

**Aus dem Institut für Phytopathologie  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**Einfluss mikrobieller Antagonisten auf den Befall mit *Phoma lingam* und  
*Verticillium dahliae* var. *longisporum* an Raps (*Brassica napus* L. var. *napus*)**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Agrar-und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**vorgelegt von  
M. Sc. Ing. agr Omar HAMMOUDI  
aus Latakia, Syrien**

**Kiel, August 2007**

Aus dem Institut für Phytopathologie  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Einfluss mikrobieller Antagonisten auf den Befall mit *Phoma lingam* und  
*Verticillium dahliae* var. *longisporum* an Raps (*Brassica napus* L. var. *napus*)**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Agrar-und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
M. Sc. Ing. agr. Omar HAMMOUDI  
aus Latakia, Syrien

Kiel, August 2007

---

Dekan:	Prof. Dr. Joachim Krieter
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. R.-U. Ehlers
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. J.-A. Verreet
Tag der mündlichen Prüfung:	19.07.2007

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Wirtschaftliche Bedeutung des Rapses</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. <i>V. dahliae</i></b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. <i>Phoma lingam</i></b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. Einsatz von mikrobiellen Antagonisten in Pflanzenschutz</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5 Saatgutbehandlung mit Antagonisten</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1. Chemikalien</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2. Nährmedien</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3. Organismen</b> .....	<b>15</b>
2.3.1. Pflanzen .....	15
2.3.2. Pflanzenpathogene .....	15
2.3.2.1. <i>Verticillium dahliae</i> .....	16
2.3.2.2. <i>P. lingam</i> .....	17
2.3.3. Antagonisten .....	17
2.3.3.1. Anzucht und Haltung der Bakterien .....	18
2.3.3.2. Anzucht und Haltung des <i>Gliocladium catenulatum</i> .....	19
<b>2.4. In vitro Antagonisten-Tests</b> .....	<b>19</b>
2.4.1. Dualkulturen zum Nachweis der Hemmwirkung .....	19
2.4.2. Test bakterieller Sterifiltrate gegen <i>V. dahliae</i> und <i>P. lingam</i> .....	20
<b>2.5. Saatgutbehandlungen mit antagonistischen Mikroorganismen</b> .....	<b>22</b>
2.5.1. Saatgutbehandlung mit Bakterien .....	22
2.5.2. Saatgut-Behandlung mit <i>Gliocladium catenulatum</i> .....	23
2.5.2.1. Optimierung der Saatgutinkrustierung von <i>G. catenulatum</i> .....	23
2.5.3. Lagerungsstabilität den Antagonisten .....	24
<b>2.6. Optimierung der Rapspflanzen mit den Pathogenen</b> .....	<b>24</b>
2.6.1. Inkubation mit Mikrosklerotien von <i>V. dahliae</i> .....	24
2.6.2. Inokulation der Keimblätter mit <i>P. lingam</i> .....	27
2.6.2.1. Inokulation mit <i>P. lingam</i> im BBCH 14/15 .....	27
2.6.3. Untersuchung der Hemmwirkung der Antagonisten gegen <i>P. lingam</i> .....	28
2.6.3.1. Untersuchung der Befallsminderung durch Besprühen der Keimblätter .....	28
2.6.3.2. Wirkung auf Befall an der Stängelbasis .....	29
2.6.4. Besiedlung von Rapskeimlingen durch Antagonisten .....	29
2.6.5. Untersuchung zum Einfluss einer Saatgutbehandlungen auf die Spross- und Wurzelbesiedlung der Antagonisten .....	29
2.6.6. Bestimmung der Wachstumsförderung .....	30
<b>2.7. Feldversuche</b> .....	<b>30</b>
2.7.1. Versuchstandort .....	30
2.7.2. Beizung des Saatgutes .....	31
2.7.3. Bestimmungen von Wachstumsparametern .....	31
2.7.4. Reisolierung der applizierten Antagonisten .....	32
2.7.5. Krankheitserreger des Blattapparates .....	32
2.7.6. Krankheitserreger des Wurzelhals- und Stängelbereiches .....	32
2.7.7. <i>Verticillium dahliae</i> .....	33
<b>2.8. Angabe meteorologischer Daten</b> .....	<b>34</b>
<b>2.9. Statistische Auswertung</b> .....	<b>36</b>

<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Ergebnisse der <i>in vitro</i> Tests .....</b>	<b>37</b>
3.1.1. Hemmung des Myzelwachstums von <i>P. lingam</i> und <i>V. dahliae</i> durch Antagonisten .....	37
3.1.2. Hemmung der Keimung bzw. Bildung von Mikrosklerotien von <i>V. dahliae</i> und der Pyknidiosporen von <i>P. lingam</i> .....	38
3.1.3. Test bakterieller Sterilfiltrate gegen <i>V. dahliae</i> und <i>P. lingam</i> .....	41
<b>3.2. Anwendung der Antagonisten gegen <i>P. lingam</i> im Spritzverfahren.....</b>	<b>44</b>
3.2.1. Wirkung der Antagonisten auf <i>P. lingam</i> – Befall der Keimlinge .....	44
3.2.2. Wirkung der Antagonisten auf den Stängelbefall von <i>P. lingam</i> .....	47
<b>3.3. Optimierung der Saatgutbehandlung .....</b>	<b>49</b>
3.3.1. Auswahl einer Behandlungsmethode .....	49
3.3.2. Besiedlung der Rhizosphäre von Keimpflanzen .....	51
3.3.3. Einfluss der Behandlungsdauer im Priming auf die Antagonistendichte .....	52
3.3.4. Einfluss der Behandlungsmenge im Priming auf die Antagonistendichte .....	54
3.3.5. Lagerstabilität nach Saatgutbehandlung durch Priming.....	54
3.3.6. Optimierung der Saatgutinkrustierung mit <i>G. catenulatum</i> .....	55
<b>3.4. Wirkung der Saatgutbehandlung auf Befall mit <i>P. lingam</i>.....</b>	<b>57</b>
3.4.1. Wirkung auf den Befall der Kotyledonen mit <i>P. lingam</i> .....	57
3.4.2. Einfluss der Inokulumsdichte der Priming-Behandlung des Saatgutes mit Antagonisten auf den <i>P. lingam</i> -Befall .....	58
3.4.2.1. Effekt auf den <i>Phoma lingam</i> - Kotyledonen-Befall .....	59
3.4.2.2. Effekte auf den <i>P. lingam</i> -Stängelbefall .....	60
<b>3.5. Wirkung der Saatgutbehandlung auf Befall mit <i>V. dahliae</i> unter Gewächshausbedingung .....</b>	<b>60</b>
3.5.1. Einfluss auf den Befallsverlauf mit <i>V. dahliae</i> .....	60
3.5.2. Einfluss der Inokulumsdichte auf den Befall mit <i>V. dahliae</i> .....	64
<b>3.6. Spross- und Wurzelbesiedlung durch die Antagonisten .....</b>	<b>67</b>
3.6.1. Besiedlung von Rapskeimlingen durch Antagonisten.....	67
<b>3.7. Auswirkung der Antagonisten auf das Pflanzenwachstum .....</b>	<b>71</b>
3.7.1. Einfluss der Antagonisten auf das Frisch- und Trockengewicht.....	71
3.7.2. Einfluss der Inokulumsdichte auf das Pflanzenwachstum .....	74
<b>3.8. Prüfung von <i>Serratia plymuthica</i> und <i>Gliocladium catenulatum</i> im Feldversuch ..</b>	<b>75</b>
3.8.1. Witterungsverlauf.....	75
3.8.2. Wirkung gegen <i>P. lingam</i> .....	75
3.8.3. Wirkung gegen <i>V. dahliae</i> .....	82
3.8.4. Wachstumsförderung.....	84
3.8.5. Auswirkung auf Ertrag und TKG .....	84
3.8.6. Besiedlung der Rhizosphäre mit <i>S. plymuthica</i> .....	85
3.8.7. Besiedlung der Rhizosphäre mit <i>Gliocladium catenulatum</i> .....	87
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>88</b>
<b>4.1. Überprüfung <i>in vitro</i>- Hemmwirkung ausgewählter Antagonisten.....</b>	<b>88</b>
<b>4.2. Saatgutbehandlung mit antagonistischen Mikroorganismen .....</b>	<b>90</b>
<b>4.3. Wirkung der Antagonisten gegen <i>Phoma lingam</i> .....</b>	<b>92</b>
<b>4.4. Biologische Bekämpfung von <i>V. dahliae</i> durch den Einsatz Antagonisten .....</b>	<b>94</b>
<b>4.5. Dosis-Wirkungsprinzip: Ein wichtiger Faktor in der biologischen Kontrolle phytopathogener Pilze .....</b>	<b>95</b>
<b>4.6. Etablierung ausgewählter Antagonisten an dem Rapswurzel.....</b>	<b>96</b>
<b>4.7. Wachstumsförderung .....</b>	<b>99</b>
<b>4.8. Feldversuche.....</b>	<b>100</b>

4.8.1. Effekte der Antagonisten unter Feldbedingungen .....	100
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>103</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>106</b>
<b>7. Literatur.....</b>	<b>109</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>122</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$	Signifikanzniveau
Abb.	Abbildung
Ad.	Aqua demin
BBCH	BBCH-Code (Hack et al., 1992)
BCA	Biological Control Agent
BHB	Befallshäufigkeit im Bestand
BSB	Befallsstärke im Bestand
BW	Befallswerte
CD	Czapek-Dox-Flüssigmedium
CDA	Czapek-Dox-Agar
cfu	Colony Forming Units (koloniebildende Einheiten)
Ø	Durchschnitt
dest.	destilliert
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
et al.	<i>et alteri</i> (lat., und andere)
G.Pf	gesunde Pflanzen
KAS	Kalkammonsalpeter
Ko	Kontrolle
MEA	Malzextrakt –Agar
NA	Nähragar
NPZ	Norddeutsche Pflanzenzucht
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
QMM	Quarzsand-Maismehl-Medium
rpm	rounds per minute
sL	sandiger Lehm
Tab.	Tabelle
TKG	Tausendkorngewicht
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
VDT	Volume of Diseased Tissue
v/v	Volumen pro Volumen
WFM	Wurzelfrischmasse
WMA	Waksman-Agar

## 1 Einleitung

### 1.1 Wirtschaftliche Bedeutung des Rapses

**Winterraps** (*Brassica napus* spp. *napus*) hatte bis vor wenigen Jahren dank seiner hohen Wettbewerbskraft gegenüber konkurrierenden Marktfrüchten einen festen Platz im Anbauprogramm der Marktfruchtbaubetriebe. Trotz der gegenwärtig niedrigen Produktpreise wurden die Anbauflächen in Deutschland weiter ausgedehnt. Aktuelle Prognosen gehen von einer Preisstabilität auf hohem Niveau aus, so dass mittelfristig mit einem weiteren Anstieg der Anbaufläche allein in Deutschland um 8 bis 10 % von derzeit 956.000 ha auf über 1 Mio. ha gerechnet wird (Anonymus, 1997a & b). Aus diesem Grund bleibt der Winterraps weiterhin eine bedeutende landwirtschaftliche Kulturpflanze.

Mit der Ausweitung der Rapsanbauflächen und der daraus resultierenden Tendenz zur einseitigen Fruchtfolge kam es in allen Rapsanbaugebieten zu einem verstärkten Auftreten pilzlicher Erkrankungen. Zu den im Raps wirtschaftlichen bedeutenden Schaderregern zählen *Phoma lingam*, *Sclerotinia sclerotium* und *Plasmodiophora brassica*. Insbesondere in Gebieten mit langjährigem Rapsanbau tritt verstärkt die durch *Verticillium dahliae* verursachte Rapswelke auf (Daebeler & Seidel, 1989). In den 80er Jahren nahm der Befall mit *V. dahliae* in Verbindung mit *P. lingam* im Schaderregerkomplex der „Krankhaften Abreife des Rapses“ weiter zu (Hornig, 1986; Ahlers, 1987; Chandelier & Fotre-Muller, 1989). Untersuchungen in diesem Zusammenhang haben gezeigt, dass in einigen Jahren *P. lingam* und in anderen Jahren *V. dahliae* vorherrschend war (Hornig, 1986; Ahlers, 1987). Unter mitteleuropäischen Bedingungen werden nennenswerte Ertragsverluste, besonders bei hohen Anteilen von Winterraps in der Fruchtfolge, dokumentiert (Zeise, 1990). Die Befallserhebungen erfolgen in der Praxis Ende Juni im Stadium BBCH 79/81 und konzentrieren sich bei der Bonitur auf die Symptome, die durch *P. lingam* verursacht werden (Buberl & Hoffmann, 1992). Da *V. dahliae* seine Fruchtkörper, mit denen der Pilz eindeutig diagnostiziert werden kann, zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt ausbildet, wird der Befall durch den Welkerreger häufig nicht erkannt. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die Krankheit viel stärker verbreitet ist, als bisher angenommen wurde (Hornig, 1986).



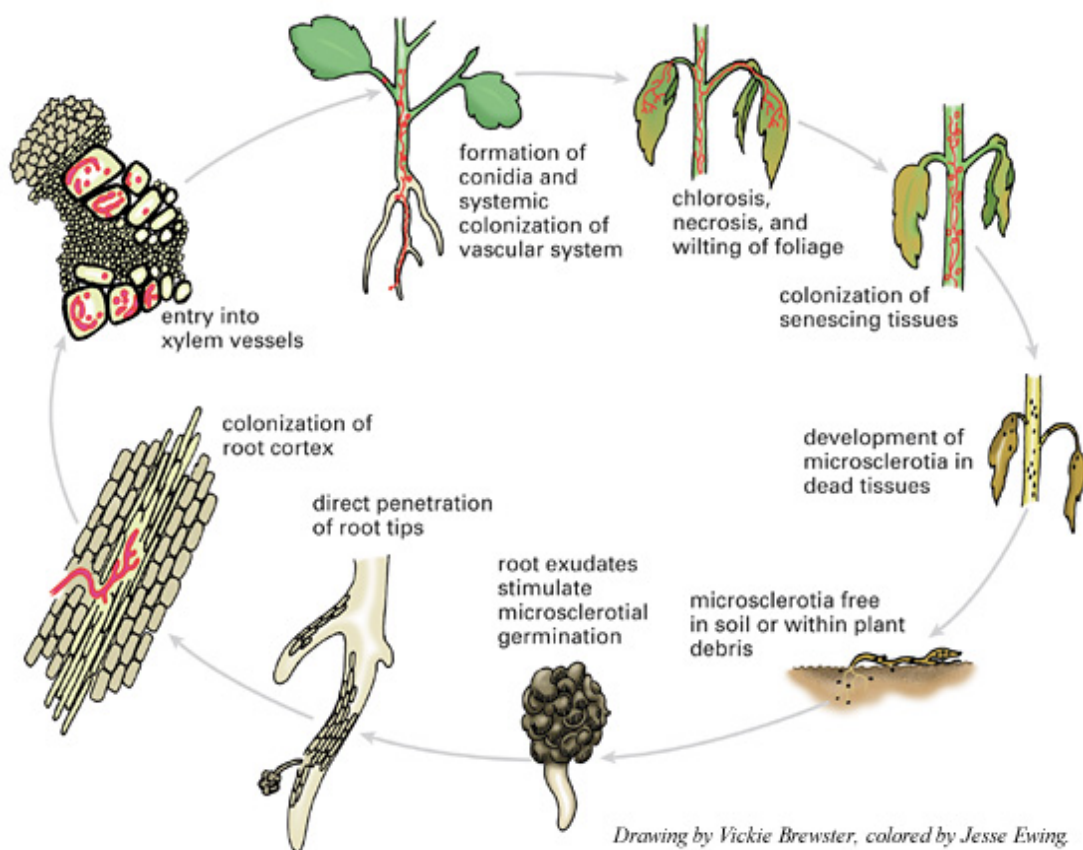
## 1.2 *V. dahliae*

*V. dahliae* wurde zuerst 1913 von Klebahn beschrieben, nachdem er den Pilz von Dahlien isolieren konnte (Isaac, 1967). Der isolierte Pilz ist ein ausschließlich bodenbürtiger Erreger (Paul & Günzelmann, 1989), der systematisch der Ordnung *Moniliales*, Formordnung *Hypomyces* der *Fungi Imperfecti* zugeordnet wird (Domsch et al., 1993). Der polyphage Deuteromycet befällt eine Vielzahl von Kulturpflanzen, unter denen sich neben Raps weitere landwirtschaftliche Kulturpflanzen wie z.B. Baumwolle, Tomate, Kartoffel, Sonnenblume, Pfeffer, Melone, Aubergine, Artischocke, Zuckerrübe, Erdbeere und Olive sowie viele Unkräuter befinden (Engelhard, 1957; Domsch et al., 1993; Berg, 1996). Obwohl *V. dahliae* einen breiten Wirtspflanzenkreis hat, zeichnet sich der Pilz durch eine hohe Wirtsspezifität aus. In neueren Untersuchungen zeigte sich, dass *V. dahliae*-Isolate aus Raps, im Gegensatz zu den haploiden Isolaten aus anderen Wirtspflanzen, stabil diploid sind. Die Isolate werden deshalb der Varietät *longisporum* mit ausschließlicher Pathogenität für Raps zugeordnet (Horiuchi et al., 1990). Mehrfach wurde durch Infektionsversuche die ausschließliche Besiedlung von Kreuziferen durch diploide Isolate von *V. dahliae* belegt (Cernusco, 1996; Zeise, 1995a; 1997b).

Die Primärinfektion des Rapses geht von den im Boden überdauernden 15 bis 200 µm großen Mikrosklerotien aus (Domsch et al., 1993). Myzelfractionen und Konidien sind sehr kurzlebig und haben für die Überdauerung des Pilzes im Boden keine Bedeutung (Schreiber & Green, 1963). Daebeler et al. (1989) und Krüger (1986) geben eine Lebensfähigkeit der Dauerorgane von 4 bis 5 Jahren an, während Wilhelm (1955), Isaac (1967) und Schnathorst (1981) Überdauerungszeiten im Boden ohne Keimruhe von bis zu 14 Jahren nachwiesen. Die Wurzelexudate der Wirtspflanze stimulieren die Keimung der Mikrosklerotien (Schreiber & Green, 1963). Bereits bei Bodentemperaturen ab 8 °C kann der Erreger im Herbst die jungen Rapspflanzen infizieren (Wittmann, 1971), wobei der Pilz in die unverletzte Wurzel der Pflanze mit Hilfe von Infektionshyphen eindringt (Daebeler et al., 1989). Nach Erreichen der Xylemgefäße im Innern des Wirts bereitet er sich durch die Bildung von Konidien passiv mit dem Transpirationsstrom sprossaufwärts aus (Garber & Houston, 1966).

Befallsverstärkend äußern sich synergistische Effekte mit Nematoden, wie *Pratylenchus* spp. oder *Meloidogyne* spp. (Scholte & S'Jacob, 1989; Bowers et al., 1996), bzw. mit Pilzpathogenen, wie *Rhizoctonia solani* KÜHN oder *Fusarium* spp. (Scholte & S'Jacob, 1989). Während der Vegetationszeit bleibt der Befall meist latent. Erste erkennbare

Krankheitssymptome, wie halbseitige Blatt- und Stengelchlorosen, werden zum Ende der Blüte im Spätfrühjahr sichtbar (Paul, 1990). Eine eindeutige Diagnose der Krankheit ist erst durch die typische, in Längsrichtung verlaufende Grauverfärbung von Stängelbasis und Hauptwurzel am Ende der Vegetationszeit möglich (Kürger, 1986). Eine Bonitur des Befall kann in der Praxis somit frühestens zum Entwicklungsstadium EC 85/87 bei Erscheinen von Mikrosklerotien unter der Epidermis im absterbenden Wirtsgewebe durchgeführt werden (Daebeler et al., 1985). Nach der Ernte werden die an den Stoppelresten anhaftenden Mikrosklerotien durch die Bodenberatung und dem Zerfall der Pflanzenreste im Boden verteilt und stellen dort wiederum die Hauptquelle für eine neue Infektion dar (Heale, 1988; Zeise, 1990). Die Beurteilung der Schadwirkung an der Kulturpflanze ist problematisch, weil am Krankheitsbild neben *V. dahliae* noch *P. lingam* beteiligt sein kann (Daebeler et al., 1985). Somit sind Aussagen über die Bedeutung dieser Krankheit nicht zuverlässig und müssen kritisch bewertet werden. In Untersuchungen von Ahlers (1987) sowie Daebeler et al. (1989) wurden vereinzelt Ertragsausfälle von 50% nachgewiesen, die durch *V. dahliae* als Folge der Reduzierung ertragsbildender Organe verursacht wurden.



**Abb. 1:** Lebenszyklus von *V. dahliae*

Möglichkeiten der Bekämpfung bestehen nicht. Ohne entsprechende Kontrollstrategien kommt es zur Anreicherung der Mikrosklerotien des Schadpilzes in betroffenen Böden (Tjamos et al., 2000), wodurch deren wirtschaftliche Nutzung als Anbaufläche stark eingeschränkt ist. Infolge fehlender Möglichkeiten dem Pathogen entsprechend entgegenzutreten, wurde *V. dahliae* als „High Risk Pathogen“ eingestuft (8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand, 2003). Besonders die Schwierigkeiten bei der Kontrolle bodenbürtiger Schaderreger wie *V. dahliae* zwingen zur Suche nach alternativen Bekämpfungsmöglichkeiten (Reyes & Dirks, 1985). Unter diesen Bedingungen erscheint die Entwicklung biologischer Verfahren aussichtsreich.

### **1.3 *Phoma lingam***

Der Erreger der Wurzelhals- und Stängelfäule, *Leptosphaeria maculans* (Desm) Ces. & de Not. [Anamorph *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm.] ist überall in den gemäßigten Zonen verbreitet und ein bekanntes Pathogen verschiedener Arten der Familie *Brassicaceae*. Neben den Pilzen *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cylindrosporium concentricum* und *Verticillium longisporum* gehört er zu den im Raps wirtschaftlich bedeutendsten Krankheitserregern.

Der Pilz wurde erstmals 1791 von Tode beschrieben. Da er in vertrockneten Stängeln von *Brassica oleracea rubra* gefunden wurde, ordnete ihn Tode zu den Saprophyten und nannte ihn *Sphaeria lingam*. 1849 isolierte Desmaziere den gleichen Pilz von lebenden Pflanzen der Gattung *Brassica* und benannte ihn *Phoma lingam* (Tode) Desm. (zit. Henderson 1918). Das zugehörige Perfektstadium zu *Phoma lingam* wurde von Müller & Tomasevic (1957) erkannt. Zuvor hatte Smith (1956) die Hauptfruchtform entdeckt, aber als *Leptosphaeria napi* (Fuckel) Sacc. bezeichnet. Smith & Sutton (1964) sowie Boerema & Van Kesteren (1964) gaben ihm schließlich den Namen *L. maculans*.

