proc. Fla. State Hort. Soc. 103, 142-148.

KIM, D. S., R. J. COOK and D. M. WELLER 1997: *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology 87, 551-558.

KLOEPPER J. W., W. MAHAFFEE, J. A McINROY and P. A. BACKMAN 1991: Comparative analysis of isolation methods for recovering root-colonizing bacteria from roots. Bulletin SROP 14 (8), 252-255.

KRAUS, J., J. E. LOPER 1995: Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Appl. Environ. Microbiol. 61, 849-854.

KREBS, B., OCKHARDT, B. HÖDING, P. BENDZKO und P. ETZEL 1996: Peptide, ihre Herstellung und Verwendung sowie Mikroorganismus: – German patent an-

nouncement, reference mark: 19641213.7 (26.9. 1996).

KREBS, B.; B. HÖDING, S. KÜBART, M. ALEMAYEHU; H. JUNGE; G. SCHMIEDEKNECHT; R. GROSCH; H. BOCHOW and M. HEVEST 1998: Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 105 (2), 181-197.

LATOUR, X., T. CORBERAND, G. LAGUERRE, F. ALLARD and P. LEMACEAU 1996:. The composition of fluorescent *Pseudomonad* populations associated with roots is influenced by plant and soil type. Applied and Environmental Microbiology Vol. 62, No. 7, 2449-2456.

LAVILLE, J., C. VOISARD, C. KEEL, M. MAURHOFER, G. DEFAGO and D. HAAS 1992: Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1562-1566.

LEMANCEAU, P. and C. ALABOUVETTE 1991: Biological control of fusarium diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. Crop Protection 10, 279-286.

MAURHOFER, M., C. Keel, U. SCHNIDER, C. VOISARD, D. HAAS and G. DEFAGO 1992: Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on ist disease suppressive capacity. Phytopathology 82, 190-195.

MAZZOLA, M., R. J. COOK, L. S. THOMASHOW, D. M. WELLER and L. S. PIERSON III. 1992: Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2616-2624.

MENZIES, J. G. and W. R. JARVIS 1994: The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Plant Pathology 43, 378-386.

POSTMA, J. 1996: Mechanisms of disease suppression in soilless cultures. Bulletin OILB srop Vol. 19(6), 85-94.

RAAIJMAKERS, J. M. 2000: Antagonism against soilborne plant diseases – when does it lead to biocontrol? Book of Abstract to the International Conference on: Microbial Antagonism against Fungi, 13-15 June, Uppsala, 28.

RATTINK, H. 1991: Epidemiology of *Fusarium* crown and root rot in artificial substrate sytems. Medelingen Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent 56 (2b), 423-430.

RYDER, M. H., Z. YAN, T. E. TERRACE, A. D. ROVIRA, W. TANG and R. C. CORRELL 1999: Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and rhizoctonia root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. Soil Biology and Biochemistry 31, 19-29.

THOMASHOW, L. S., D. M. WELLER, R. F. BONSALL and L. S. PIERSON III. 1990: Production of the antibiotic phenazine-1-carboxylic acid by fluorescent Pseudomonas species in the rhizosphere of wheat. Appl. Environ. Microbiol. 56, 908-912.

SASSER, M. 1990: Identification of bacteria through fatty acid analysis. In: KLEMENT, Z., K. RUDOLPH and D. C. SANDS (Eds.): Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest, 199-204.

VAN PEER R. and B. SCHIPPERS 1989:. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. Can. J. Microbiol. 35. 456-463.

VAN STEEKELENBURG, N. A. M. 1990:. Effect of *Trichoderma harzianum* on incidence of Fusarium crown and root rot in rockwool-grown tomatoes. Biotic Interactions and Soil-borne Diseases. Proceedings First Conference European Foundation for Plant Pathology, 199-205.

ZALA, M., A. SHARIFI-TEHRANI, A. NATSCH, Y. MOENNE-LOCCOZ and G. DEFAGO 1997: Biocontrol of fungal root diseases by 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. 5. IOBC/OILB Workshop, Molecular Approaches in Biological Control.

ZHANG, S. A., W. M. XU, Z. YAN and R. H. MEI 1996: Research and commercialization of yield-increasing bacteria (YIB) in China. In: TANG, W. H., R. J. COOK and A. D. ROVIRA: Advances in Biological Control of Plant Diseases. China Agricultural University Press, Beijing, 47-53.

Eingereicht: 23. 04. 01/24. 07. 01

Anschrift der Verfasser: Dr. Rita Grosch und Dr. A. Kofoet, Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V., Abteilung Pflanzengesundheit, Theodor Echtermeyer Weg 1, D-14979 Großbeeren, e-mail: grosch@igzev.de und Dr. H. Junge, FZB Biotechnik GmbH, Glienicker Weg 185, D-12489 Berlin