Beim Raps befällt dieser Erreger sämtliche Pflanzenteile in allen Entwicklungsstadien. In der Aufwuchsphase kann eine Infektion zum Umfallen der Sämlinge führen (Cunningham 1927, Ndimande 1976). Auf den Laubblättern entstehen zunächst Chlorosen, die dann in graue Runde bis ovale Nekrosen übergehen. Diese sind meist von einem dunklen Rand umgeben und vom gesunden Gewebe deutlich abgegrenzt. Auf diesen Nekrosen entstehen zahlreiche schwarze Pyknidien, deren Pykno-sporen mit Regenspritzen auf andere Blätter und Stängel verbreitet werden (Bokor et al. 1975, Petrie 1979). Läsionen am Stängel, die gewöhnlich im

Juni/Juli auftreten, ähneln denen am Laubblatt. Sie sind meist an Blattansatzstellen zu finden, aber auch Wundstellen (verursacht durch Schädlingsfraß von *Psylloides chrysocephalus*, *Ceutorhynchus napi* usw.) sind ideal für die Infektion (Ndimande 1976). Befallene Blütenstände und Hülsen bringen infizierte, meist geschrumpfte Samen hervor, die nicht auskeimen (Bokor et al. 1975). Der für den Ertragsverlust verantwortliche Wurzelhals- und Stängelbasisbefall führt meistens zur Schwärzung des Gewebes und schließlich zur Trockenfäule. Zusammen mit *S. sclerotiorum* und *V. dahliae longisporum* verursacht der Schaderreger den Komplex der sog. "Krankhaften Abreife" (Davies 1986, Hornig 1986, Frauen 1992, Amelung et al. 1996, Heppner & Heitfuß 1996). Oft sind es starke Einschnürungen am Stängelgrund, die schließlich zum Umknicken der Pflanzen führen. Bei einem starken Befall kann es aufgrund des geringen Tausendkorngewichtes und der unterschiedlichen Abreife zu Ertragseinbußen von 20-30% kommen (Busch 1987, Gladders 1995).

Die Ergebnisse der jüngsten Monitorings mit Hilfe eines für *L. maculans* entwickelten ELISA zeigten, dass der Pilz nach wie vor der am häufigsten vorkommende Erreger in Winterraps in Deutschland ist (Cernusko et al. 2000). Die Fähigkeit des Pilzes sich sowohl asexuell über Pyknidiosporen als auch sexuell über Ascosporen zu vermehren, stellt ein großes Verbreitungspotential dar. Nach der Ernte bildet der Pilz saprophytisch Pseudothezien auf abgestorbenem Pflanzenmaterial, in denen Ascosporen heranreifen, die mit dem Wind über größere Entfernung verfrachtet werden (Alabouvette & Brunin 1970, Petrie 1978). Sie sind das Primärinokulum und lösen einen frühen Herbstbefall an Blätter und am Wurzelhals aus (Wood & Barbetti 1977, McGee & Petrie 1979). Die asexuell gebildeten Pyknidiosporen, die durch Regen die Blattetagen und den Wurzelhals benachbarter Pflanzen besiedeln (Barbetti 1976, Evans 1988), werden sowohl mit der frühen Wurzelhalsinfektion als auch mit der sekundären Verbreitung in Verbindung gebracht (Feser 1992). In Gegensatz dazu spielt Myzel eine eher untergeordnete Rolle für die Primärinfektion. Nach einer erfolgten Primärinfektion an den Blättern kann der Pilz in den Stängel vordringen, wo es zu Vermorschungen kommt (Hammond 1985, Hill & Williams 1988, Williams 1992). Jedoch wäre eine solche Infektion von geringerer Ertragsrelevanz als eine frühe Primärinfektion am Wurzelhals bzw. an der Stängelbasis (Schramm 1989). Nach Duamkhanmanee (1996) liegen Hinweise auf bodenbürtige Erstinfektionen vor, die von befallenen Stoppelresten ausgehen, solange infektiöse Sporen gebildet werden. Daraus kann abgeleitet werden, dass der

Pilz effektiv durch die Verhinderung der Ausbildung von Asco- und Pyknidiosporen auf befallenen Ernterückständen bekämpft werden sollte.

Nach der Ernte müssen dazu die Stoppelreste eingepflügt und alle ackerbaulichen Maßnahmen ergriffen werden, um eine rasche Zersetzung befallener Pflanzenteile zu fördern (Gugel & Petrie 1992). Die Einhaltung eines Sicherheitsabstandes zum nächsten Altraps ist eine wichtige Voraussetzung für befallensfreie Bestände (Huges 1933; Bokor et al 1975, Ndimande 1976; McGee, et al. 1977). Häufig werden in Kanada, einem Land in dem *L. maculans* eine weitaus größere wirtschaftliche Bedeutung hat als in Deutschland, Anbaupausen von vier bis fünf Jahren eingehalten, weil der Abbau der Stoppeln im Feld, vor allem bei Trockenheit, bis zu fünf Jahre dauern kann. Auch durch eine Verzögerung der Aussaat kann (Neill 1929; Bokor et al. 1975; Barbetti et al. 1976; Schuster et al. 1980) den *Phoma*-Befall deutlich vermindert. Der Nutzen für den Praktiker ist jedoch gering, da sich die verspätete Aussaat in der Regel negativ auf den Ertrag auswirkt. Abb. 2 zeigt den Lebenszyklus von *L. maculans*

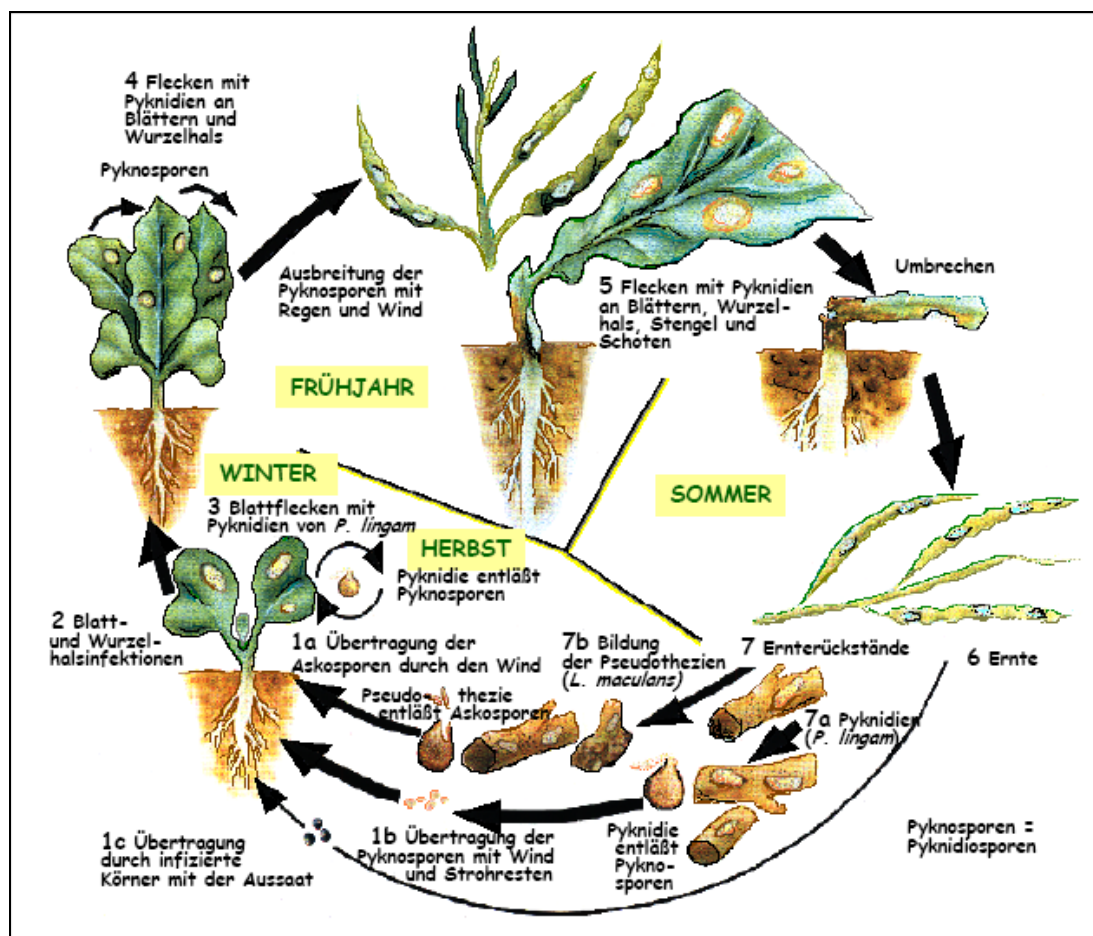


Abb. 2: Lebenszyklus von *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) (verändert nach Paul 1988).

Anstrengungen, die Wurzelhals- und Stängelfäule des Rapses chemisch zu bekämpfen, werden seit den 70er Jahren permanent unternommen. Die Möglichkeit, mit einer Beizung den Saatgutbefall mit *L. maculans* zu reduzieren, wurde bereits 1927 von Cunningham erkannt und befürwortet. Brunin (1972) berichtete einen effektiven Schutz der Keimpflanzen vor einer *L. maculans*-Infektion durch Saatgutpillierung mit hohen Aufwandmengen des systemischen Wirkstoffs Benomyl. Unter Freilandbedingungen waren jedoch positive Effekte selten erkennbar (Barbetti 1976; Brown et al., 1976; Gabrielson et al., 1977). Feser (1992) erzielte einen besseren Beizeffekt bei einer kombinierten Anwendung von systemischen und lokalsystemischen Wirkstoffen an der Gesamtpflanze. Allerdings konnten die Infektionen bereits eine Woche nach Feldaufgang durch Beizung nicht mehr signifikant reduziert werden. Die Ascosporen sind als Hauptinokulum für Primärinfektionen im Herbst anzusehen. Unter Laborbedingungen konnte eine Behandlung des Rapsstrohs mit verschiedenen Fungiziden die Pseudothecienbildung fast vollständig reduzieren und eine Behandlung mit Dinosab und Harnstoff das Ausschleudern der gebildeten Ascosporen verhindern (Humpherson-Jones & Burchill 1982). Jedoch brachten derartige Bekämpfungsmethoden mit Fungiziden unter Feldbedingungen keine statistisch absicherbare Wirkung (Rawlinson et al., 1984). Vor dem Hintergrund der steigenden Bedeutung von Direktsaat, vor allem in Westkanada, empfiehlt Petrie (1995) allerdings die Applikation von Glyphosat zur Unterdrückung des Inokulums. Fungizidapplikationen über das Blatt wurden von zahlreichen Autoren (u. a. Brown et al. 1976; Krüger 1982, Schramm 1989) zur Bekämpfung von *L. maculans* durchgeführt. Selbst die Applikation von Spezialfungiziden wie Sportak (Wirkstoff: Prochloraz) und Fungiziden mit wachstumsregulatorischem Effekt wie Folicur (Wirkstoff: Tebuconazol), Caramba (Wirkstoff: Metconazol) bei optimalen Spritzbedingungen hat nur eine begrenzte Wirkung gegenüber der Wurzelhals- und Stängelfäule (Fitt et al. 1997; Garbe 2000). Die kombinierte Anwendung von Folicur bzw. Caramba und dem Wachstumsregler Moddus (Wirkstoff: Trinexapacethyl) führte bisher auch zu keinem überzeugenden Ergebnis (Lindenberg 2001). Eine chemische Behandlung bei niedrigem und mittlerem Befall ist aus ökonomischen Gesichtspunkten oftmals nicht gerechtfertigt (Paul et al. 1991, Garbe 1994 & 2000, Thürwächter 1995, Wöppel 1995).

#### **1.4 Einsatz von mikrobiellen Antagonisten in Pflanzenschutz**

Eine Möglichkeit der Bekämpfung von *V. dahliae* ist der Einsatz biologischer Mittel. Davon ist eine Möglichkeit die Verwendung von Mikroorganismen, die in der Lage sind, das

Pathogen zurückzudrängen. Solche Mikroorganismen werden als BCAs (Biological Control Agents) bezeichnet. Ein möglicher Organismus wird dann als BCA eingestuft, wenn er mit dem Zielorganismus, der die Pflanze schädigt, so interagieren kann, dass dieser in seiner pathogenen Ausprägung unterdrückt wird. Das beinhaltet neben der allgemeinen Konkurrenz um Substrate und Raum, auch den direkten Einfluss auf das Wachstum und das Überleben des Schadorganismus (Chernin & Chet, 2002). Zudem besitzen einige Mikroorganismen neben der antagonistischen Wirkung noch die Fähigkeit, das Pflanzenwachstum zu fördern und Resistenzmechanismen in der Pflanze auszulösen, was die Attraktivität des Einsatzes von BCAs erhöht.

Weltweit gibt es nur wenige biologische Präparate für eine Bekämpfung von *V. dahliae* (z.B. Protus; PROPHYTA GmbH, Malchow/Pöhl), in Deutschland ist jedoch kein Präparat als Pflanzenschutzmittel zugelassen. Relativ intensiv wurde der pilzliche Antagonist *Talaromyces flavus* (Anamorph: *Penicillium vermiculatum* DANGEARD) zur biologischen Bekämpfung von *V. dahliae* untersucht. Durch eine Bodenbehandlung konnten Marois et al. (1982) den *V. dahliae*-Befall bei Aubergine um 67 bis 76 % reduzieren. Über das antibiotisch gegenüber *V. dahliae* wirkende Talaron von *T. flavus* berichteten Fravel et al. (1987). Kim et al. (1988) isolierten einen Metaboliten aus der Flüssigkultur von *T. flavus*, welcher das Wachstum und die Keimung der Mikrosklerotien von *V. dahliae* hemmte. Weiterhin wurden die pilzlichen Antagonisten *Gliocladium roseum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* und auch der schwach pathogene Erreger *Verticillium nigrescens* zur biologischen Bekämpfung von *V. dahliae* getestet (Keinath et al., 1991; Henni, 1988; Dutta, 1981).

Die Rhizosphäre ist die wurzelnahe Bodenschicht, die direkt durch den Metabolismus der Pflanze beeinflusst wird. Positive Ansätze zur Bekämpfung der *Verticillium*- Welke ergeben sich in den gemäßigten Breiten durch den Einsatz natürlich vorkommender, antagonistischer Rhizosphärenbakterien bzw. Pilze, die eine Infektion der Wurzel durch den Pilz verhindern können. Mikrobielle Antagonisten aus der Gruppe der Rhizosphärenbakterien sind besonders im Einsatz gegen bodenbürtige Erreger im Unterschied zu den pilzlichen Antagonisten in der Lage, die Wurzeln der jungen Pflanzen zu besiedeln und sie über einen längeren Zeitraum vor pilzlichen Pathogenen zu schützen. Von Wadi & Easton (1985) und Leben et al. (1987) wurden fluoreszierende Pseudomonaden als bakterielle Antagonisten gegen *V. dahliae* an Kartoffeln eingesetzt, die eine Steigerung des Pflanzenwachstums im Gewächshaus bewirkten. Eine *in vitro*-Wachstumshemmung von *V. dahliae* durch das Kulturfiltrat von

*Bacillus subtilis* wiesen Schreiber et al. (1988) nach. Berg & Ballin (1994) und Berg (1996) isolierten gegen *V. dahliae* *in vitro* wirksame Rhizosphärebakterien, die sie als *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. chlororaphis*, *Sphingomonas paucimobilis* (syn. *P. paucimobilis*), *Pantoea agglomerans* (syn. *Erwinia herbicola*) und *Stenothrophomonas maltophilia* (syn. *Xanthomonas maltophilia*) identifizierten. Knappe (1994) und Berg et al. (1994) testeten mit Erfolg ein *Stenothrophomonas maltophilia*-Isolat unter Gewächshausbedingungen im Einsatz gegen diesen pilzlichen Erreger. Auch *in vitro* wurden Untersuchungen der Wirksamkeit von Rhizosphäreisolaten des Rapses gegenüber *V. dahliae* durchgeführt. Insbesondere *Serratia*-Isolate konnten als potenzielle BCAs identifiziert werden (Berg et al., 2002). *Serratia plymuthica* wurde für eine Wachstumshemmung und antifungal Effekt gegen *Fusarium culmorum*, *Pythium* spp., und andere pilzliche Pathogene getestet (Alström & Gerhardson, 1988; Benhamou et al. 2000; Kalbe et al. 1996; Lottmann et al. 1999). Die Gruppe der *Serratien* gehört zu den Proteobakterien und sind neben der Gruppe der *Pseudomonas putida*-Isolate am häufigsten in der Rapsrhizosphäre vertreten (Berg et al., 2002). Entscheidende Eigenschaften in der Wirkung dieser Isolate *in vitro* war die Bildung von Antibiotika wie Pyrrolnitrin und Exoenzyme, wie Chitinasen und Glucanasen (Chernin & Chet, 2002). Weiterhin bildet ein Teil dieser Isolate Indol-3-Essigsäure (Auxin) und fördern dadurch das Pflanzenwachstum. Ein Beispiel für ein erfolgreiches Produkt eines *Serratia*-Isolates stellt Rhizostar<sup>®</sup> dar. Durch direkte Applikation an die Wurzel über ein Wurzeltauchbad wurden Erdbeerpflanzen präventiv vor einer möglichen Infektion durch *V. dahliae* geschützt. Zudem weist der Mikroorganismus *S. plymuthica* HRO-C48 noch zusätzlich eine wachstumssteigernde Wirkung bei Erdbeeren auf (Kurze et al., 2001). Zur Wirkung gegen *P. lingam* liegen allerdings bisher keine Untersuchungen vor. Kharbanda & Dahiya (1990) beobachteten, dass einige Stämme von *Penicillium verrucosum* ein für den Erreger toxisches Metabolit bilden. Petrie (1982) verwendete schwach virulente Isolate von *L. maculans* zur Unterdrückung starker Symptomausprägungen. Die Isolate *Pseudomonas fluorescens* RII2 und *Paenibacillus polymyxa* HA3e zeigten eine ausgeprägte Wirkung von 64% bzw. 72,6% (Zhao, 2001).

### 1.5 Saatgutbehandlung mit Antagonisten

Saatgutbehandlung bedeutet den Gebrauch und die Applikation biologischer, physikalischer oder chemischer Wirkstoffe und Techniken direkt am Saatgut, um dieses vor Insekten und samenbürtigen und frühsaisonalen Krankheiten zu schützen, die ohne eine angemessene Bekämpfung negative Konsequenzen für die Pflanzenproduktion haben können.



Saatgutbehandlung kann die Wachstumsbedingungen für den Samen, den Keimling und die Jungpflanze verbessern. Sie reicht von der Beizung bis zur Inkrustierung und Pilierung. Auch mikrobielle Antagonisten können in der Saatgutbehandlung eingesetzt werden, wobei ein sogenanntes "Bio-Priming" zum Einsatz kommen kann.

Die biologische Bekämpfung insbesondere von bodenbürtigen Schadpathogene sind zunehmend Ziel umfangreicher wissenschaftlicher Untersuchungen (Handelsman & Stabb 1996, Whipps 1997). Die meisten BCAs produzieren mehr als einen Wirkstoff und ihr selektiver Einsatzort minimiert den Selektionsdruck (Handelsman & Stabb 1996). Während die meisten Fungizide nur einen zeitlich begrenzten Effekt haben und gewöhnlich wiederholte Applikationen erfolgen müssen, haben BCAs die Fähigkeit, sich am Wirkungsort zu etablieren und eine nachhaltige Wirkung zu entwickeln (Sivan & Chet 1992). Bisher konnten nur wenige der in der Literatur als potentielle BCAs beschriebenen Rhizobakterien als Produkt bis zur Marktreife entwickelt werden. Ein Grund hierfür ist die mangelnde Wirksamkeit einiger biologischer Antagonisten und ihre begrenzte Vitalität, die eine Vermarktung erschwert (Whipps 1997, Shah-Smith & Burns 1996, Weller 1988).

Die Entwicklung geeigneter Formulierungsverfahren ist ein wesentlicher Faktor für die Wirksamkeit und Anwendung biologischer Pflanzenschutzmittel in der landwirtschaftlichen Praxis (Gasoni et al. 1998, Sivan & Chet 1992). Für den Verkauf eines Produktes muss es in einer Form vorliegen, die für den Anwender akzeptabel, d.h. einfach und ungefährlich ist (McIntyre & Press, 1991). Die Applikation sollte mit vorhandenen Geräten möglich sein und sich einfach in die landwirtschaftliche Praxis integrieren lassen (McIntyre & Press 1991). Gewünscht ist oft eine Lebensdauer von mindestens einem Jahr, um das Produkt erfolgreich im existierenden Handel zu vertreiben (Jones & Burges 1998). Durch Integration von Nährstoffen in die Formulierung ist es gelungen, BCAs einen selektivem Vorteil gegenüber den übrigen Mikroorganismen zu verschaffen (Sivan & Chet 1992). Formulierungen können in fester oder in flüssiger Form vorliegen (Jones & Burges 1998). Die meisten Methoden basieren auf der Nutzung von organischen oder anorganischen Trägern (Powell 1993).

Kloepper & Schorth (1980). Ein Gemisch aus Vermiculit und Weizenkleie wurde von Lewis & Lumsden (2001) zur Formulierung von *Trichoderma* spp. eingesetzt. Die Herstellung kostengünstiger und stabiler Formulierungen für gramnegative Bakterien (z.B. *Pseudomonas*) gestaltet sich aufgrund der fehlenden Fähigkeit zur Sporenbildung schwieriger als für grampositive Bakterien (z.B. *Bacillus*, *Streptomyces*) und stellt eine große Herausforderung dar (Emmert & Handelsmann 1999).

Viele Methoden werden zur Zeit entwickelt, um BCAs zum Einsatz zu bringen (Jackson et al 1995; Lewis 1991; Lumsden et al 1995 & Papavizas et al 1989). Die Anwendung auf Saatgut erscheint dabei besonders vielversprechend (Fravel et al 1996; Lewis 1991 & Lumsden et al 1995). Z.B. wurde *Burkholderia cepacia* (syn. *Pseudomonas cepacia*) (Yabuchi et al. 1992) und *Pseudomonas fluorescens* direkt an Erbsensamen gegeben, um vor der durch *Pythium* spp. bzw. *Aphanomyces* spp. verursachten Wurzelfäule zu schützen (Bowers et al. 1993 & Parke et al. 1991). Baumwollsaamen wurden mit *Gliocladium virens* gegen *Rhizoctonia solani* gebeizt (Howell et al. 1995). Isolate von *Gliocladium virens* und *Trichoderma viride* wurden an Maissamen für die Verringerung des Befalls mit *Pythium* und *Fusarium* im Feld angewendet (Mao et al., 1997). Maissamen wurden mit *Pseudomonas fluorescens* im Bio-Priming gegen *Pythium*-Befall verwendet (Callan et al., 1990). Die Wirksamkeit einer Kombination von Antagonisten mit chemischen Substanzen mittels Saatgutbehandlung wurde ebenso nachgewiesen (Callan et al. 1990; Lemanceau et al., 1991; Wilson et al., 1992). Bio-Priming von Maissaatgut ergab in der Verbindung mit einem Antagonisten und/oder einem Fungizid eine höhere Keimungsrate, größere Keimlingsstärke und niedrigeren Krankheitsbefall (Wilson et al., 1993, 1992). *F. oxysporum* und *Pseudomonas fluorescens* wurden in Kombination gegen die *Fusarium*-Welke bei Tomate verwendet (Lemanceau et al., 1991).

### **Ziele der Arbeit:**

*V. dahliae* und *P. lingam* gehören zu den wichtigsten Krankheitserregern an Raps (*Brassica napus*). Hinsichtlich ihrer Bekämpfung sind Fungizide oftmals unzulänglich. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit ausgewählter Antagonisten gegen *V. dahliae* und *P. lingam* in Gewächshaus- und Feldversuchen bzw. unter *in-vitro*- Bedingungen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Neben den im Folgenden aufgeführten Chemikalien wurden im Rahmen dieser Arbeit Produkte der Fa. Merck, Darmstadt, mit dem Reinheitsgrad "p.A." verwendet.

Adhäsin (Spieß- Urania Chemikals GmbH)

Ampicillin(Serva, Heidelberg)

Amphotoericin B (Fungizid) (Sigma, USA)

Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA)

Carboxymethylcellulose, Natriumsalz (Serva, Heidelberg)

Caramba (60g/l Metconazol) Fungizid (Bayer, Leverkusen)

Chinook, Insektizid (Bayer, Leverkusen)

Chloramphenicol (Serva, Heidelberg)

Czapek-Dox Medium (Difco Laboratories, USA)

Dimethomorph (DMM), Fungizid (Bayer, Leverkusen)

Fleischextrakt (Merck, Darmstadt)

Gemüsesaft

Glucose (Merck, Darmstadt)

Glycerin (Roth, Karlsruhe)

Gummi-Arabicum (Sigma, USA)

Hefeextrakt (Fulka Chemie AG, Buchs, Schweiz)

Malzextrakt (Difco Laboratories, USA)

Methylcellulose (Serva, Heidelberg)

Natriumsulfat (Roth, Karlsruhe)

Netzschwefel (BASF, Deutschland)

Paraffin (Roth, Karlsruhe)

Pepton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)

Polyvinylalkohol (Merck, Darmstadt)

Proteose Pepton No.3 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)

Quarzsand

Rifampicin (Serva, Heidelberg)

Bengalrot (Sigma, USA)

Saccharose (Roth, Karlsruhe)  
 Soyamehl (Hensel)  
 Streptomycinsulfat (Serva, Heidelberg)  
 Talkum (Bio-Rad Laboratories, USA)  
 Tryptic Soy Broth (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)  
 Trypton (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)  
 Vermiculit, Dämmstoffe (Spröckhövel)  
 Tween 20 (Fluka, Neu-Ulm)  
 Xanthan (Monsanto, UK)

## 2.2 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden mit Aqua demin. angesetzt und 15 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert. Die Einstellung des pH-Werts erfolgte vor dem Autoklavieren mit 1 N oder 2 N Salzsäure bzw. Natronlauge. Feste Medien wurden in Polystyrolpetrischalen (90mm, Sarstedt, Nümbrecht oder Greiner, Nürtingen) ausgegossen.

### **Bodenextrakt-Agar, pH 7,0**

Gesiebter Feldboden	1000 g
Leitungswasser	1500 ml

Autoklavieren, klarfiltrieren und mit dem Leitungswasser auf 1000 ml auffüllen

Agar	12 g
------	------

### **Czapek-Dox-Agar (CDA), modifiziert, pH 5,5**

Czapek-Dox	25 g
Agar	16 g
Aqua demin	1000 ml

**Czapek-Dox-Flüssigmedium (CD), modifiziert, (pH 5,5), Flüssigmedium zur Gewinnung von Konidien von *V. dahliae***

Czapek-Dox	25 g
Aqua demin	1000 ml

***Gliocladium catenulatum*-Medium, Flüssigmedium zur Gewinnung von Konidien von *G. catenulatum*, pH 5,5**

Glukose	20 g
Cornsteep liquor	10 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
Ammonium Sulfat	2 g
Aqua demin	1000 ml

***Gliocladium catenulatum*-Medium zur Isolation** aus Boden

Malzextrakt	20 g
Agar	16 g
Bengalrot	50 mg
Streptomycin	250 mg
Chloroamphenicol	12,5 mg
Amphotericin B	0,5 mg
Ampicilin	100 mg
Aqua demin	1000 ml

**Konservierungsmedium für Pilze**

Glycerin	60 ml
Glucose	10 g
Pepton	2 g
Hefeextrakt	2 g
Aqua demin	100 ml

1 ml von diesem Medium wurde zunächst in 2 ml Eppendorf Caps abgefüllt und anschließend mit Agarblöckchen einer Malzagarkultur des Pilzes befüllt. Die Lagerung der Konserven erfolgte bei -70 °C.

**Malzextrakt -Agar (MEA), pH 5,5**

Malzextrakt	20 g
Agar	16 g
Aqua demin	1000 ml

**Quarzsand- Maismehl-Medium (QMM)**

Quarzsand	150 g
Maismehl	9 g
Leitungswasser	25 ml

**SNA-Medium**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
KNO <sub>3</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KCl	0,5 g
Glukose	0,2 g
Saccharose	0,2 g
Agar	16 g
Aqua demin	1000 ml

**Tryptic Soy Broth (TSB), pH 7,0**

Tryptic Soy Broth	20 g
Aqua demin	1000 ml

**Tryptic Soy Agar (TSA), pH 7,0**

wie oben, zusätzlich:

Agar	16 g
------	------

**V8-Agar (Gemüsesaft-Agar), pH 5,6**  
(modifiziert nach Ribero, 1978)

Aqua demin	800 ml
Gemüsesaft	200 ml
CaCO <sub>3</sub>	2 g
Agar	16 g

**Waksman-Agar (WMA), modifiziert nach Waksman & Fred (1922), zum Nachweis der antimykotischen Aktivität der antagonistischen Bakterien (pH 6,8)**

NaCl	5 g
Fleischextrakt	3 g
Proteose Pepton	5 g
Glucose	10 g
Bacto-Agar	16 g
Aqua demin	1000 ml

**2.3 Organismen****2.3.1 Pflanzen****Die Pflanze: Raps (*Brassica napus*)**

Die Winterraps-Sorte "Talent" mit Toleranz gegenüber *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*) bzw. Anfälligkeit gegenüber *V. dahliae* wurde verwendet. Als Sommerrapsaatgut wurde die Sorte "Ural" mit Toleranz gegenüber *Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*) bzw. Anfälligkeit gegenüber *V. dahliae* verwendet.

Zur Anzucht und Haltung der Pflanzen fand die Aussaat in Anzuchtkästen mit Torferde-Vermiculit-Gemisch (Verhältnis 4:1 v/v) statt. Je zwei Samen wurden in einen Pflanztopf mit einem Volumen von 250 ml eingesät. Nach vier Tagen wurde eine der Pflanzen herausgezogen. Die weitere Anzucht erfolgte in einer Gewächshauskabine bei einer Taglänge von 14 h bei 15-35 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-70 %. Wenn die Pflanzen mit Mehltau befallen waren, wurde ab BBCH 16 einmal wöchentlich mit 2,5g/l Netzschwefel ( 80%iger Schwefel ) gespritzt.

**2.3.2 Pflanzenpathogene**

Folgende pflanzenpathogene Mikroorganismen wurden in der Arbeit verwendet:

*Verticillium dahliae* Nr.V25, isoliert aus Raps. Herkunft: Karin Zeise, Rostock.

*Verticillium dahliae* Nr. V40, isoliert aus Raps. Herkunft: Hohenlieth 1990.

*Phoma lingam* (*Leptosphaeria maculans*), isoliert aus befallenen Rapspflanzen in Raisdorf-Kiel.

### 2.3.2.1 *Verticillium dahliae*

#### **Kultivierung von *Verticillium dahliae*:**

Die Anzucht des Testpilzes *Verticillium dahliae* (Stämme **ELV25** und **ELV40**) erfolgte auf CDA. Zur Erhaltung wurden die Pilz auf das Minimalmedium SNA überimpft, wozu frisches Myzel vom Kolonierand zum Überimpfen verwendet werden. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen. Die Inkubationszeit betrug 14 Tage. Die SNA-Platten mit den ausgewachsenen Pilzkolonien wurden bei 4°C gelagert und jährlich erneuert.

Zur Kultivierung im Flüssigmedium wurde ein Erlenmeyer-Kolben mit 250 ml Czapek-Dox-Medium (DIFCO, Detroit, USA) autoklaviert und anschließend mit einer Glycerin-Erhaltungskultur aus der Stammsammlung beimpft. Die Inkubation für ca. zwei Wochen wurde bei 20 ° C auf dem Schüttler bei 140 rpm ausgeführt.

Zur Durchführung des Dualkultur-Tests wurde auf Waxman-Agar 100 µl einer Flüssigkultur ausplattiert und anschließend für mehrere Tage bei 20 °C inkubiert.

Zur **Konidienproduktion** wurde eine 2 Wochen mit Myzel von *V. dahliae* bewachsene CDA-Platte mit 5 ml sterilem Leitungswasser abgeschwemmt. Ein ml dieser aus Konidien und Myzelbruchstücken bestehenden Suspension wurde anschließend auf einer V8-Platte mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt und 7 Tage unter Lichtabschluss inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die neu gebildeten Konidien mit 5 ml sterilem Leitungswasser von der V8-Platte abgeschwemmt und nach Bestimmung ihrer Dichte in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer auf die gewünschte Konidiendichte mit sterilem Leitungswasser eingestellt.

Zur **Mikrosklerotienproduktion** erfolgte daneben die Anzucht von *V. dahliae* (ELV 25 und ELV40) zur Inokulation des Bodens für die Gewächshausversuche auf Vermiculit, einem Silicat. Hierfür muss vorerst eine Flüssigkultur (200 ml) in Czapek-Dox-Medium (DIFCO, Detroit, USA) herangezogen und diese zu autoklaviertem Vermiculit (4L) gegeben. Als Nährstoffgrundlage wurde weiteres steriles Czapek-Dox-Medium (200 ml) hinzugegeben.

**Als Erhaltungskulturen** wurden die verwendeten Pilzisolat von *V. dahliae* als Mycelstück auf Mais-Agar oder CDA in Petrischalen bei 6°C aufbewahrt und alle 2 Monate neu überimpft.

### **2.3.2.2 *P. lingam***

Die Isolate wurden zum Zweck der Erhaltung bei 4°C mit Paraffinöl überschichtet und in mit Hafermehl gefüllten Schrägröhrchen oder auf V-8 Agar Medium aufbewahrt. Die Herstellung von Pyknidiosporen von *P. lingam* wurde auf V8-Agar für 7 Tagen bei 20 C° im Dunkeln durchgeführt. Zur Herstellung von Sporensuspensionen wurden Agarstücke mit hoher Pyknidiendichte in 5 ml steriles Wasser überführt. Anschließend wurden Myzel- und Agarbruchstücke mit Hilfe eines sterilen Glaswolle-Filters abfiltriert. Nach der Ermittlung der Sporendichte mittels einer Thoma-Zählkammer (0,1) mm wurde die Konzentration auf  $1 \times 10^7$  Sporen/ml eingestellt. Bis zur Verwendung wurde die Sporensuspension bis maximal 6 Monate bei -20°C gelagert.

### **Kultivierung auf Festmedien**

Zur Durchführung des Dualkultur-Tests wurde auf V8-Agar 100 µl einer Flüssigkultur ausplattiert und anschließend für mehrere Tage bei 20 °C inkubiert. Zur Kultivierung im Flüssigmedium wurde ein Erlenmeyer-Kolben mit 250 ml V8-Medium autoklaviert und anschließend mit einer Glycerin-Erhaltungskultur aus der Stammsammlung beimpft. Der Kolben wurde inkubiert und danach für ca. zwei Wochen bei 20 ° C auf dem Schüttler bei 140 rpm gestellt.

### **2.3.3 Antagonisten**

*Serratia plymuthica* HOR- C48,  
*Gliocladium catenulatum* J1446,  
*Bacillus subtilis* B2g,  
*Pseudomonas fluorescens* E9, 1Re2-6,  
*Paenibacillus polymyxa* 1P1-2,  
*Pseudomonas chlororaphis* MA342



### 2.3.3.1 Anzucht und Haltung der Bakterien

Zur Vermehrung in Flüssigkultur wurden die Bakterien mit einer Impföse von Schrägagarröhrchen auf das Vollmedium TSA (pH 7,0) überimpft und 48 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde für die Vorkultur ein mit 50 ml TSB (pH 7,0) gefüllter 100-ml Erlenmeyerkolben mit gut gewachsenen Kolonien von dem TSA-Medium angeimpft und 24 h bei 25 °C auf einem Rotationsschüttler (180 U/min) inkubiert. Zwei ml dieser Vorkultur wurden für die Hauptkultur in einen mit 200 ml TSB (pH 7,0) gefüllten 500-ml-Erlenmeyerkolben überimpft und 48 h bei 25 °C auf einem Rotationsschüttler (180 U/min) inkubiert. Zur Zellvermehrung wurden die Bakterien hauptsächlich auf TSA angezogen, indem einzelne, frische Kolonien mit einer Impföse auf TSA-Platten ausgestrichen und 48 h bei 25°C inkubiert wurden. Die Stammhaltung der Bakterien erfolgte auf dem TSB-Nährmedium mit 50%Glycerin. Es wurden sowohl Agarplatten- als auch Schrägröhrchenkulturen angelegt. Zur Stammerhaltung wurden 700 µl einer dichtbewachsenen Bakterien-Flüssigkultur mit 300 µl sterilem Glycerin (50%) in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und bei -80 °C tiefgefroren.

Zur Kultivierung auf Festmedien fand die Anzucht auf TSA oder Nähragar (Oxid, Hampshire, England) bei 25° C statt. Zur Bestimmung der Populationsdynamik von ausgewählten Antagonisten wurden stabile Rifampicin-resistente Mutanten dieser Bakterienstämme hergestellt, und zur Reisolierung von Rifampicin-resistenten Bakterienstämmen aus den Boden- und Pflanzenproben wurden diese auf TSA oder Nähragar mit 100 ppm Rifampicin (v/v) angezogen. Rifampicin-haltige Medienplatten wurde nach dem Autoklavieren und Abkühlen des TSA-Mediums auf 50°C Rifampicin in einer Endkonzentration von 100 mg/ml zugesetzt. Zur Herstellung rifampicin-resistenter gram-negativer Spontanmutanten wurden die Bakterien in Flüssigkultur (TSB-Medium, 24h, 25°C, 180 rpm) kultiviert und in rifampicinhaltigem TSB-Medium nach folgendem Schema überimpft:

20 mg l<sup>-1</sup> Rifampicin +5ml TSB +1% Vorkultur, 24 h, 25°C

60 mg l<sup>-1</sup> Rifampicin +5ml TSB +1% alten Kultur, 24 h, 25°C

80 mg l<sup>-1</sup> Rifampicin +5ml TSB +1% alten Kultur, 24 h, 25°C

100 mg l<sup>-1</sup> Rifampicin +5ml TSB +1% alten Kultur, 24 h, 25°C

150 mg l<sup>-1</sup> Rifampicin +5ml TSB +1% alten Kultur, 24 h, 25°C

Mittels der Impföse wurden Bakterien aus Flüssigkultur auf rifampicinhaltigem TSA-Platten

(150 mg l<sup>-1</sup>) ausplattiert und die Platten wurden 2 Tage bei 25°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien (Rifampicin-resistente Spontanmutanten) wurden dann in 5 ml TSB + 100 mg l<sup>-1</sup> Rifampicin (24 h, 25°C) inkubiert. Anschließend wurden die stabilen Rifampicin-resistenten Spontanmutanten in Glycerin bei -80°C konserviert.

**Gram-positive Stämme** wurden im Flüssigkultur (TSB-Medium, 24h, 25°C, 180 rpm) kultiviert und in rifampicinhaltigem TSA-Medium (100 mg l<sup>-1</sup> Rifampicin) ausplattiert. Die Platten wurden 2 Tage bei 25°C inkubiert und die gewachsenen Kolonien (Rifampicin-resistente Spontanmutanten) auf TSA überimpft. Zur Überprüfung der Stabilität der Mutation wurden die Kolonien nach folgendem Schema überimpft:

TSA+ 150 mg l<sup>-1</sup> Rifampicin, 48 h, 25°C

TSA, 48h, 25°C

TSA+ 100 mg l<sup>-1</sup> Rifampicin, 48 h, 25°C

TSA, 48h, 25°C

TSA, 48h, 25°C

TSA+ 100 mg l<sup>-1</sup> Rifampicin, 48 h, 25°C

Anschließend wurden die stabilen Rifampicin-resistenten Spontanmutanten in Glycerin bei -80°C konserviert.

### 2.3.3.2 Anzucht und Haltung des *Gliocladium catenulatum*

Die Kultivierung des Antagonisten *Gliocladium catenulatum* auf Festmedium wurde auf Malzextrakt-Agar (MEA) bei 22 °C durchgeführt, der Streptomycin 100mg/l und Bengalrot 50mg/l enthielt. Dazu wurde *G. catenulatum* in Flüssigmedium in einem Erlenmeyer-Kolben mit 250 ml Medium mit einem einwöchigen Myzel von einer MEA-Platte inokuliert. Danach wurde der Kolben für ca. zwei Wochen bei 20 °C auf dem Schüttler bei 140 rpm inkubiert.

## 2.4 *In vitro* Antagonisten-Tests

### 2.4.1 Dualkulturen zum Nachweis der Hemmwirkung

Um die *in-vitro*-Hemmwirkung der Antagonisten gegenüber *P. lingam* (Pyknidiosporen) und *V. dahliae* (Minisklerotien) zu überprüfen, wurden Dualkultur-Tests auf 2 verschiedenen

nährstoffreichen Medien durchgeführt, da die Bildung von Hemmstoffen und hydrolytischen Exoenzymen durch Bakterien stark von der Zusammensetzung des Nährmediums abhängt. Je 100µl Flüssigkultur der Isolate wurden auf eine V8-Agar Platte (geeignete Nährmedien für das Pyknidiosporenwachstum von *P. lingam*). Waksman-Agar Platte (geeignetes Nährmedium für das Sklerotienwachstum von *V. dahliae*) strichförmig aufgetragen und bei 22°C inkubiert. Nach 3, 5 und 7 Tagen wurde rechts und links des Impfstrichs nach Bildung der Hemmhöfe ausgewertet. Als Maß für die antifungale Aktivität wurde der Abstand zwischen Bakterienimpfstrich und Myzelrand nach folgendem System gemessen:

- 4: Hemmhof > 10mm
- 3: Hemmhof 5-10 mm
- 2: Hemmhof < 5 mm
- 1: Kein Hemmhof, Bakterienkolonie nicht überwachsen
- 0: Überwachsen der Bakterienkolonie

Die Isolate wurden zusätzlich gegenüber *P. lingam* und *V. dahliae* bei verschiedenen Temperaturen z.B. bei 10°C und 22°C überprüft. Dieser Test wurde ebenfalls mit myzelbewachsenen Agarscheiben als Inokulum durchgeführt. Mit einen sterilen Korkbohrer (Durchmesser 7mm) wurden die Blöcke ausgestochen und zentral auf mit Waksman-Agar bzw.V8-Agar beschichtete Petrischalen aufgelegt. Im Abstand von 20 mm dazu wurden links und rechts je ein Impfstrich der Testbakterien aufgetragen. Nach einer Inkubation von 5 Tagen bei 22°C bzw. von 10 Tagen bei 10°C wurde die Hemmwirkung der Bakterien nach dem beschriebenen System eingeschätzt.

#### **2.4.2 Test bakterieller Sterifiltrate gegen *V. dahliae* und *P. lingam***

Die Hemmung des Pilzwachstums durch extrazelluläre Substanzen der Bakterien wurde in einem *in vitro* Test nach Huber *et al.* (1987) bestimmt. Der Überstand wurde durch eine Vakuumfiltration (Filtropur S. 0.2, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) sterilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Steriles Kulturfiltrat (5 ml, 72 h-Kultur, TSB, 25°C) wurde mit 15 ml WA (40°C) versetzt. Als Kontrolle diente der reine Waksman-Agar (20 ml). Nach Festwerden des Agars wurde auf die Oberfläche zentral eine Myzelscheibe des Testpilzes aufgesetzt. Nach 3-10 Tagen Inkubation bei 22°C erfolgte die Auswertung. Der Myzeldurchmesser wurde ausgemessen und die relative Hemmung des Pilzwachstums im Verhältnis zur Kontrolle (100 %) berechnet. Der Myzeldurchmesser wurde nach folgendem Schema ausgemessen:

+++ Hemmung > 60 %

++ Hemmung 60-30 %

+ Hemmung < 30 %

Um einen im festen Agarmedium entstehenden Konzentrationsgradienten der von den ausgewählten Antagonisten gebildeten Hemmstoffe zu vermeiden, wurden Sterilfiltrate der Kulturmedien direkt als Testmedium eingesetzt. Mit Hilfe dieses Tests sollte gleichzeitig untersucht werden, wieweit keimende und wachsenden Pilzhyphen von *V. dahliae* und *P. lingam* durch Kulturfiltrate der ausgewählten Antagonisten gehemmt werden können.

Für die Herstellung hemmstoffhaltiger Kulturfiltrate wurden die antagonistischen Bakterien in TSB-Medium inkubiert und anschließend zentrifugiert (Suprafuge, 8000 rpm, 15 min, 4°C). Die Ermittlung von Wachstumskurven ergab, dass sich alle Isolate nach spätestens 96 h in ihrer stationären Phase befanden, in der die meisten extrazellulären Metabolite gebildet werden, die für eine antagonistische Aktivität verantwortlich sind. Von Waksman-Petrischalen, auf denen jeweils 300 µl einer Konidien suspension von *V. dahliae* bzw. *P. lingam* inokuliert worden waren, wurden nach 12-stündiger Inkubation mit einem sterilen Korkbohrer Agarblöcke (Ø 7 mm) herausgestochen. Je vier Agarblöcke wurden in oberflächensterilisierte Hohlblockschälchen eingelegt. Dazu wurden jeweils 2 ml der gewonnenen Sterilfiltrate verschiedener Bakterienisolate pipettiert und die Hohlblockschälchen mit sterilen Deckeln verschlossen. Als Kontrolle wurden Hohlblockschälchen mit sterilem TSB-Medium befüllt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Agarblöcke entnommen, auf Objektträger mit 100 µl einer 5% Safranin-Lösung versetzt und im Lichtmikroskop ausgewertet. Als Bewertungskriterien dienten die Morphologie des aus den Sporen gekeimten Myzels sowie der durch Rotfärbung angezeigten Zelltod von Sporen und Myzel. Folgendes Boniturschema kam zur Anwendung:

#### **Vitalitätsprüfung:**

1= Keine Rotfärbung (alle Zellen vital)

2= Wenige Zellen sind rot gefärbt (abgestorben)

3= Weniger als 25% der Kolonien schwach geschädigt

4= Weniger als 25% der Kolonien stark geschädigt

5= ca. 50% der Kolonien schwach geschädigt

6= ca. 50% der Kolonien stark geschädigt

7= bis 75% der Kolonien stark geschädigt

8= einige wenige Zellen noch vital

9= alle Zellen abgestorben

## **2.5 Saatgutbehandlungen mit antagonistischen Mikroorganismen**

### **2.5.1 Saatgutbehandlung mit Bakterien**

#### **1- Saatgut-Priming**

Auf der Oberfläche von Rapssaatgut können gram-negative Bakterien nicht lange überleben. Deshalb wurde ein Verfahren verwendet, um die Bakterien in das Saatgut zu bringen. Hierfür wurden Schikanekolben mit 200 ml TSB-Medium befüllt, autoklaviert und mit 0,1% (v/v) des TSB-Mediums mit Glycerin-Erhaltungskulturen der einzelnen Stämme angeimpft und 48 h bei 25 °C auf dem Inkubationsschüttler (180 rpm, Innova 4230, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen) inkubiert. Die bakteriellen Antagonisten wurden in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation bei 8000 g, 10 min und 4°C (Suprafuge 22, Heraeus Sepatech, Osterode) geerntet und das Pellet wurde von 20 ml Bakteriensuspension in 2 ml 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung resuspendiert. Anschließend wurden 200 Samen mit 2 ml der aufkonzentrierten Bakteriensuspension ( $\log_{10}$  11 cfu/ml) inkubiert. Das Rapssaatgut wurde für jeweils 6 h in die wässrige Bakteriensuspension eingelegt und bei 25 °C auf dem Schüttler (180 rpm) inkubiert. Dann wurde dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurde nach Abtropfen 24 h bei 20°C auf Cleanbench und bei Raumtemperatur gelagert. Danach wurden das behandelte Rapssaatgut mit Insektizid Chinook (20 ml/ kg Saatkorn) in einer Pilierungsapparatur im Labormaßstab bei 400 rpm beschichtet. Talkum „blau“ wurde hierbei solange dazugegeben, bis die Flüssigkeit abgebunden war, und in der Cleanbench 1h bei 20 °C im sterilen Luftstrom getrocknet.

#### **2- Behandlung mit NaCl und Talkum**

Hierfür wurden vorher Schikanekolben mit 200 ml Nährbouillon befüllt, autoklaviert und mit 0,1% (v/v) Volumen der Nährbouillon aus Glycerin-Erhaltungskulturen der einzelnen Stämme angeimpft und 48 h bei 22 °C im Inkubationsschüttler (180 rpm) inkubiert. Für die Talkumformulierung wurde ein Pellet von 20 ml Bakteriensuspension ( $\log_{10}$  10 cfu/ml) in 400 µl (9 g/ l) NaCl-Lösung resuspendiert. Die Formulierung erfolgte an 250 Samen, mit den 400 µl aufkonzentrierter Bakteriensuspension ( $\log_{10}$  11 cfu/ ml) und Talkum „blau“ in einer Pilierungsapparatur im Labormaßstab bei 400 rpm. Talkum wurde hierbei solange

dazugegeben, bis die Flüssigkeit abgebunden war und die Samen sich vereinzeln ließen, ca. 1 g Talkum.

### **3- Behandlung mit 1% (w/v) Saccharoselösung**

Die Vorgehensweise verhielt sich genau so wie bei der Formulierungsstrategie unter Punkt (2). Statt der (9 g/ l) NaCl-Lösung wurde eine 10 g/ l Saccharoselösung verwendet.

### **4- Behandlung mit 3% (w/v) Gummi-Arabicum**

Die Vorgehensweise verhielt sich genau so wie bei der Formulierungsstrategie unter Punkt (2). Statt der (9 g/ l) NaCl-Lösung wurde eine (30 g/ l) Gummi-Arabicum-Lösung verwendet.

## **2.5.2 Saatgut-Behandlung mit *Gliocladium catenulatum***

In einer nach Knappe (1994) entwickelten Variante der Saatgutinkrustierung wurden in einer selbstgefertigten Mischvorrichtung 2 g Rapssamen mit 0,5 ml der vorbereiteten *Gliocladium*-Suspension von ca.  $6 \times 10^8$  Sporen/ml bzw. Insektizid Chinook (20 ml/kg Saatkorn) in einer Pilierungsapparatur im Labormaßstab bei 400 rpm beschichtet. Talkum „blau“ wurde hierbei solange dazugegeben (ca. 1 g), bis die Flüssigkeit abgebunden war und die Samen sich vereinzeln ließen. Anschließend wurde das Saatgut in der Cleanbench 1h im sterilen Luftstrom bei 20 °C getrocknet. Nach der Trocknung wurden die beschichteten Samen mit einer Pinzette in die Töpfe ausgesät oder in sterilen Petrischalen bei 4 °C gelagert.

In Vorversuchen wurden alle eingesetzten Komponenten hinsichtlich ihrer insektiziden (Chinook) Wirkung untersucht. Durch Keimversuche mit dem beschichteten Saatgut wurde die Auswirkung der Prozedur auf die Keimfähigkeit der Samen untersucht.

### **2.5.2.1 Optimierung der Saatgutinkrustierung von *G .catenulatum***

Zur Realisierung einer erhöhten Haftfähigkeit der an das Saatgut applizierten *G. catenulatum*-Suspension wurden ca.  $6 \times 10^8$  Sporen/ml in Vorversuchen folgende Substanzen auf ihre Eignung als Matrix für die Saatgutinkrustierung untersucht und in einer Pilierungsapparatur im Labormaßstab bei 400 rpm beschichtet

- Methylzellulose, 20 g/l
- Polvinylalkohol, 20 g/l
- Gummi Arabicum, 30 g/l
- Xanthan, 20 g/l

### 2.5.3 Lagerungsstabilität den Antagonisten

Um die Frage zu klären, wie lange die Antagonisten auf dem Saatgut überleben, wurde das behandelte Saatgut der Sorte „Ural“ 60 Tage in sterilen Petrischalen bei 4°C im Kühlraum und bei Raumtemperatur mit leicht geöffnetem Deckel gelagert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Lebendkeimzahl (cfu) nach 0, 7, 14, 30, 45 und 60 Tagen. Dazu wurden je 20 Samen in zwei Wiederholungen abgenommen, für 3 min. in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mit 1 ml 2 % (v/v) NaOCl-Lösung geschüttelt. Dann wurde es dreimal mit sterilem Wasser abgewaschen. Die Samen wurden mittels Mörser und Stößel in sterilem Wasser zerrieben. Von der Lösung wurden verschiedene Verdünnungen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-5}$  angelegt und auf Rifampicin-haltigem Nähragar ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei 23 °C inkubiert und die Abundanzen nach 2 Tagen bestimmt.

Für *G. catenulatum* erfolgte am Tag der Behandlung sowie nach 7, 15, 30, 45 und 60 Tagen die Bestimmung der Sporendichte je Saatkorn. Je 20 Samen wurden in zwei Wiederholungen in 1ml sterilem Wasser auf einem Vortex-Schüttler (Heidolph Reax 2000, Deutschland)) 1 min geschüttelt bis sich die Hüllschicht aufgelöst hatte. Die Lebendsporenzahl wurde nach Herstellung entsprechender Verdünnungsstufen der Suspension auf antibiotikahaltigen Malzextraktagar nach 48 h (23 °C) ermittelt.

## 2.6 Optimierung der Rapspflanzen mit den Pathogenen

### 2.6.1 Inkubation mit Mikrosklerotien von *V. dahliae*

Das verwendete Winterrapssaatgut der Sorte (Talent) und Sommerraps (Ural) wurde von der Norddeutsche Pflanzenzucht (Hohenlieth) gestellt. Die Aussaat erfolgte in Pflanzerde, die aus einer gemischten Erde (4-Teilen Einheitserde und ein Teil Vermiculit) bestand. Die Mikrosklerotien-Dichte der Varianten wurde durch Einmischen von unterschiedlichen Mengen des Vermiculits im Verhältnis 20:1(v/v) in die Pflanzerde hergestellt. In den nicht

inokulierten Kontrollvarianten wurden nur Pflanzerde und die entsprechende Menge Vermiculit untergemischt. Das für jede Variante hergestellte Gemisch wurde auf 15 Töpfe (Größe: 6 x 6 cm, 8 cm hoch) mit je 250 g aufgeteilt. In jeden Topf wurden zwei Rapskörner nach unterschiedlicher Behandlung in einem Loch 1 cm tief abgelegt. Die Behandlung des Saatgutes erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben. Danach wurden die Töpfe zehn Wochen inkubiert. Als Kontrolle dienen zwei Varianten, in denen unbehandeltes Rapssaatgut in nicht inokulierte Erde (Gesundkontrolle) und in inokulierte Erde (inokulierte Kontrolle) ausgelegt wurde. Der Befall der Rapspflanzen mit *V. dahliae* wurde über einen Versuchszeitraum von 10 Wochen einmal wöchentlich ermittelt und mit dem der Kontrollvarianten verglichen. Die Befallsverminderung wurde anhand der Ergebnisse zur Befallsermittlung aus den jeweiligen *ad Planta*-Untersuchungen prozentual im Vergleich zur inokulierten Kontrolle errechnet.

Während des Versuchszeitraumes betrug die Temperatur im Gewächshaus 15-35 °C, die Lichtverhältnisse entsprachen den natürlichen Tagesbedingungen ohne Zusatzbeleuchtung. Während des Versuchszeitraums (von 01.Aug. bis 10. Okt.) wurde die Bodenfeuchte der Pflanzerde in allen Varianten mit Leitungswasser auf ca. 40% der maximalen Wasserkapazität eingestellt. Die Bewässerung der Töpfe erfolgte durch passiven Transport von 2 l Wasser, die in ein Tablett mit 15 Töpfen gegeben wurde. Eine Düngung wurde nicht gegeben.

Die parallel zu den im Gewächshaus durchgeführten Versuchen im Klimaschrank- und Klimaraum, wurden unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Die Temperatur wurde bei 22°C ±1° und die Luftfeuchte bei 75 ± 5 % kontrolliert. Die Beleuchtungsintervalle wurden von 12/12 h (Tag/Nacht) eingestellt. Eine Düngung der Versuche erfolgte nicht.

Zur Bestimmung der Befallsstärke mit *V. dahliae* wurden mit den ersten sichtbaren Symptomen die Varianten einmal wöchentlich bonitiert. Zur Einschätzung der Befallsstärke wurde nach Zeise (1992) verfahren (Tab. 1).

**Tab. 1** : Boniturschema nach Zeise (1992)

Die Bonituren erfolgten über einen längeren Zeitraum und wurden für jede Variante zum Befallsintegral verrechnet und miteinander verglichen.

1= Keine Symptome

2= Wenige Adern am ältesten Blatt dunkel verfärbt



- 3= Starke Symptome am ältesten Blatt; unter Umständen schwache Symptome an den nächst jüngeren Blättern
- 4= Stark befallenes Blatt abgeworfen
- 5= Etwa 50% der Blätter mit starken Symptomen
- 6= Bis 50% der befallenen Blätter abgeworfen
- 7= Über 50% der befallenen Blätter abgeworfen
- 8= Ausschließlich der Vegetationskegel ist noch grün
- 9= Pflanze vollständig abgestorben

**n**

$$BI = \sum_{t+1}^n (BN_{ti} + BN_{ti+1})/2 * (ti+1 - ti)$$

BI = Befallsintegral

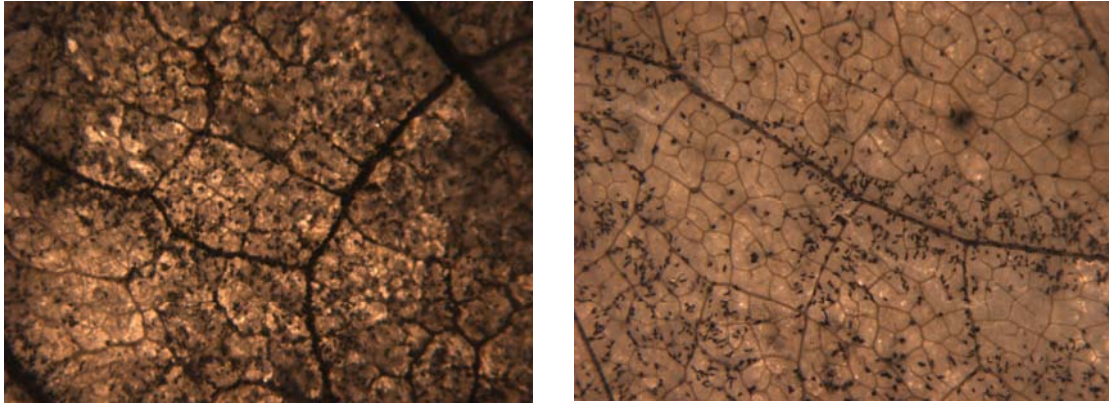
BN = Boniturnoten

ti = Boniturtermin



**Abb. 3:** Halbseitige Chlorosen an Rapsblättern hervorgerufen durch *V. dahliae* Kleb.

Im weiteren Verlauf wurden von der Pflanze vermehrt Blätter abgeworfen. Einige dieser Blätter wurden in feuchten Kammern für einige Tage inkubiert und anschließend mikroskopiert (Abb. 4).



Mikrosklerotium von *Verticillium dahliae*.

**Abb.4:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme eines befallenen Blattes, nach 3 Tagen Inkubation in einer feuchten Kammer.

### 2.6.2 Inokulation der Keimblätter mit *P. lingam*

Jede Keimblatthälfte (Kytledonen) wurde mit einer sterilen Nadel punktförmig verletzt, dann mit 10µl einer  $10^7$  Sporen/ml konzentrierte Sporensuspension inokuliert. Um während des Versuchszeitraums ein rasches Altern der Keimblätter zu verhindern, wurden die nachwachsenden Laubblätter alle 2 Tage entfernt. Die Befallsbonitur an Keimblättern erfolgte in Anlehnung an Volke (1999), die Keimblattbewertung nach einem modifizierten Schema von Delwiche (1980). Die Boniturwerte von 0-6 wurden verwendet:

- 0 = keine Symptome
- 1 = Läsionen um die Einstichstelle < 1,5 mm
- 2 = Läsionen um die Einstichstelle 1,5-3,5 mm
- 3 = Läsionen um die Einstichstelle >3,0 mm
- 4 = grau-grüner Gewebekollaps 3,1-5,0 mm
- 5 = grau-grüner Gewebekollaps >5,0 mm (≤ 10 Pyknidien)
- 6 = grau-grüner Gewebekollaps > 5,0 mm (>10 Pyknidien)

#### 2.6.2.1 Inokulation mit *P. lingam* im BBCH 14/15

Zur Inokulation wurden die Pflanzen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien sowie unterschiedliche Pflanzenteile im Entwicklungsstadium BBCH 14/15 (Weber & Bleholder 1990) mit zwei Methoden durchgeführt. Als erstes wurden die Pflanzen mit myzelbe-

wachsenen Agarstücke von V8-Agar und als zweites mit Pyknosporen von *P. lingam* als Inokulum inokuliert. Anschließend wurden Symptomen von *P. lingam* verglichen. Die Befallsermittlung erfolgte 50 Tage nach Inokulation mittels Sichtbonitur. Für die Beurteilung der Krankheitssymptome an der Stängelbasis wurde das Boniturschema von Kutscher et al. (1993) verwendet. Hierbei wurde sowohl die Länge (L), der Umfang als auch die Tiefe der Läsionen 50 Tage nach der Inokulation berücksichtigt. Die gemessene Länge und der prozentuale (G.p.) Wert wurden zur Erfassung des VDT-Wertes (Volume of Diseased Tissue) in Boniturstufen von 0-4 eingesetzt.

Boniturstufe	Läsionslänge (L)	Läsionsumfang (G)	Läsionstiefe (P)
0	Keine Infektion	Keine Infektion	Keine Infektion
1	1-9 mm	≤ 25%	≤ 25%
2	10-19 mm	25-50%	25-50%
3	20-29 mm	50-75%	50-75%
4	≥ 30 mm	75-100%	75-100%

$$\text{VDT} = (1 - \text{HR}^2) * G/4 * L \quad \text{Wobei HR} = 1 - P/4$$

Anhand der errechneten VDT-Werte ergeben sich folgende Befallsstufen:

Resistent: 0-0,3      intermediär: 0,4-1,5      anfällig: 1,6-4,0

### 2.6.3 Untersuchung der Hemmwirkung der Antagonisten gegen *P. lingam*

#### 2.6.3.1 Untersuchung der Befallsminderung durch Besprühen der Keimblätter

Hierzu erfolgt die Anzucht der Pflanzen bzw. Antagonisten wie unter 2.3.1 bzw. 2.3.3.1 beschrieben. Pro Variante wurden 45 Pflanzen in 15 Töpfen angezogen. 50 ml einer 48 h alten Flüssigkultur der Antagonisten wurden durch Zentrifugation bei 8 000g, 10 min und 4 °C (Suprafuge 22, Heraeus Sepatech, Osterode) aufkonzentriert und das Pellet in sterilem 0,9-%iger NaCl und 0,1%iger Adhäsit (Spiess-Urania Chemikals GmbH) und 0,02%iger Tween 20 auf eine Konzentration von ca.  $10^9$  cfu/ml resuspendiert. 15 ml eines jeden Isolats wurde direkt auf insgesamt 45 Pflanzen in 15 Töpfen gesprüht. Die Inokulation der Pflanzen mit *P. lingam* erfolgte wie unter 2.6.2 beschrieben, aber 6 Stunden nach Ausbringung der Antagonisten. 14 Tage später wurde der Befall nach dem Delwiche-Schema ermittelt.

### 2.6.3.2 Wirkung auf Befall an der Stängelbasis

Zur Ermittlung der Wirkung der Antagonisten wurden die Pflanzen und die Bakterien wie unter 2.3.1 bzw. 2.3.3.1 beschrieben angezogen. Die Anzahl der Versuchspflanzen war 45. Die Bakterien wurden in 0,25% Xanthan auf eine Konzentration von  $10^9$  cfu/ml resuspendiert. Die Stängelbasis jeder Pflanze wurde mit 500µl einer Antagonistensuspension behandelt. Die Inokulation der Pflanzen mit *P. lingam* erfolgte 2 Tage nach Ausbringung der Antagonisten mit 40µl einer  $10^7$ /ml konzentrierter Sporensuspension. Nach 50 Tagen wurde der Befall nach dem Schema von Kutscher et al. (1993) (siehe 2.6.2.1) ermittelt.

### 2.6.4 Besiedlung von Rapskeimlingen durch Antagonisten

Die Besiedlung der Pflanze durch die Antagonisten wird als Voraussetzung für eine effektive Bekämpfung des Zielpathogens angesehen. Für diese Besiedlungsstudien wurden in TSB produzierte Rifampicin-resistente Stämme in 0,9% NaCl-Lösung resuspendiert und Samen in der Petrischale 6 h bei 25 °C auf einem Schüttler (180 rpm) in der Suspension behandelt. Nach Abtropfen der überschüssigen Flüssigkeit wurden behandelte und nicht behandelte Rapssamen getrennt in sterilen Sand mit Bodenextrakt als Nahrungsquelle in eine Kunststoffschale (16x12x6 cm) ausgesät. 5 Tage nach dem Aufgang der Pflanzen wurden die Keimlinge unter sterilen Bedingungen in eine mit Rifampicin-haltigem Nähragar beschichteten Petrischale eingelegt. Nach 3 Tagen wurde die Besiedlung der Pflanzen durch die Antagonisten ermittelt.

### 2.6.5 Untersuchung zum Einfluss einer Saatgutbehandlungen auf die Spross- und Wurzelbesiedlung der Antagonisten

Rapssaatgut der Sorte Talent wurde wie unter 2.3.3.1 beschrieben mit einer Bakteriensuspension (ca.  $4 \times 10^{10}$  cfu/ml) der stabilen Rifampicin-resistenten Mutanten der Antagonisten behandelt und wie unter 2.6.1 beschrieben in Erde ausgesät. Als Kontrolle dient unbehandeltes Rapssaatgut. Zur Bestimmung der Etablierung in der Rhizosphäre wurden Wurzelproben der einzelnen Varianten am Tag der Aussaat und 8 und 30 Tag nach Auflaufen der Pflanzen genommen. Die Anzucht erfolgte im Klimaschrank bei 22°C  $\pm$ 1° und die Luftfeuchte bei 75  $\pm$  5 % und für einen weiteren Versuch im Gewächshaus. Aus jeder behandelten ausgewählten Antagonisten Variante wurden jeweils 5 Pflanzen vorsichtig aus

ihren Pflanzschalen entnommen. Der nicht durchwurzelte Boden wurde abgeschüttelt und der Spross abgeschnitten. Jeweils 5 g jeder Wurzel von 5 Pflanzen wurden in sterilen Erlenmeyerkolben mit 40 ml sterilen Wasser eine Stunde bei 24°C geschüttelt. Der Spross wurde in 10 ml steriler 0,85 % NaCl-Lösung mit einem sterilen Mörser homogenisiert und Verdünnungsreihen bis  $10^{-7}$  dieser Pflanzensuspension hergestellt. Die Kontrollen ohne Bakterien wurden in der gleichen Art und Weise beprobt. Alle Proben wurden noch am selben Tag aufgearbeitet. Von dieser Suspension wurde zunächst 1 ml zur Bestimmung der Lebendkeimzahl abgenommen. Die Lebendzellzahl der markierten Bakterienstämme sowie die Gesamtzellzahl konnte nach dem Ausstreichen entsprechender Verdünnungsstufen der gewonnenen Suspensionen von  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  auf antibiotika-haltigen bzw. -freien Nährmedium (TSA) und 48-stündiger Inkubation bei 25 °C bestimmt werden. Die Anzahl Koloniebildender Einheiten (cfu) pro Gramm oberirdischem Sprossteil und Wurzelfrischmasse wurde in log cfu dargestellt.

### **2.6.6 Bestimmung der Wachstumsförderung**

Neben der Untersuchung der antimykotischen Wirksamkeit der Antagonisten wurde auch der Effekt auf das Wachstum der Pflanzen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt. Um die wachstumsfördernde Wirkung von Antagonisten zu überprüfen, wurde ein Teil des Pflanzensubstrats mit *V. dahliae* behandelt (5%). Als Kontrolle diente die unbehandelte Pflanzenerde. Zur Bestimmung der Frisch- und Trockenmasse wurden alle Pflanzen des jeweiligen Versuchs herangezogen. Die Pflanzen wurden nach 10 Wochen vom Wurzelmaterial befreit und anschließend gewogen.

## **2.7 Feldversuche**

### **2.7.1 Versuchstandort**

Für die Überprüfung der Wirksamkeit im Freiland stand ein natürlich mit *V. dahliae* und *P. lingam* verseuchtes Versuchsfeld auf dem Versuchsgut Hohenschulen der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (Institut für Acker- und Pflanzenbau) in Achterwehr (Lage: 54°19'N, 9°58'E) zur Verfügung. Seit 1970 wurden auf dieser Fläche in einer dreifeldrigen Fruchtfolge die Kulturen Winterweizen, Wintergerste und Winterraps angebaut. Bedingt durch den 30%igen Anteil von Winterraps liegt hier eine hohe Bodenverseuchung mit

Mikrosklerotien von *V. dahliae* vor (Kruse, 2003). Der Versuch wurde als randomisierte Blockanlage mit 4 Prüfgliedern in vierfacher Wiederholung angelegt. Die Größe der Parzellen betrug 42 m<sup>2</sup>. Sie wurde in Flächen von 4,5 x 3 m zur Probenahme und Ernteparzellen von 8 x 3 m unterteilt. Die Parzellen waren in Fahrtrichtung durch Trennstreifen von 2 x 3 m voneinander getrennt. Als weiteres wies der Versuchsstandort die in Tab. 2 wiedergegebene Charakteristik auf. Die Applikation der Antagonisten erfolgte über Saatgut-Priming (*S. plymuthica*) bzw. Beschichtung des Saatguts (*G. catenulatum*) nach der unter 2.7.2 beschriebenen Methode. Folgende Testvarianten wurden einbezogen:

1. *Serratia plymuthica*, HRO-C48<sup>Rif</sup>
2. *Serratia plymuthica*, HRO-C48<sup>Rif</sup> mit Metconazol Behandlung (Fungizid) nach dem Pflanzenauflauf am 07.Okt
3. *Gliocladium catenulatum*
4. *Gliocladium catenulatum* mit Metconazol Behandlung nach dem Pflanzenauflauf am 07.Okt
5. Saatgutbehandlung ohne Testorganismus

### 2.7.2 Beizung des Saatgutes

Die Antagonisten wurden für den Feldversuch mit folgenden Trägersubstanzen appliziert. Primingbehandlung des Saatgutes erfolgte mit *S. plymuthica* wie unter 2.5.1. und Saatgutbehandlung mit *G. catenulatum* wie unter 2.5.2. Anschließend wurde nach Abtropfen das Insektizid Chinook (20 g/ kg Saatkorn) und das Fungizid DMM mit 10g/kg Saat in einer Pilierungsapparatur im Labormaßstab bei 400 rpm beschichtet. Talkum „blau“ wurde hierbei solange dazugegeben, bis die Flüssigkeit abgebunden war, und die Samen sich vereinzeln ließen. Die Saat wurde in der Cleanbench 1h im sterilen Luftstrom getrocknet

### 2.7.3 Bestimmungen von Wachstumsparametern

Die Erfassung von Frisch- und Trockenmasse einiger Pflanzen diente der Bestimmung der wachstumsfördernden Effekte. Zur Bestimmung der Frisch- und Trockenmasse wurden 40 Pflanzen der jeweiligen Varianten herangezogen. Die Pflanzen wurden 10 Wochen nach Auflauf (BBCH 18-19) genommen, vom Wurzelmaterial befreit und anschließend gewogen.

Die Beerntung wurde mit einem Parzellenmähdrescher durchgeführt. Von jeder Parzelle wurde eine Ernteprobe von etwa 500 g bis 800 g entnommen. Anhand dieser Proben erfolgte die Bestimmung der Kornfeuchtigkeit (%) an einem Kornfeuchtmessgerät, die Bestimmung des Schmutzanteils (%) im Erntegut und des TKG (g/1000 Körner). Anhand der Ergebnisse für den Parzellenertrag, die Kornfeuchtigkeit, das TKG sowie den Schmutzanteil in der Ernteprobe wurden die Hektarerträge (dt/ha) bezogen auf eine Kornfeuchtigkeit von 9 % sowie das TKG bezogen auf 9 % Feuchtigkeit berechnet.

#### **2.7.4 Reisolierung der applizierten Antagonisten**

Die Reisolierung der applizierten Antagonisten erfolgte wie unter 2.6.5. beschrieben.

#### **2.7.5 Krankheitserreger des Blattapparates**

Die Bonitur des Pathogens *P. lingam* erfolgte anhand der charakteristischen Pyknidien, die zentral eine kleine Öffnung (Ostiole) besitzen. Durch Auszählen bzw. bei starkem Befall durch Schätzen der Anzahl dieser Pyknidien konnte der Parameter Befallsstärke im Bestand ermittelt werden.

#### **2.7.6 Krankheitserreger des Wurzelhals- und Stängelbereiches**

Die ab Mitte Mai bis zur Ernte durchgeführte Bonitur des *P. lingam*-Befalls geschah getrennt nach Wurzelhals und Stängel, wobei neben der Erfassung der Befallshäufigkeit im Bestand (BHB) die Bestimmung des Befallswertes (BW) nach dem Boniturschema von Krüger (1982) erfolgte, welches für die getrennte Beurteilung von Wurzelhals (Tab. 3) und Stängel (Tab. 4) leicht geändert wurde.

**Tab.2** : Beschreibung der Versuchsflächen am Standort Hohenschulen 2005/2006

Zeitraum	2005/2006
Versuchsanlage	randomisierte Blockanlage
Parzellengröße	14 x 3 m
Ackerzahl	40-55
Bodenart	sL
Vorfrucht	Wintergerste
Raps-Fruchtfolgeanteil (%) der letzten 5 Jahre	40%
Sorte	Talent
Beizung	0,1% DMM (Dimethomorph), 2 % (Chinook als Insektiziden), Talkum
Aussaatstärke	50 Körner/m <sup>2</sup>
Aussaat/Ernte	23.08.05, 05.08.06
Herbizide	24.08.05: Nimbus 3,0 l/ha
Insektizid	21.04.06: Biscaya 0,3 l/ha
Düngung	22.03.06: 120 kg N/ha (KAS) 18.04.06: 80 kg N/ha (KAS) 21.04.06: 200 g Mg/ha (Kieserit) 21.04.06: 1 kg Bo/ha (Bor), 1 L Mn/ha (Manganchelat), 3 kg /ha (Bittersalz)
Wirtschaftsdünger	--

### 2.7.7 *Verticillium dahliae*

Die Bonitur erfolgte nach dem Ausgraben und Aufschneiden von Pflanzen (Länge ca. 40-50 cm) im Entwicklungsstadium BBCH 100 nach der Ernte anhand der Analyse von 50-70 Einzelpflanzen innerhalb einer Parzelle, wobei die Befallsbewertung durch die Berechnung der Befallshäufigkeit im Bestand geschah. Für die Bonitur auf den Befall wurde nachfolgendes Schema (Tab. 5) verwendet (verändert nach Krüger 1988).



**Tab. 3:** Schema zur Ermittlung des Befallswertes für *Phoma lingam* am Wurzelhals (Krüger 1982, verändert).

Befallswerte	Beschreibung für den Wurzelhalsbefall
1	Kein Befall
2	Einzelne kleine, nicht tief gehende Flecken an der Oberfläche
3	Kleine Flecken an der Oberfläche mit geringer Verkorkung und/oder geringer Verbräunung am Wurzelhals
4	Zwischenwert
5	Verkorkung am Wurzelhals gut sichtbar, Stängel umfassend, aber noch nicht tief oder einseitig tief, etwa die Hälfte des Stängelumfangs umfassend, und/oder starke Verbräunung am Wurzelhals. Die Pflanze ist zur Zeit des Schwadlegens (Stadium 85-87) noch grün
6	Zwischenwert
7	Tiefe Einschnürungen am Wurzelhals, Pyknidien meist reichlich vorhanden. Die Pflanze beginnt zur Zeit des Schwadlegens zu vergilben
8	Zwischenwert
9	Wurzelhals stark und sehr tief verkorkt, sehr wenige/keine Verbindungen mit der Wurzel. Die Pflanze ist vorzeitig reif oder bereits abgestorben

## 2.8 Angabe meteorologischer Daten

Zur Aufzeichnung der meteorologischen Daten dienen am Standort Hohenschulen vorhandene Wetterstationen vom Typ Weihofen der Firma Adolf Thies GmbH & Co. KG, Göttingen. Die folgenden Parameter wurden durch eine kontinuierliche Messung aufgezeichnet: Niederschlag (mm), Lufttemperatur (°C) und die relative Luftfeuchtigkeit (%) in 2 m Höhe.

**Tab. 4:** Schema zur Ermittlung des Befallswertes für *P. lingam* am Stängel (Krüger 1982, verändert)

Befallswert	Beschreibung für den Stängelbefall
1	Kein Befall
2	Kleine Flecken an der Oberfläche
3	Größere Flecken an der Oberfläche
4	Zwischenwert
5	Größere Flecken, die auch tiefer in den Stängel eindringen
6	Zwischenwert
7	Tiefe Befallsstellen mit Pyknidien, Stängel eingetrocknet oder aufgeweicht
8	Zwischenwert
9	Ausgedehnte, tief gehende Befallsstellen am Stängel. Pflanze infolge des Befalls vorzeitig abgestorben

**Tab. 5:** Befallswerte für *Verticillium dahliae* (Krüger 1986 ,verändert).

Befallswert	Beschreibung
1	Kein Befall
2	Geringe (1-5 cm) und einseitige Ausbreitung der Mikrosklerotien
3	Noch geringe Ausdehnung der Besiedlung mit Mikrosklerotien (3-10 cm)
4	Zwischenwert
5	Sehr deutliche Symptomausprägung. Die Sklerotien haben ein 10 bis 30 cm langes Stängelstück besiedelt
6	Zwischenwert
7	Mehr als die Hälfte des Stängels weist Mikrosklerotien auf
8	Zwischenwert
9	Pflanze völlig mit Sklerotien besiedelt

## 2.9 Statistische Auswertung

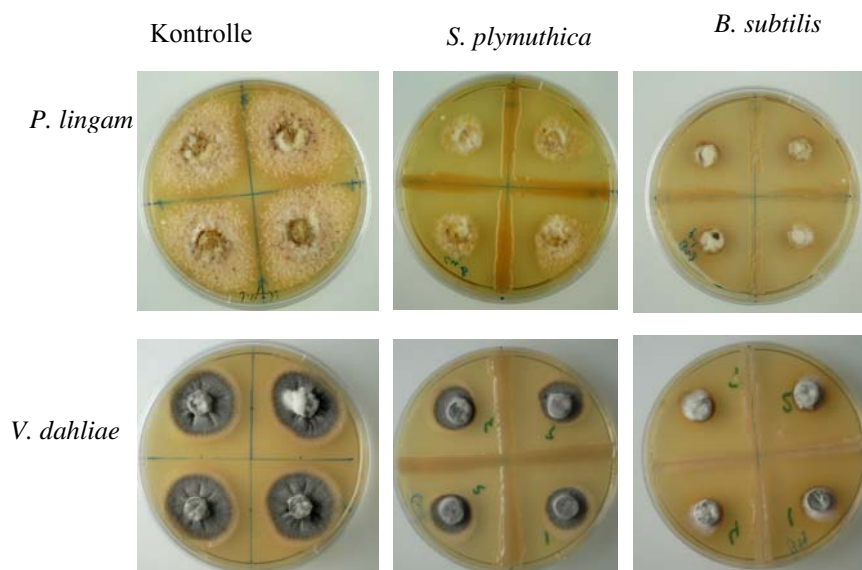
Grundlage der statistischen Verrechnung der Daten sämtlicher Parameter bilden die Mittelwerte der drei Wiederholungen im Biotest und *ad planta* Versuchen und der vier Wiederholungen im Feldversuch, beziehungsweise die sich daraus ergebenden Mittelwerte jeder Variante. Multiple Mittelwertvergleiche wurden anhand des Anova- und Tukey HSD-Tests durchgeführt. Der paarweise Mittelwertvergleich erfolgte mittels T-Test. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt  $p < 0,05$ , sofern nicht anders angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Ergebnisse der *in vitro* Tests

##### 3.1.1 Hemmung des Myzelwachstums von *P. lingam* und *V. dahliae* durch Antagonisten

Die Bakterienisolate wurden im Dual-Test auf eine Hemmung des Myzelwachstums der Pathogene *P. lingam* und *V. dahliae* untersucht. Dieses Schnellverfahren erlaubt eine Vorauswahl hemmstoffbildender Antagonisten (Fravel 1988; Heupel 1992; Tilcher 1996), zumal die *ad planta* Hemmwirkung häufig auf eine Antibiose zurückzuführen ist (Broadbent et al. 1971).



**Abb.5:** Beispiel der Hemmwirkung durch die Bakterienisolate *S. plymuthica* und *B. subtilis* gegenüber *P. lingam* und *V. dahliae* (Myzel) auf dem Nährmedium Waksman (WA) im Biotest I.

Alle ausgewählten Isolate reduzierten das Myzelwachstum von *P. lingam* sowohl auf V8 als auch auf WA (Tab. 6). Allerdings wurden Unterschiede in ihrer Wirksamkeit gegen *P. lingam* und *V. dahliae* auf V8 und WA gefunden. Die Hemmwirkung war auf WA meistens ausgeprägter als auf V8.

**Tab. 6:** *In vitro* Hemmwirkung ausgewählter Antagonisten gegenüber *P. lingam* und *V. dahliae* (Myzel) auf Nährmedien (V8 und WA) im Biotest I (4: Hemmhof >10mm; 3: 5-10 mm; 2: <5 mm; 1: Kein Hemmhof, Bakterienkolonie nicht überwachsen; 0: Überwachsen der Bakterienkolonie; 0-: Bakterienkolonie nicht gewachsen)

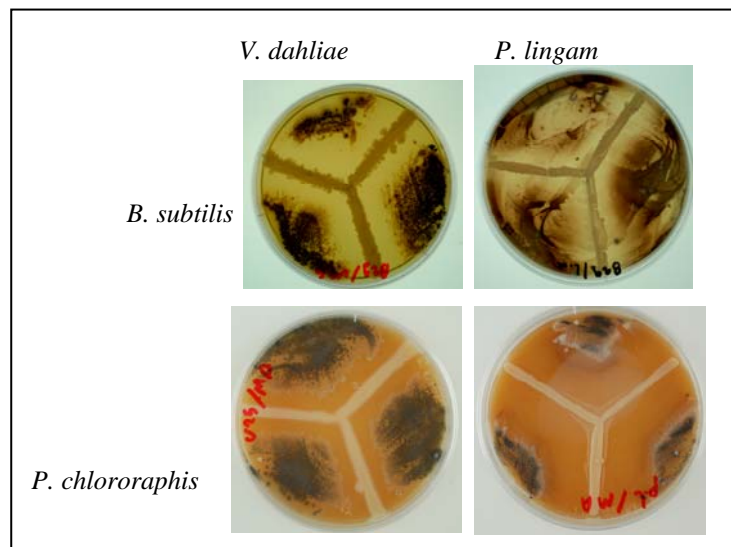
Antagonisten	<i>P. lingam</i>				<i>V. dahliae</i>			
	22°C		10°C		22°C		10°C	
	V-8	WA	V-8	WA	V-8	WA	V-8	WA
<i>S. plymuthica</i>	3	3	3	3	4	4	4	4
<i>B. subtilis</i>	4	4	0-	0-	4	4	0-	0-
<i>Pa. polymyxa</i>	3	2	2	3	3	3	3	3
<i>P. fluorescens</i> (1Re2-6)	2	3	3	4	3	3	3	3
<i>P. chlororaphis</i>	4	2	4	4	4	2	4	4
<i>G. catenulatum</i>	4	4	3	3	4	4	4	4
<i>P. fluorescens</i> (E9)	1	1	2	1	1	1	1	1

Da das Hyphen- und Myzelwachstum von *V. dahliae* und *P. lingam* bereits bei niedrigen Temperaturen von ab 6 °C im Boden oder auf Blättern beginnt und die Rapswurzeln infiziert werden können, wurde die *in vitro*-Hemmwirkung der mikrobiellen Antagonisten nicht nur bei 22 °C, sondern auch bei 10 °C überprüft. Es sollten vor allem diejenigen Antagonisten ermittelt werden, die auch bei niedrigen Temperaturen eine hohe Hemmaktivität besitzen. In Tab. 7 ist die Größe der Hemmzonen bei verschiedenen Temperaturen angegeben. Fast alle getesteten Bakterienisolate hemmten *V. dahliae* und *P. lingam* bei 10°C mit unterschiedlich starken Abweichungen weniger stark als bei 22 °C. Nur *P. fluorescens* (E9) verursachte bei beiden Temperaturen eine geringere Hemmwirkung mit Hemmzonen <5 mm und *B. subtilis* wuchs bei 10°C nicht. Im Gegensatz dazu fanden sich einige Isolate, die sowohl bei 22 °C als auch bei 10 °C eine Hemmung von *V. dahliae* und *P. lingam* hervorriefen.

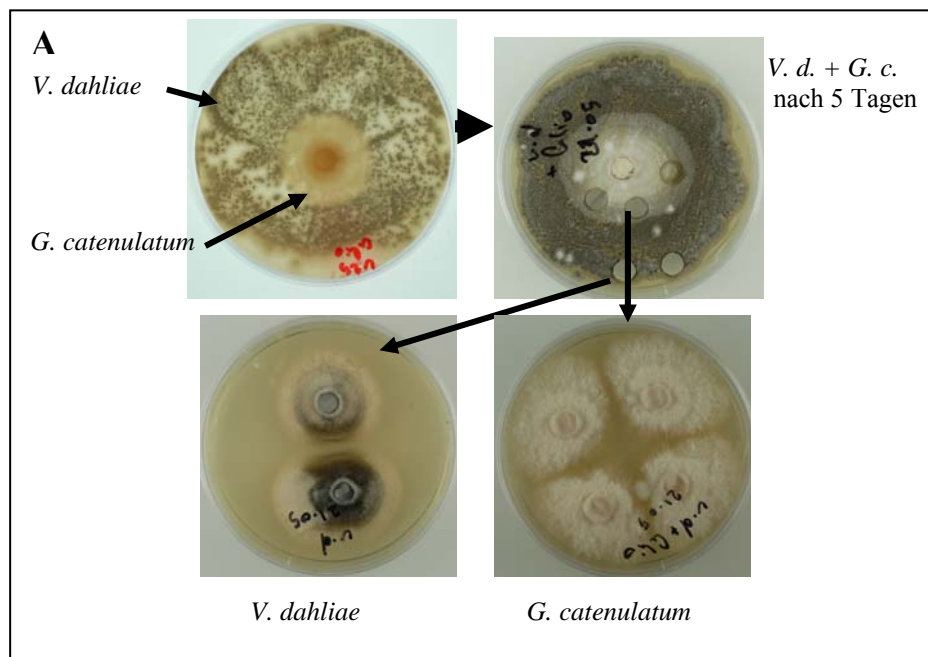
### 3.1.2 Hemmung der Keimung bzw. Bildung von Mikrosklerotien von *V. dahliae* und der Pyknidiosporen von *P. lingam*

Neben der *in vitro*-Hemmwirkung auf das Myzelwachstum von *V. dahliae* bzw. *P. lingam* wurde der Einfluss der antagonistischen Mikroorganismen auf die Keimung der Mikrosklerotien bzw. Pyknidiosporen überprüft. Da die Primärinfektion des Rapses unter natürlichen Bedingungen von den im Boden überdauernden Mikrosklerotien (*V. dahliae*) und Pyknidiosporen bzw. Ascosporen auf Pflanzenrest (*P. lingam*) ausgeht, wurde die Hemmung

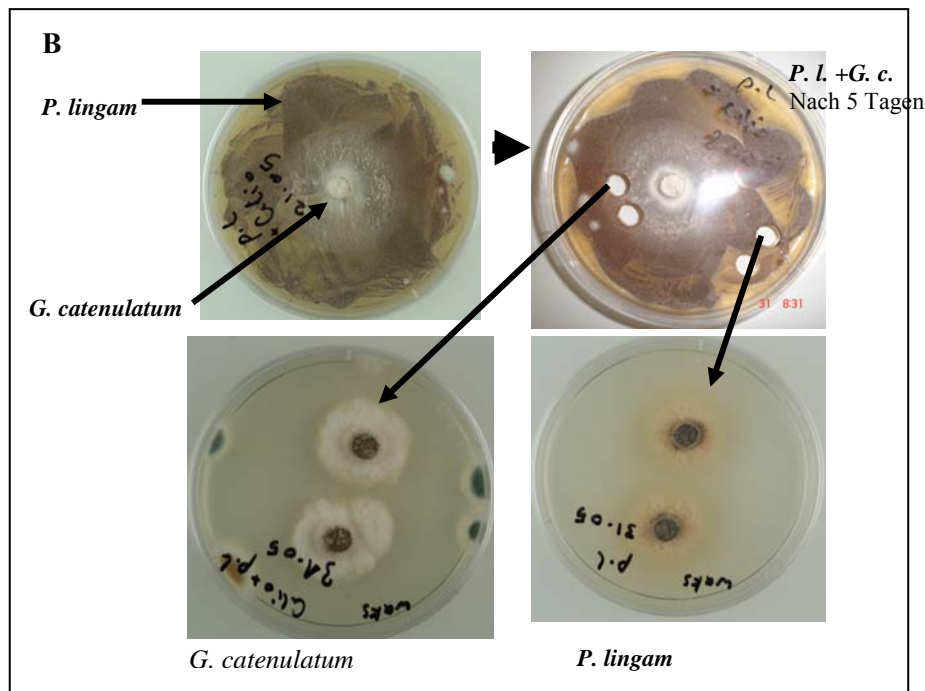
der Mikrosklerotien bzw. Pyknidiosporen durch die antagonistischen Isolate untersucht (Tab.7).



**Abb. 6:** Beispiel der Hemmwirkung der Bakterien *B. subtilis* bzw. *P. chlororaphis* gegenüber *P. lingam* (Pyknidiosporen) (rechts) und Sklerotien von *V. dahliae* (links) auf Nährmedien Waksman (WA) bzw. V8 im Biotest I.



**Abb. 7A:** Hemmwirkung von *G. catenulatum* gegenüber Sklerotien von *V. dahliae* auf Waksman (WA) im Biotest I, wobei 100µl Sklerotiensuspension von *V. dahliae* auf Waksman-Agar und eine myzelbewachsene Agarscheibe von *G. catenulatum* eingelegt wurde. Nach 5 Tagen wurde eine Agarscheibe von Zentrum bzw. Rand der Petrischale in neuen Waksman-Agar eingelegt.



**Abb. 7B:** Hemmwirkung von *G. catenulatum* gegenüber *P. lingam* (Pyknidiosporen) auf Waksman (WA) im Biotest I. 100µl Pyknidiosporensuspension von *P. lingam* auf Waksman-Agar und eine myzelbewachsene Agarscheibe von *G. catenulatum* wurden eingelegt. Nach 5 Tagen wurde eine Agarscheibe von Zentrum bzw. Rand der Petrischale auf neuen Waksman-Agar eingelegt.

*G. catenulatum* zeigte eine starke Hemmwirkung auf die Sklerotien von *V. dahliae* und Pyknidiosporen von *P. lingam*. Auch nachdem myzelbewachsene Agarstücke aus der Hemmzone genommen und auf WA gelegt wurden, wuchs nach 5 Tagen nur Myzel von *G. catenulatum* (Abb. 7A + B).

**Tab. 7:** *In vitro*-Hemmwirkung ausgewählter Antagonisten gegenüber *P. lingam* (Pyknidiosporen) und *V. dahliae* (Sklerotien) auf Nährmedien (V8 und WA) im Biotest I. (4: Hemmhof >10 mm; 3: 5-10 mm; 2: <5 mm; 1: Kein Hemmhof, Bakterienkolonie nicht überwachsen; 0: Überwachsen der Bakterienkolonie; 0-: Bakterienkolonie nicht gewachsen).

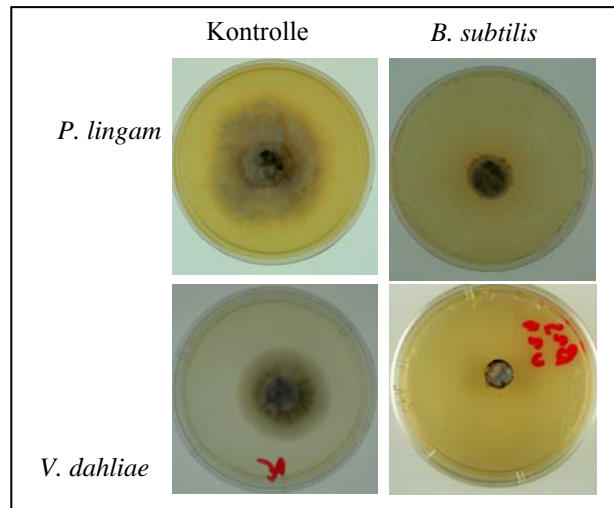
Antagonisten	<i>P. lingam</i>				<i>V. dahliae</i>			
	22°C		10°C		22°C		10°C	
	V-8	WA	V-8	WA	V-8	WA	V-8	WA
<i>S. plymuthica</i>	3	2	2	2	3	4	4	4
<i>B. subtilis</i>	4	4	0-	0-	4	4	0-	0-
<i>Pa. polymyxa</i>	3	1	2	1	0	0	0	1
<i>P. fluorescens</i> (1Re2-6)	4	4	2	4	2	3	2	4
<i>P. chlororaphis</i>	4	0	4	0	4	0	4	0
<i>P. fluorescens</i> (E9)	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>G. catenulatum</i>	2	2	2	2	4	4	3	3

Die getesteten Antagonisten hemmten die Keimung der Mikrosklerotien und Pyknidiosporen und ihre Bildung über 10 mm (z.B. *S. plymuthica*). Insbesondere *B. subtilis* verursachte keinerlei Hemmung bei Temperaturen von 10 °C und eine höhere Wirkung bei 22 °C auf beiden Medien, während *P. chlororaphis* eine höhere Wirkung auf V8 bei beiden Temperaturen zeigte, dagegen auf WA keine ausgeprägte Hemmung bei beiden Temperaturen aufwies. *G. catenulatum* zeigte eine sehr gute Wirkung gegen *V. dahliae* und eine mittlere Wirkung gegen *P. lingam* bei beiden Temperaturen

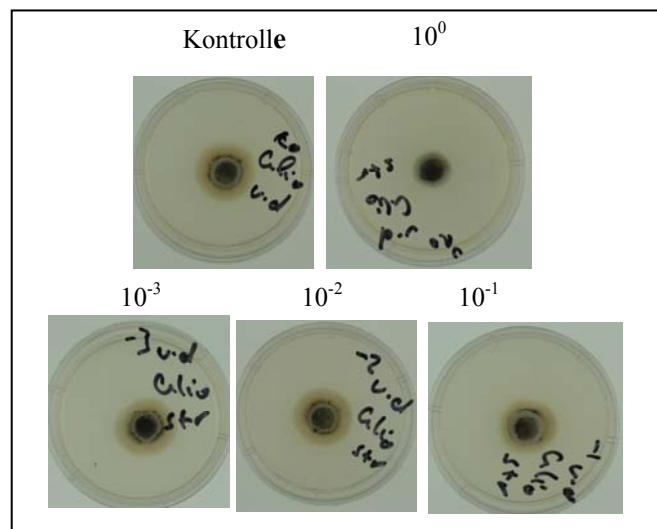
### 3.1.3 Test bakterieller Sterilfiltrate gegen *V. dahliae* und *P. lingam*

Die Fähigkeit der Bakterien, das Pilzwachstum durch extrazelluläre Substanzen (z.B. lytische Enzyme oder Antibiotika) zu hemmen, wurde im Biotest II (Sterilfiltratetest) untersucht. Mit Hilfe des entwickelten Testsystems sollte die Ausscheidung antimykotischer Metabolite der antagonistischen Bakterien bestimmt werden. Gleichzeitig sollte durch eine Verdünnung der verwendeten Kulturfiltrate bis auf 1:1000 die Hemmaktivität der einzelnen Isolate genauer eingeschätzt werden. In Tab. 8 sind die Ergebnisse der antimykotischen Wirkung gegen *V. dahliae* und *P. lingam* zusammengefasst. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Kulturfiltrate einiger Antagonisten eine hohe antimykotische Wirkung besitzen. Die Kulturfiltrate von allen Antagonisten außer *S. plymuthica* töteten die Konidien von *V. dahliae* und *P. lingam* zu 100% bei Konzentration  $10^0$  ab. Insbesondere Kulturfiltrate von *B. subtilis*, *Pa. polymyxa* und Pseudomonaden töteten die Konidien von *V. dahliae* und *P. lingam* zu 100% ab bei Konzentrationen von  $10^0$  bzw.  $10^{-1}$ . Es erscheint, dass die Kulturfiltrate von *S. plymuthica* und *G. catenulatum* eine niedrige Wirkung (> 30 %) bei Konzentrationen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  gegen *V. dahliae* und mittlere Wirkung (30-60 %) gegen *P. lingam* haben. Die Konidien waren in der Regel auf ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Größen geschwollen und stark vakuolisiert (Abb.10). Keimende Konidien bildeten abnormal wachsendes Myzel, das stark vakuolisiert war und dann auf das fünf- bis zehnfache angeschwollene Hyphenendigungen aufwies. Später platzten die Hyphen (Abb. 9).





**Abb. 8:** Beispiel der Hemmwirkung eines Kulturfiltrats *B. subtilis* (rechts) im Vergleich zur Kontrolle (links) auf das Myzelwachstum von *P. lingam* (oben) bzw. *V. dahliae* (unten) (Biotest II), wobei in Konzentration  $10^0$  (5 ml Kulturfiltrats von *B. subtilis* mit 15 ml Waksman-Agar 40 °C) und (5 ml TSB mit 15 ml Waksman-Agar 40 °C) als Kontrolle nach Festwerden des Agars auf die Oberfläche zentral eine Myzelscheibe des Testpilzes aufgesetzt wurde und nach 7 Tagen bei 22 °C ausgewertet wurde. (Bewertungsschlüssel: siehe 2. 4. 2).

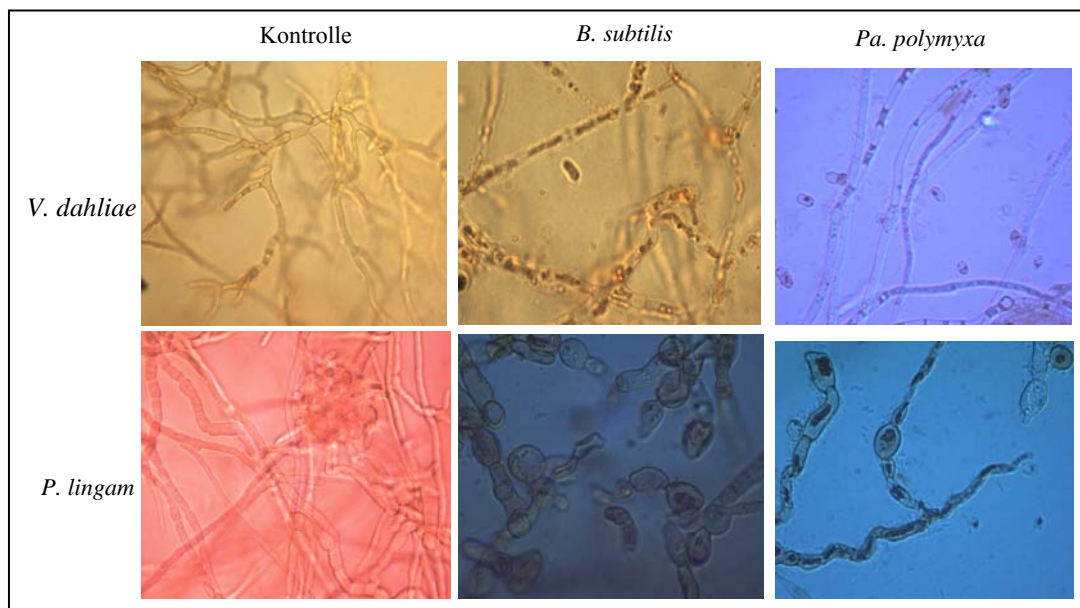


**Abb. 9:** Beispiel der Hemmwirkung eines Kulturfiltrats *G. catenulatum* im Vergleich zum Kontrolle in vier verschiedenen Konzentrationen auf das Myzelwachstum von *V. dahliae* (Biotest II) wobei (5 ml Kulturfiltrats von *G. catenulatum* mit 15 ml Waksman-Agar 40 °C) und (5 ml TSB mit 15 ml Waksman-Agar 40 °C) als Kontrolle nach Festwerden des Agars auf die Oberfläche zentral eine Myzelscheibe des Testpilzes aufgesetzt wurde, und nach 7 Tagen bei 22 °C ausgewertet wurde. (Bewertungsschlüssel: siehe 2. 4. 2).

Selbst bei der Verdünnung von 1:1000 hemmte das Kulturfiltrat der Antagonisten das Myzelwachstum von *V. dahliae* bzw. *P. lingam* noch schwach (Abb. 9, Tab. 8).

**Tab. 8:** Relative Wachstumshemmung gegenüber der unbehandelten Kontrolle von *V. dahliae* und *P. lingam* durch steriles Kulturfiltrat der Antagonisten in vier verschiedenen Konzentrationen (Biotest II), wobei 5 ml Kulturfiltrat einer Antagonistenkultur mit 15 ml Waksman-Agar 40 °C und 5 ml TSB mit 15 ml Waksman-Agar 40 °C als Kontrolle nach Festwerden des Agars auf die Oberfläche zentral eine Myzelscheibe des Testpilzes aufgesetzt wurde, und nach 7 Tagen bei 22 °C ausgewertet wurde. +++ Hemmung >60%; ++ Hemmung 30-60%; + Hemmung <30%; - Kontrolle 0%.

Antagonisten	<i>P. lingam</i>				<i>V. dahliae</i>			
	Verdünnungsstufen							
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. plymuthica</i>	+++	++	++	++	++	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	+++	+++	++	+	+++	+++	+	+
<i>Pa. Polymyxa</i>	+++	+++	+	+	+++	+++	+	+
<i>P. fluorescens</i>	+++	+++	+	+	+++	+++	++	+
<i>P. chlororaphis</i>	+++	+++	++	+	+++	+++	+	+
<i>G. catenulatum</i>	+++	++	+	+	+++	+	+	+



**Abb. 10:** Einfluss der Kulturfiltrate von *B. subtilis* und *Pa. polymyxa* auf die Konidienkeimung und die Hyphenmorphologie von *V. dahliae* bzw. *P. lingam* nach einer Inkubation von 24 Std. bei 22°C. Safraneinfärbung zeigt Zelltod an.

Im Biotest II wurden die Antagonisten auch mit autoklaviertem sterilem Kulturfiltrat der Antagonisten behandelt. Dadurch ließ sich eine Wirkung thermolabiler lytischer Enzyme ausschließen, da diese im Zuge des Autoklavierens (121°C, 20 min) inaktiviert bzw. denaturiert werden. Somit war eine Hemmung des Pilzwachstums allein auf die Wirkung

einer oder mehrerer thermostabiler antibiotischer Substanzen zurückzuführen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Kulturfiltrate von *G. catenulatum* eine niedrige bis mittlere Wirkung ( $\leq 25\%$ ) bei Konzentrationen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-3}$  gegen *V. dahliae* ermittelt. Gleichzeitig erzielten die Kulturfiltrate von *S. plymuthica* niedrige bis keine Wirkung ( $< 25$  bis  $0\%$ ) bei Konzentrationen von  $10^0$  bis  $10^{-3}$  gegen *V. dahliae* und bei Konzentrationen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-3}$  gegen *P. lingam*, wobei eine höhere Wirkung als bei den anderen Antagonisten ( $> 50\%$ ) gegen *P. lingam* ermittelt wurde (Tab. 9).

**Tab. 9:** Relative Wachstumshemmung von *V. dahliae* und *P. lingam* durch autoklaviertes Sterilfiltrat der Antagonisten in vier verschiedenen Konzentrationen (Antibiose), wobei 5 ml Kulturfiltrats von Antagonistenkultur mit 15 ml Waksman-Agar  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 ml TSB mit 15 ml Waksman-Agar  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  als Kontrolle nach Festwerden des Agars auf die Oberfläche zentral eine Myzelscheibe des Testpilzes aufgesetzt wurde, und nach 7 Tagen bei  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  ausgewertet wurde. +++ Hemmung  $> 50\%$ ; ++Hemmung  $50\text{-}25\%$ ; + Hemmung  $<25\%$ ; - Kontrolle ( $0\%$ ).

Antagonisten	<i>P. lingam</i>				<i>V. dahliae</i>			
	Verdünnungsstufen							
	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$
Kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. plymuthica</i>	+++	++	+	-	+	+	-	-
<i>B. subtilis</i>	+++	+++	++	+	+++	+++	+	+
<i>Pa. Polymyxa</i>	+++	+++	++	+	+++	++	+	+
<i>P. fluorescens</i>	+++	++	+	+	+++	+++	+	+
<i>P. chlororaphis</i>	+++	+++	+	+	+++	+++	+	-
<i>G. catenulatum</i>	+++	+++	++	+	+++	++	+	+

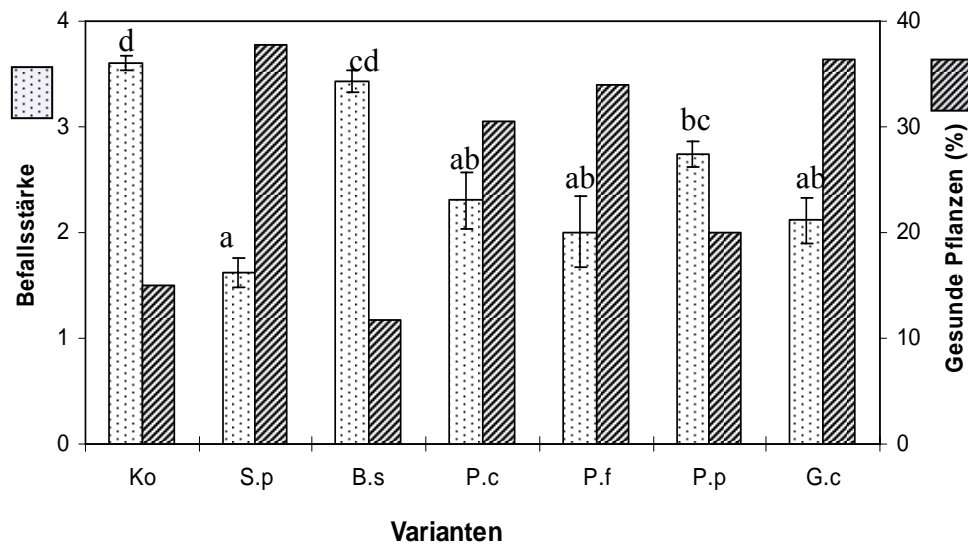
### 3.2 Anwendung der Antagonisten gegen *P. lingam* im Spritzverfahren

#### 3.2.1 Wirkung der Antagonisten auf *P. lingam* – Befall der Keimlinge

Um die im Dualtest dokumentierte Wirkung auch *ad planta* nachzuweisen, wurden im Gewächshaus bzw. im Klimaschrank Rapskeimlinge im Entwicklungsstadium BBCH 11/12 behandelt (Abb.11).

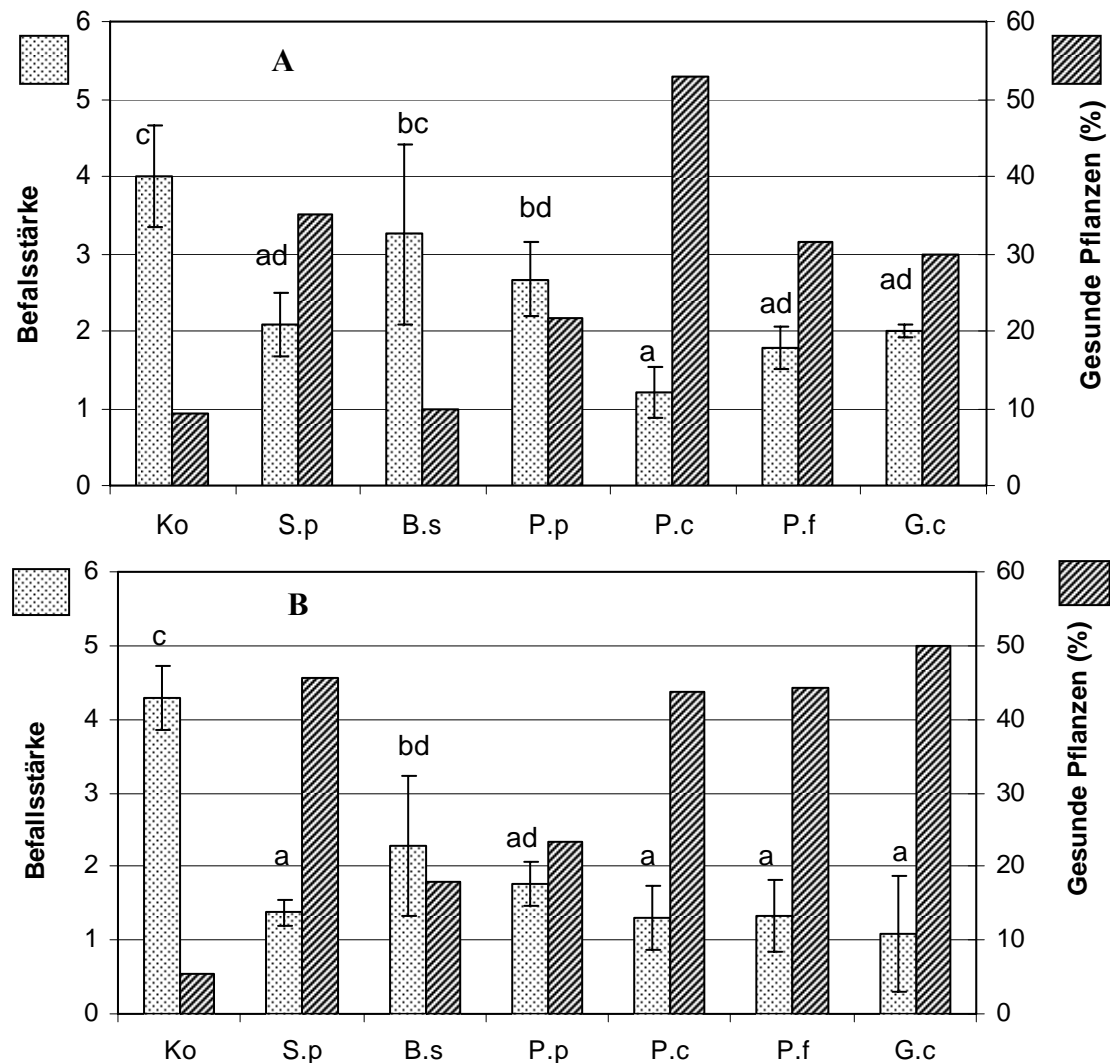


**Abb. 11:** Rapspflanze im Entwicklungsstadium BBCH 11/12



**Abb. 12:** Einfluss verschiedener Antagonisten nach Blattapplikation von  $3,3 \times 10^8$  cfu/Pflanze bei  $10^9$  cfu/ml in der Applikationslösung und bei 22 °C im Klimaschrank auf die Befallsstärke (Skala = 0-6) und den Anteil gesunder Pflanzen nach Inokulation der Kotyledonen mit  $2 \times 10^5$  cfu/Pflanze bei  $2 \times 10^7$  cfu/ml in der Infektionslösung von *P. lingam*. Ergebnisse (Säulen) der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 45$  Pflanzen pro Variante).

Die Antagonisten wurden auf ihre Hemmwirkung gegen *P. lingam* geprüft. Die Befallsreduktion als Anteil (%) gesunder Pflanzen und Befallsstärke nach 14 Tagen nach dem Einsatz der Antagonisten wurde im Klimaschrank bzw. Gewächshaus ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb.12 bzw. 13 dargestellt.



**Abb. 13:** Einfluss verschiedener Antagonisten nach Blattapplikation von  $5,5 \times 10^7$  ctu/Pflanze bei  $10^9$  cfu/ml in der Applikationslösung auf die Befallsstärke (Skala = 0-6) und den Anteil gesunder Pflanzen nach Inokulation der Kotyledonen (Sorten Ural: A und Talent: B) mit  $2 \times 10^5$  cfu/Pflanze von *P. lingam* (Applikationslösung bei  $2 \times 10^7$  cfu/ml) im Gewächshaus Ergebnisse (Säulen) der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 45$  Pflanzen pro Variante).

Aus der Abb. 12 und 13 wird deutlich, dass fast alle getesteten Antagonisten in der Lage waren, den Pflanzenbefall mit *P. lingam* bis zum 14. Tag zu unterdrücken. Am auffälligsten ist hierbei das Isolat *S. plymuthica*, das einen Wirkungsgrad von 46% gegenüber *P. lingam* erzielte. Die Verwendung der Isolate *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *Pa. polymyxa*, *B. subtilis* und *G. catenulatum* führten zu deutlichen Befallsreduktionen von jeweils 53,8 % (Sorte Ural), 44,1 %, 23,4 %, 17,9 % und 50% (Sorte Talent) (Abb.13). Dass die Befallsstärke der Kontrolle höher im Gewächshaus als Klimaschrank war, weist darauf hin, dass die Antagonisten auch bei einem höheren Befallsdruck mit *P. lingam* die Pflanzen schützen. In den Versuchen war noch zu beobachten, dass die Antagonisten die Ausbildung erkennbarer Befallssymptome von *P. lingam* um 5 bis 7 Tage verzögern konnten.

### 3.2.2 Wirkung der Antagonisten auf den Stängelbefall von *P. lingam*

Um erste Informationen über die *ad planta* Wirksamkeit der Antagonisten zu bekommen, wurden Versuche mit Rapskeimlingen den eigentlichen Versuchen mit jungen Rapspflanzen vorangestellt. Die Versuche mit Keimlingen können allerdings die Wirksamkeit der Antagonisten gegen Wurzelhals- und Stängelbasisbefall mit *P. lingam* nicht widerspiegeln. Für eine künstliche Infektion wird in der Regel der Wurzelhals der Jungpflanzen vor Inokulation mit einer Sporen- bzw. Myzelsuspension mechanisch verletzt. Da diese Infektionsbedingungen im Feld nicht vorliegen, erschien es sinnvoll, eine naturnahe Infektionsmethode, ohne künstlich gesetzte Verletzung der Pflanze, zu entwickeln, auch wenn bisherige Annahmen davon ausgingen, dass eine Infektion ohne vorherige Verletzung nicht möglich sei. Hierzu wurden in Vorversuchen myzelbewachsene Agarscheiben von V8-Kulturen auf den Wurzelhals junger Rapspflanzen (BBCH 14/15) gelegt. Bereits nach wenigen Wochen waren an Geweberissen des Stängels starke Nekrosen sichtbar, in denen sich Pyknidien von *P. lingam* entwickelten. Dies führte zu der Annahme, dass der Pilz über natürliche Wunden das Stängelgewebe infiziert. Näheren Aufschluss hierzu gab ein Versuch, bei dem Rapspflanzen der Sorte Talent bzw. Ural im Stadium BBCH14/15 an Geweberissen des Wurzelhalses und am intakten Hypokotyl mit myzelbewachsenen Agarscheiben von *P. lingam* inokuliert wurden (Tab.10). Hier rief dieses Isolat am Wurzelhals wesentlich häufiger Symptome als am Hypokotyl hervor. Dieser Unterschied kam auch in der Befallsstärke der Pflanzenorgane zum Ausdruck. Somit konnte die Annahme bestätigt werden, dass *P. lingam* junge Rapspflanzen vorwiegend über Geweberisse am Wurzelhals infiziert.

Der Einfluss der Antagonisten gegen *P. lingam* wurde an Rapspflanzen im befallsempfindlichen Entwicklungsstadium BBCH14/15 im Gewächshaus bzw. Klimaschrank (22 °C) überprüft. Damit diese ihr Wirkpotential möglichst vollständig entfalten konnten, wurde die Antagonistensuspension 2 Tage vor der Inokulation mit *P. lingam* auf die Stängelbasis und den Wurzelhals aufgebracht, so dass die Antagonisten auch genügend Vorsprung hatten, sich auf der Pflanze zu etablieren und Infektion für das Pathogen zu besetzen. In den Versuchen zur Überprüfung der Hemmaktivität *ad planta* wurden die Antagonisten in Kulturmedium angezogen, zentrifugiert und in 0,25% Xanthan und 0,02% Tween 20 auf einer Endkonzentration von ca.  $2 \times 10^9$  cfu/ml eingestellt. Xanthan sollte aufgrund seiner Viskosität die Zahl der applizierten Bakterien auf der Pflanzenoberfläche erhöhen, während Tween für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Oberfläche zuständig war.

**Tab. 10:** Einfluss verschiedener Antagonisten nach Stängelapplikation von  $4 \times 10^8$  cfu/Pflanzen auf die Befallsstärke (VDT = 0-4), Wirksamkeit (W%) und Anteil gesunder Pflanzen nach Inokulation mit einem Inokulum von *P. lingam* ( $2 \times 10^5$  cfu/ Pflanze bei  $2 \times 10^7$  cfu/ml in der Inokulationslösung oder mit einem gewachsenen *P. lingam*-Myzel auf Agarstück am Stängel 2 Tage nach Applikation der Antagonisten, Auswertung 50 Tage nach Inokulation mit *P. lingam*. Ergebnisse der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant unterschiedlich (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ).

Varianten	Klimaschrank						Gewächshaus					
	Inokulum			Agarstück			Inokulum			Agarstück		
	VDT ± SD	W %	G. Pf. (%)	VDT ± SD	W %	G. Pf. (%)	VDT ± SD	W %	G. Pf. (%)	VDT ±SD	W %	G. Pf. (%)
Kontrolle	0,7± 0,2 a	-	0	0,96± 0,2 a	-	13	1,5± 0,2 a	-	0	1,6 ± 0,2 a	-	0
<i>S. plymuthica</i>	0,2 ± 0,34 c	80	64	0,3± 0,06 b	69	42	0,1± 0,1 d	93	53	0,76 ± 0,1 b	53	6,98
<i>B. subtilis</i>	0,43 ± 0,47 bc	53	38	0,32 ± 0,2 b	67	27	0,26± 0,12 d	83	32	1,1 ± 0,1 c	31	0
<i>Pa. Polymyxa</i>	0,53 ± 0,45 b	47	29	0,45 ± 0,39 b	53	33	0,63± 0,26 c	58	0	1,03 ± 0,08 cd	36	0
<i>P. chlororaphis</i>	0,35± 0,42 bc	66	39	0,11 ± 0,16 b	89	48	0,23 ± 0,15 d	85	28	1,19 ± 0,1 c	26	0
<i>P. fluorescens</i>	0,27 ± 0,27 bc	73	43	0,43 ± 0,5 b	65	35	0,48± 0,23 c	68	20	1,13 ± 0,7 cd	29	0
<i>G. catenulatum</i>	0,2 ± 0,36 bc	77	53	0,26± 0,36 b	73	32	0,84± 0,37 b	44	0	0,86 ± 0,07 bd	46	0
<i>p</i>	$10^{-7}$			$10^{-7}$			$10^{-3}$			$10^{-7}$		
<i>n</i>	45			47			48			47		

G. Pf.= Gesunde Pflanzen

Die Ergebnisse sind in Tab. 10 dargestellt. Die Wirkung der Antagonisten unterscheidet sich bei den verschiedenen Infektionsmethoden nicht. *S. plymuthica* zeigte eine deutliche Wirksamkeit mit 80 % bis 69 % nach Infektion mit einem Inokulum von *P. lingam* oder mit einem gewachsenen *P. lingam*-Myzel auf Agar am Stängel im Klimaschrank. Im Gewächshaus wurde eine Wirksamkeit von 93 % bzw. 53 % ermittelt. Der Anteil gesunder Pflanzen war im Vergleich zur Kontrolle um jeweils 64 % bzw. 41,9 % höher. *P. chlororaphis* erzielte eine bessere Wirkung als *S. plymuthica* und *G. catenulatum* mit einer Wirksamkeit von 89 % im Klimaschrank bzw. 66 % im Gewächshaus. Die Wirkung von *P. polymyxa* war geringer. Im Vergleich zur Kontrolle wurde in den allen Versuchen die Befallsstärke durch Einsatz der Antagonistensuspension signifikant reduziert.

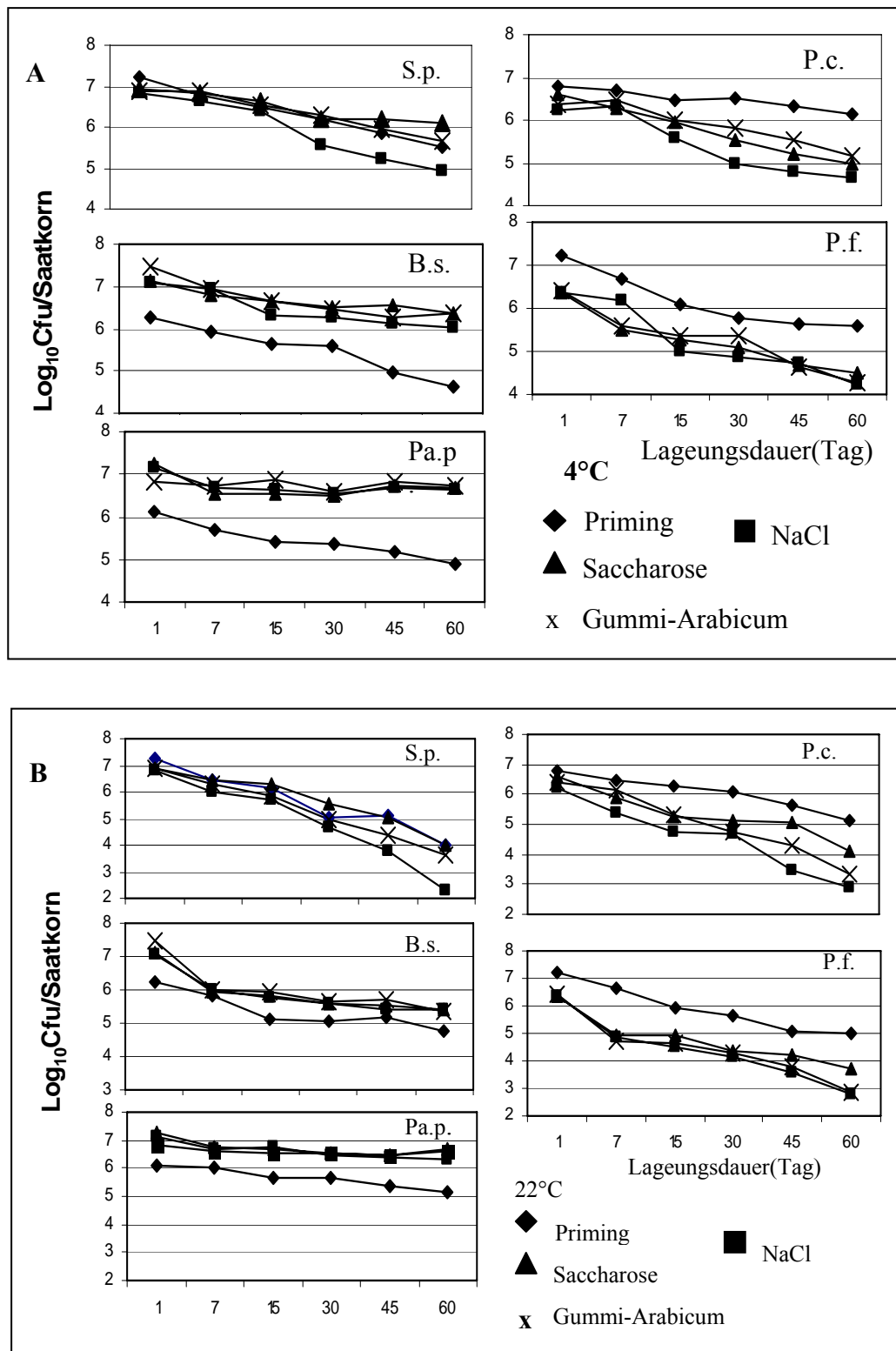
### 3.3 Optimierung der Saatgutbehandlung

#### 3.3.1 Auswahl einer Behandlungsmethode

Die Anwendung mikrobiellen Antagonisten als Spritzapplikation hat dem Nachteil, dass große Aufwandsmengen und die Applikation (Arbeitskosten) den Einsatz verteuern und Umwelteinflüsse die Wirksamkeit, bzw. das Überleben der Antagonisten reduzieren können. Diese Nachteile können durch Saatgutapplikation vermieden werden. Zunächst musste jedoch die Saatgutapplikation optimiert werden. Durch die Anwendung Rifampicin-resistenter Antagonisten war eine Reisolierung auf Rifampicin-haltigem Selektivmedium möglich (siehe 2.5.3). Durch Anwendung dieser Methode konnten Aussagen über die Etablierung der Antagonisten in der Rhizosphäre getroffen werden. Vier verschiedene Applikationsmethoden wurden untersucht (2.5.1).

Der Nachweis der Antagonisten gelang auch noch nach 60 Tagen nach Saatgutbehandlung, egal ob das Saatgut gekühlt (4 °C) bzw. bei Raumtemperatur (22°C) gelagert wurde. Für alle 4 Varianten wurde die Lebendkeimzahl (cfu) pro Samen bestimmt. Die Zahl keimfähiger Zellen lag zu Beginn der Auswertung insgesamt zwischen  $1,38 \times 10^6$  und  $2 \times 10^7$  cfu bei allen Varianten. Die detaillierten Werte sind in der Abb. 9 dargestellt. Über die Dauer der Lagerung nahm die Dichte der Antagonisten immer ab und zwar bei höherer Temperatur schneller als bei Lagerung bei 4°C. Gram-positive und -negative Bakterien unterschieden sich wesentlich in der Reaktion auf die verschiedenen Methoden. Während die Gram-negativen Bakterien bei Applikation durch Saatgutpriming in höherer Anzahl auf den Samen überlebten als bei der kurzzeitigen Behandlung (bei *Pseudomonas* spp. war die cfu/Samen bei Saatgutpriming am höchsten), reagierten Gram-positive Bakterien (B.s, Pa.p.) mit einer niedrigeren cfu/Samen bei Applikation nach der Primingmethode.

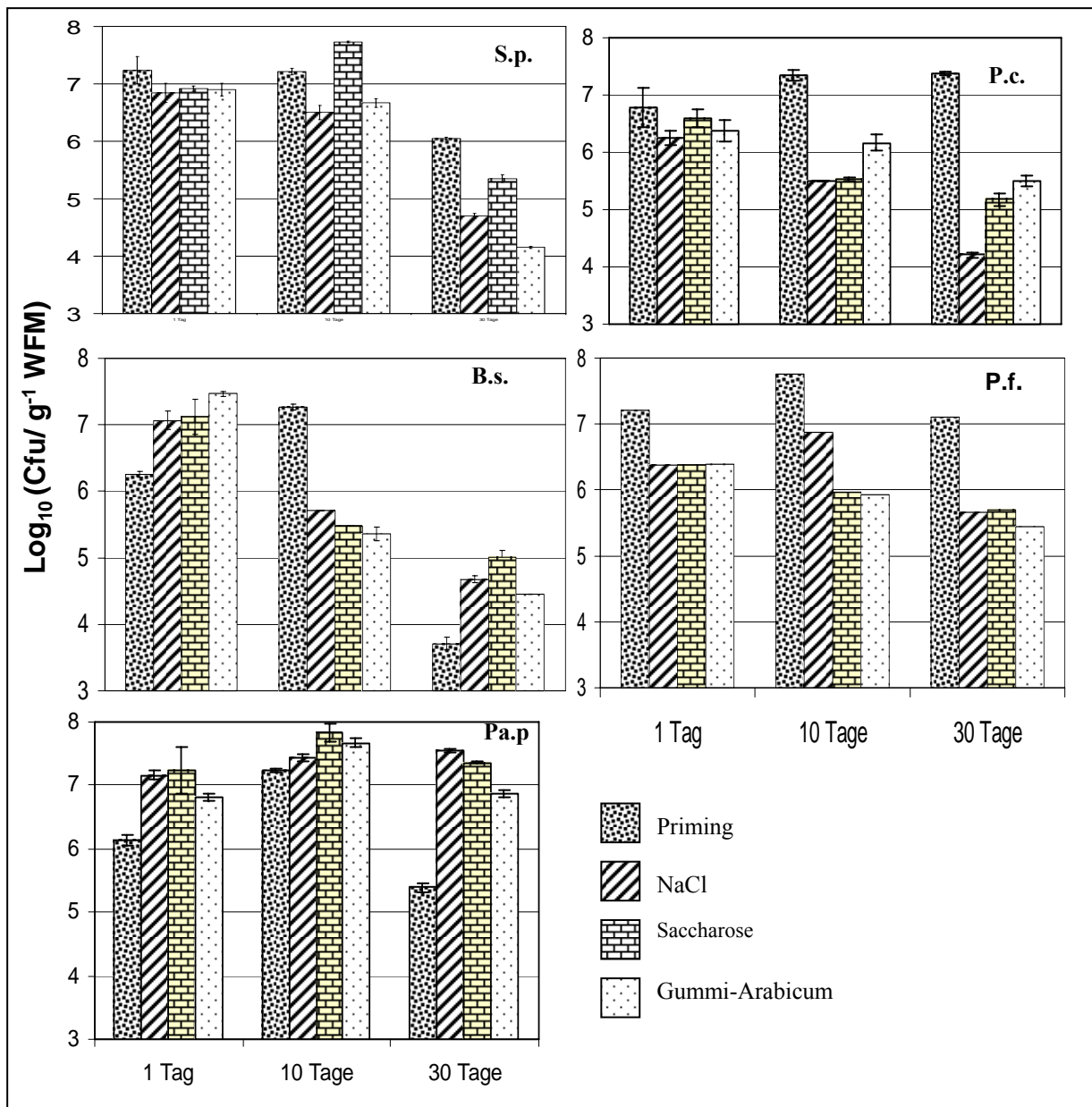




**Abb. 14:** Einfluss verschiedener Substanzen bzw. der Primingmethode auf die Zahl und Überlebensdauer von antibiotika-resistenten Bakterien nach Behandlung von 2 g Samen mit 2 ml einer  $2 \times 10^{10}$  cfu/ml Bakteriensuspension suspendiert in 0,85 % NaCl für 5 Std. und Trocknung bei Zimmertemperatur für 2 Tage (Priming), 0,85 % NaCl, 1 % Saccharose oder 3 % Gummi-Arabicum jeweils für 2 Min. mit anschließender Behandlung mit Talkum und einer anschließenden Lagerung von 60 d bei 4 °C (A) und bei 22 °C (B). S.p.: *Serratia plymuthica*, B.s.: *Bacillus subtilis*, Pa.p.: *Paenibacillus polymyxa*, P.c.: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f.: *Pseudomonas fluorescens*.

### 3.3.2 Besiedlung der Rhizosphäre von Keimpflanzen

Je 15 Samen pro Variante und Kontrolle wurden ausgesät. Nach 4 Wochen wurde der Versuch beendet und die Etablierung der Antagonisten in der Rhizosphäre der einzelnen Varianten ausgewertet. Dazu wurden Wurzelproben der einzelnen Versuchsversionen genommen und die Lebendkeimzahl (cfu) pro g Wurzelfrischmasse wie unter 2.6.5. beschreiben, bestimmt. In Abb. 15 ist die Besiedlungsdichte antibiotika-resistenter Bakterienstämme in der Rhizosphäre von Winterraps in Abhängigkeit von der Saatgutbehandlungsmethode wiedergegeben. Für Gram-negative Bakterien (*S. plymuthica*, *P. fluorescens* und *P. chlororaphis*) lagen die Abundanzen 4 Wochen nach Priming-Behandlung des Saatgutes nach Reihenfolge bei  $1,1 \times 10^6$ ,  $2,4 \times 10^7$  und  $1,4 \times 10^7$  cfu g<sup>-1</sup> Wurzelfrischmasse. Dabei zeigte sich, dass die Priming-Behandlung des Saatgutes eine statistisch signifikant höhere Abundanz dieser Bakterien an der Wurzel erzielte als die anderen Saatgutbehandlungsmethoden (Abb.15). Es wurde außerdem die Beobachtung gemacht, dass in der Populationsdynamik zwischen den NaCl, Saccharose und Gummi-Arabicum-Behandlungen keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren. Bei den Gram-positiven Bakterien (*B. subtilis*, *P. polymyxa*) zeigte Saccharose als Haftmittel eine höhere Populationsdichte als die anderen Saatgutbehandlungsmethoden. Die Priming-Behandlung hat bei Gram-positiven Antagonisten grundsätzlich schlechter abgeschnitten als die andern Methoden nach 30 Tagen (Abb. 15).

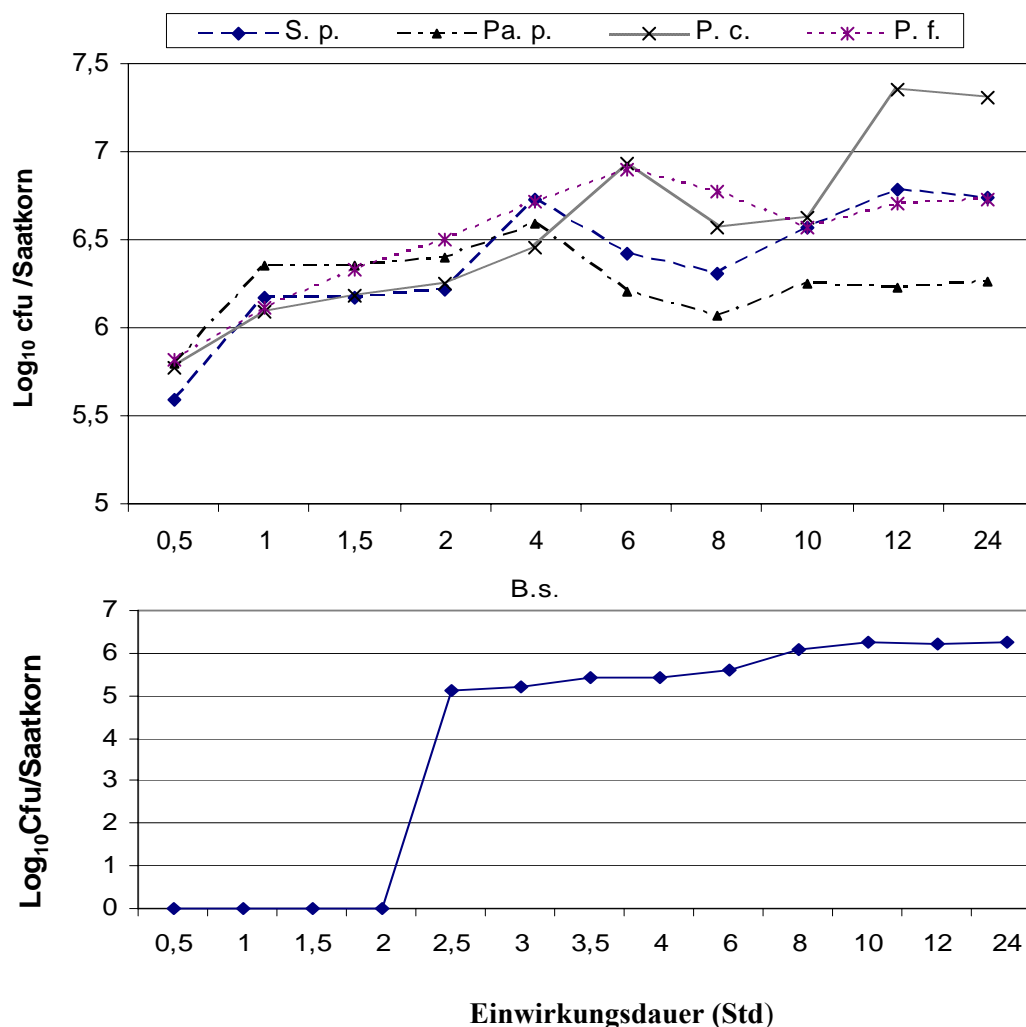


**Abb. 15:** Lebendzellzahlen Log cfu. g<sup>-1</sup> Wurzelfrischmasse von rifampicin-resistenten Antagonisten in der Rhizosphäre. Mittelwerte(± SD) aus 5 Pflanzen 1 Tag, 10 und 30 Tage nach der Saatgutbehandlung von 2 g Samen mit 2 ml einer 2 x 10<sup>10</sup> cfu/ml Bakteriensuspension suspendiert in 0,85 % NaCl für 5 Std. und Trocknung bei Zimmertemperatur für 2 Tage (Priming), 0,85 % NaCl, 1 % Saccharose oder 3 % Gummi-Arabicum jeweils für 2 Min. mit anschließender Behandlung mit Talkum. Pflanzen wurden im Klimaschrank bei 22°C und einer Tageslänge von 12 Std. gehalten S.p.: *Serratia plymuthica*, B.s.: *Bacillus subtilis*, Pa.p.: *Paenibacillus polymyxa*, P.c.: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f.: *Pseudomonas fluorescens*.

### 3.3.3 Einfluss der Behandlungsdauer im Priming auf die Antagonistendichte

Da das Saatgutpriming für Gram-negative Antagonisten die effizienteste Methode zu sein scheint, wurden die weiteren Versuche mit dieser Methode durchgeführt. Bisher wird das Saatgut-Priming in der Praxis nicht eingesetzt, weshalb die Methode bisher nicht optimiert

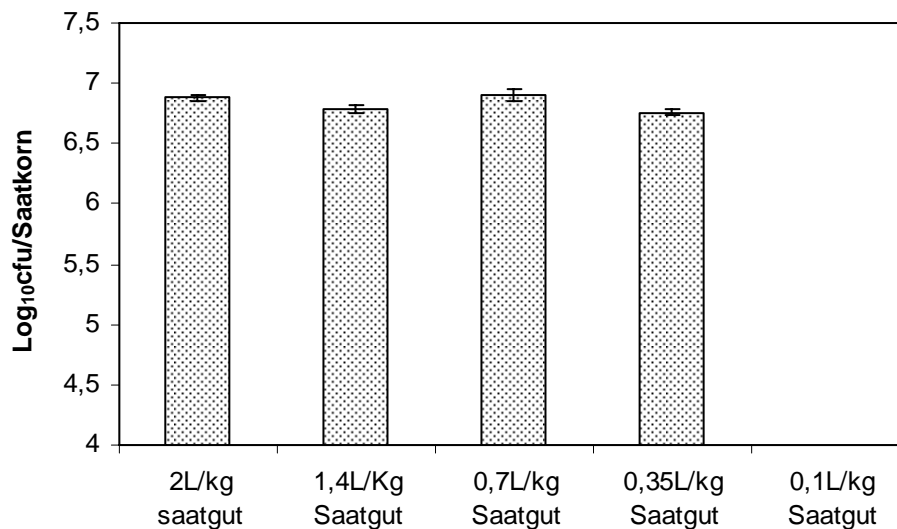
wurde. Ob im Saatgutpriming Prozess Temperatur und Behandlungsdauer eine Rolle spielt, ist bisher unbekannt. Beachtet werden muss natürlich, dass Rapssamen nach 12 Stunden in wässriger Lösung und 25 °C keimen, was natürlich beim Saatgutpriming verhindert werden muss. Ziel einiger Tastversuche war deshalb, den Einfluss der Behandlungsdauer auf die cfu/Samen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Bakterienzellen in die Samen nach einer halben Stunde eindringen können, mit Ausnahme von *B. subtilis*, dass erst nach 2 Stunden Behandlungsdauer im Samen nachweisbar war. Bei allen anderen Bakterienisolaten waren eine hohe cfu/Samen nach 4-6 Stunden bei  $24 \pm 1\text{C}^\circ$  erreicht (Abb.16).



**Abb. 16:** Einfluss der Behandlungsdauer des Saatgut-Priming auf die cfu/Saatkorn. 2 g Samen in 2 ml 0,85 % NaCl-Lösung mit  $2 \times 10^{10}$  cfu/ml Bakterienkonzentration (S.p., Pa.p., P.c. und P.f.) und für B.s. mit  $2 \times 10^9$  cfu/ml für 5 Std. behandelt und Trocknung bei Zimmertemperatur für zwei Tage. Mittelwerte cfu/ Samen aus 10 Samen in 3 Wiederholungen ermittelt. S.p.: *Serratia plymuthica*, B.s.: *Bacillus subtilis*, Pa.p.: *Paenibacillus polymyxa*, P.c.: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f.: *Pseudomonas fluorescens*.

### 3.3.4 Einfluss der Behandlungsmenge im Priming auf die Antagonistendichte

Auch der Einfluss der verwendeten Wassermenge auf die Ansiedlung der Bakterien im Samen wurde untersucht. In der Abb. 17 sind die Ergebnisse dargestellt. Durch Priming-Behandlung des Saatgutes bei verschiedenen Wassermengen wurden keine Unterschiede bei der cfu/Saatkorn nachgewiesen. Erst bei einer Wassermenge von 0,1 l/kg Saatgut wurden keine Bakterien im Saatkorn mehr nachgewiesen.

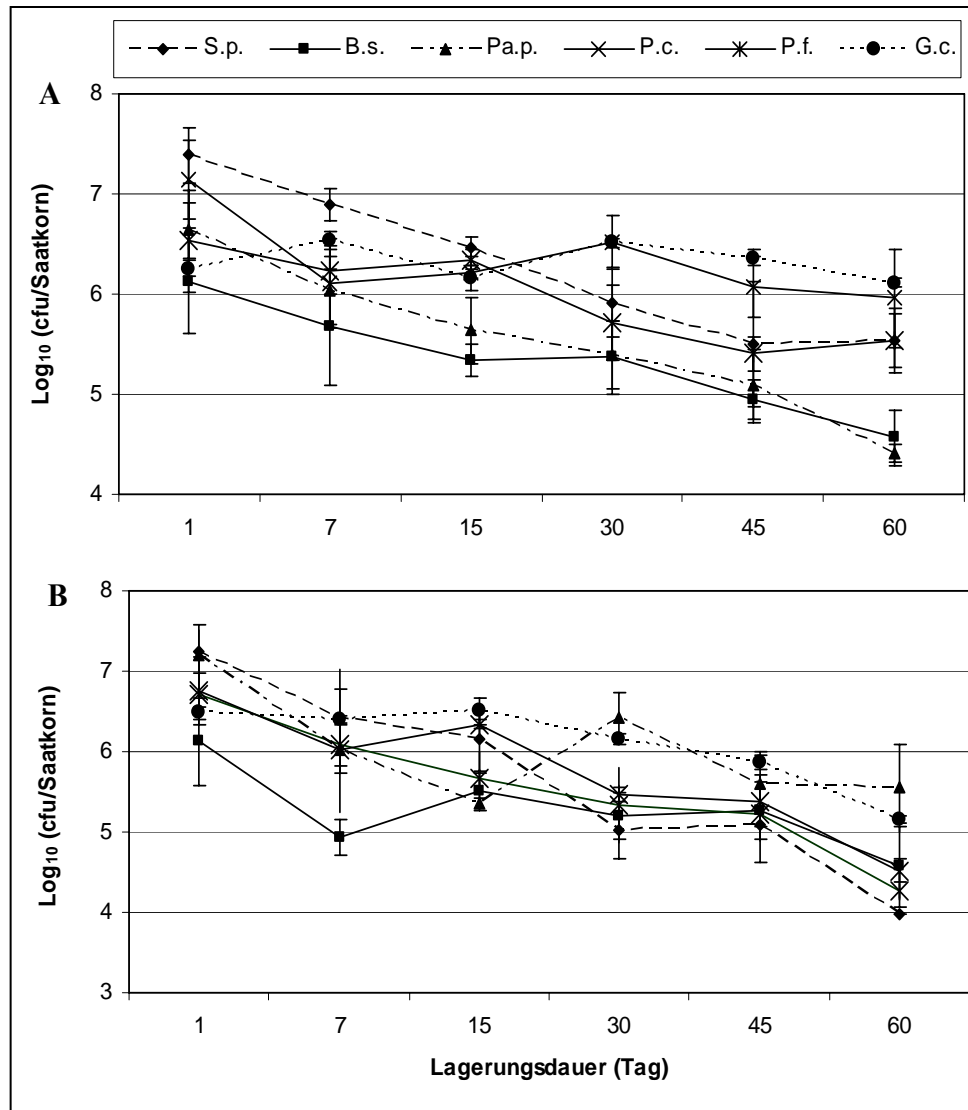


**Abb. 17:** Einfluss der Wassermenge auf die Ansiedlung von *S. plymuthica* im Samen bei Behandlung von 100 kg Saatgut auf die cfu/Saatkorn. 2 g Samen jeder Variante in 0,85 % NaCl-Lösung mit  $4,3 \times 10^{10}$  cfu/ml Bakterienkonzentration für 5 Std. und Trocknung bei Zimmertemperatur für zwei Tage, Mittelwerte cfu/ Samen aus 10 Samen in 3 Wiederholungen.

### 3.3.5 Lagerstabilität nach Saatgutbehandlung durch Priming

Alle Antagonisten waren auch nach einer Lagerungsdauer des Saatguts von 60 Tagen sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei gekühlter Lagerung (4°C) noch nachweisbar. Auffällig war die im Versuchszeitraum auftretende Verminderung der Zelldichte des Bakteriums *S. plymuthica* um eine logarithmische Einheit von 7,4 auf 5,7 log<sub>10</sub> cfu/Saatkorn. Eine weitgehende Stabilisierung der Lebendkeimzahl von *P. chlororaphis* bei 6,4 und *G. catenulatum* von 6,3 auf 6,1 log<sub>10</sub> cfu/Saatkorn konnte bei gekühlter Lagerung ermittelt werden. Diese Stabilisierung wurde auch bei Lagerung bei Raumtemperatur dokumentiert. Für die Isolate *B. subtilis* und *Pa. polymyxa* wurde dagegen bei 4°C ein Vitalitätsverlust von ca. zwei logarithmischen Einheiten verzeichnet. Die Lebendkeimzahl dieser Isolate sank

innerhalb von 2 Monaten von 6,1 auf 4,3 (*B. subtilis*) bzw. von 6,6 auf 4,4 log<sub>10</sub> cfu/Saatkorn (*Pa. polymyxa*). Bei ungekühlter Lagerung war die Reduktion der Lebendkeimzahl dieser Isolate um zwei logarithmische Einheiten festzustellen (Abb.18).

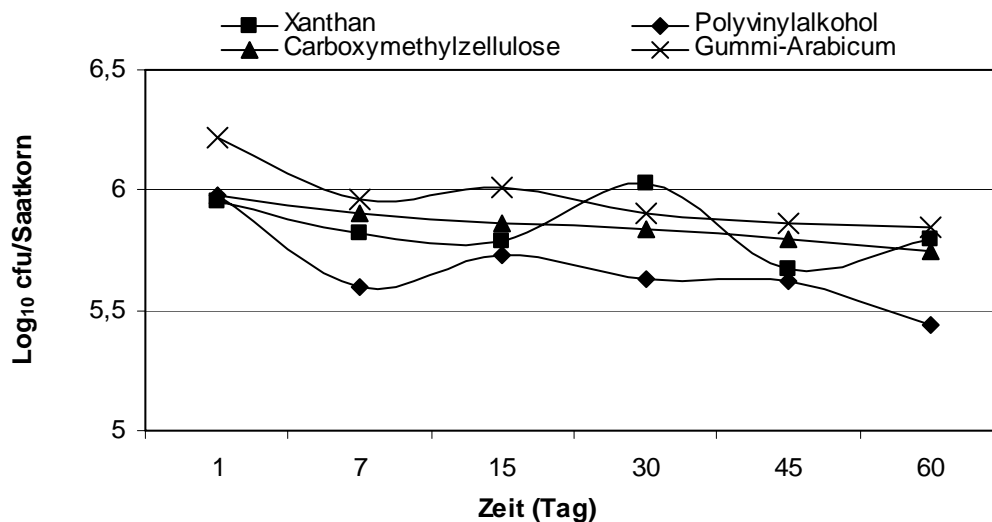


**Abb. 18:** Persistenz verschiedener Rifampicin-resistenter Bakterienisolate an Samen von Sommerraps "Ural" nach einer Priming-Behandlung des Saatgutes und Lagerung von 60 d bei 4°C (A) und bei Raumtemperatur (B). 2 g Samen in 2 ml 0,85 % NaCl-Lösung mit  $5,3 \times 10^{10}$  cfu/ml Bakterienkonzentration (S.p., Pa.p., P.c. und P.f.) und mit  $3,4 \times 10^9$  cfu/ml von B.s. für 5 Std. behandelt und Trocknung bei Zimmertemperatur für zwei Tage. Mittelwerte cfu/Samen wurde aus 10 Samen in 3 Wiederholungen ermittelt. S.p.: *Serratia plymuthica*, B.s.: *Bacillus subtilis*, Pa.p.: *Paenibacillus polymyxa*, P.c.: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f.: *Pseudomonas fluorescens*.

### 3.3.6 Optimierung der Saatgutinkrustierung mit *G. catenulatum*

Entscheidend für eine gleichmäßige Wurzelbesiedlung kompetenter Rhizosphärenmikroorga-

nismen ist eine geeignete Applikationsform (Kloepper et al., 1989), die sich von der für die Bakterien benutzten Methode für Pilze unterscheidet. Um den Pilzstamm als mikrobiologisches Präparat anwenden zu können, war es notwendig, eine zweckmäßige Formulierungsvariante für *G. catenulatum* zu entwickeln. Die Inkrustierung von Saatgut mit den entsprechenden Mikroorganismen ist dafür eine zielgenaue, kostengünstige und technologisch gut umsetzbare Variante.



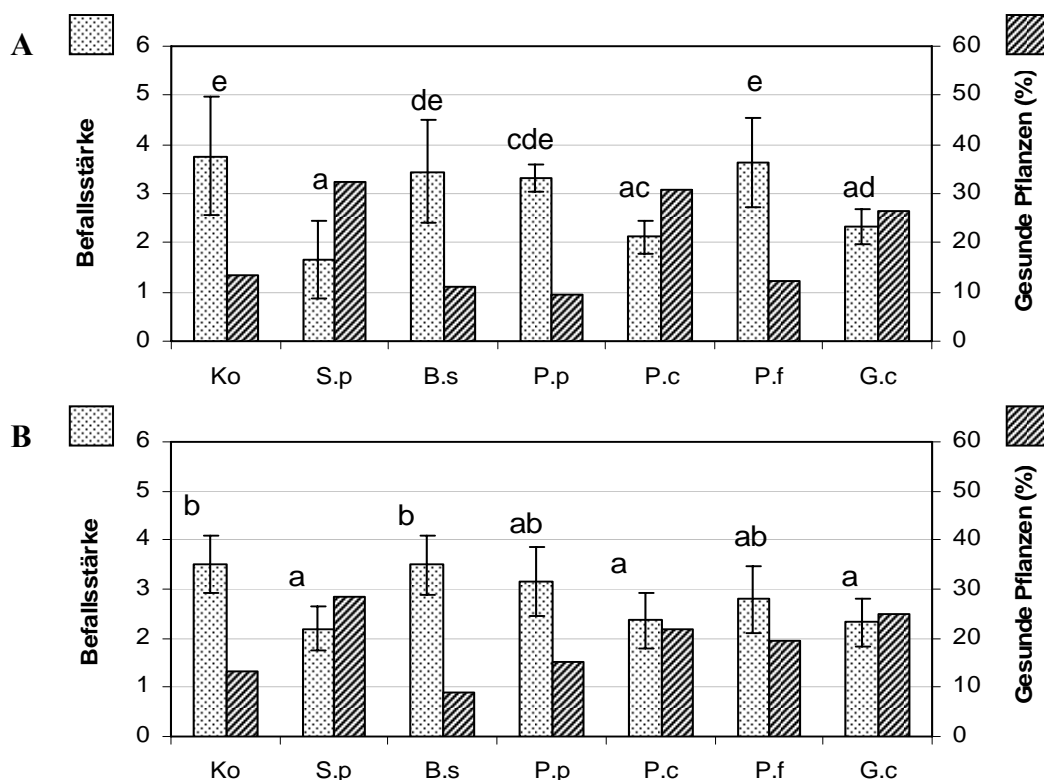
**Abb. 19:** Einfluss der Beizungshilfsstoffe auf die Vitalität der Sporen von *G. catenulatum* über eine Lagerdauer von 60 Tagen bei 22°C. 2 g Samen für jede Variante in 0,5 ml einer Sporenkonzentration  $6 \times 10^8$  cfu/ml von *G. catenulatum* mit 30g/l Gummi-Arabicum für 2 min. und Talkum und Trocknung bei Zimmertemperatur für zwei Tage. Beizungshilfsstoffe wurden mit 20g/l eingesetzt. Mittelwerte cfu/ Same aus 10 Samen in 3 Wiederholungen.

Unter 2.5.2 sind die Versuchsansätzen beschrieben, die dazu dienen, eine möglichst hohe Zellzahl an das Saatgut anzubinden, unter Beibehaltung der Keimfähigkeit des Saatguts. Eine möglichst starke Besiedlung der Keimpflanzenwurzel ist ebenfalls anzustreben. Dazu wurden zunächst Vorversuchen zur Herstellung von *G. catenulatum*-Suspensionen mit hoher Viskosität durchgeführt. Neben Xanthan erwies sich besonders Carboxymethylzellulose (2%) als geeignet, eine verbesserte Haftung der suspendierten Pilze am behandelten Saatgut herbeizuführen. Gleichzeitig verbesserte sich die Überlebensfähigkeit. So konnten noch nach 60 Tagen vitale Sporen reisoliert werden. In den optimalen Varianten wurden eine pilzliche Abundanz von  $7 \times 10^5$  Sporen je Saatkorn für Gummi-Arabicum und  $6,8 \times 10^5$  Sporen je Saatkorn für Xanthan (Abb.19) ermittelt. Die Keimfähigkeit des Saatguts wurde nicht beeinträchtigt.

### 3.4 Wirkung der Saatgutbehandlung auf Befall mit *P. lingam*

#### 3.4.1 Wirkung auf den Befall der Kotyledonen mit *P. lingam*

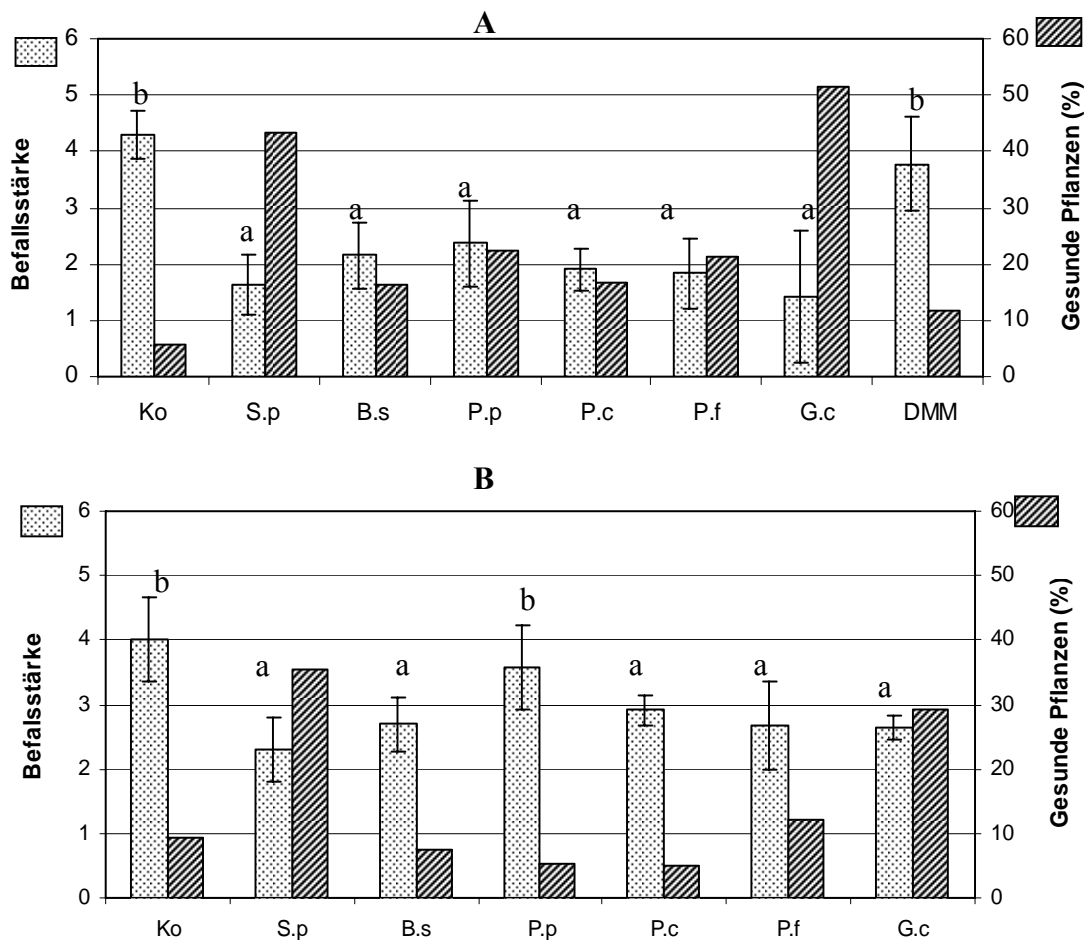
Da eine Flüssigapplikation der Antagonisten mit dem Aufwand für die Applikation verbunden ist und zudem die Umwelteinflüsse die Wirksamkeit der Antagonisten negativ beeinflussen können, erschien es sinnvoll, eine Saatgutbehandlungsmethode anzuwenden. Sofern Antagonisten in der Lage sind, sich in der Rhizosphäre zu etablieren, kann eine dauerhafte und systemische Wirkung erzielt werden. Ob diese Wirkung auch durch Saatgutapplikation auf Raps erreicht werden kann, sollte näher untersucht werden. Die bakteriellen Antagonisten wurden mit  $10^{6-7}$  cfu/Saatkorn und der Pilz *G. catenulatum* mit  $10^6$  cfu /Saatkorn eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Verwendung der Isolate *S. plymuthica*, *P. chlororaphis* und *G. catenulatum* zu einer Reduktion des Keimlingsbefalls bei der Sorte „Talent“ im Gewächshaus von jeweils 43,3 %, 51,6 % führten. P.c. führte und zu einer deutlich höheren Anzahl gesunder Pflanzen im Versuch im Klimaschrank bei 22 °C (Abb. 20 A).



**Abb.20** Einfluss verschiedener Antagonisten nach Priming-Behandlung des Saatgutes mit  $1-5 \times 10^{10}$  cfu/ml in 0,9% NaCl Lösung auf die Befallsstärke (Skala = 0-6) und Anteil gesunder Pflanzen nach Inokulation der Kotyledonen mit  $2 \times 10^5$  cfu/Pflanze bei  $2 \times 10^7$  cfu/ml von *P. lingam* bei 22 °C im Klimaschrank. Sorten Talent: A und Ural: B. Ergebnisse (Säulen) der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 45$  Pflanzen pro Variante).



Auch bei der Sorte „Ural“ erzielten dieselben Isolate eine signifikante Befallsreduktion gegenüber der Kontrolle (Abb. 20 B). bei der Sorte „Talent“ war der Effekt dieser Isolate auf den Anteil gesunde Pflanzen besonders ausgeprägt. Im Gewächshausversuch wurde mit allen Antagonisten eine signifikante Befallsreduktion erzielt, außer mit *Paenibacillus polymyxa* bei der Sorte Ural (Ab. 21 A+B).



**Abb.21:** Einfluss verschiedener Antagonisten nach Priming-Behandlung des Saatgutes mit  $1-5 \times 10^{10}$  cfu/ml in 0,9% NaCl Lösung auf die Befallsstärke (Skala = 0-6) und Anteil gesunder Pflanzen nach Inokulation der Kotyledonen mit  $2 \times 10^5$  cfu/Pflanze bei  $2 \times 10^7$  cfu/ml von *P. lingam* im Gewächshaus. DMM: 0,01g/g Samen Dimethomorph (BASF, Deutschland). Sorten Talent: A und Ural: B. Ergebnisse (Säulen) der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 50$  Pflanzen pro Variante).

### 3.4.2 Einfluss der Inokulumdichte der Priming-Behandlung des Saatgutes mit Antagonisten auf den *P. lingam*-Befall

Die Antagonisten wurden bei verschiedenen Konzentrationen geprüft, um festzustellen bis zu welcher Dichte am Saatkorn noch eine signifikante Wirkung gegen *P. lingam* zu erzielen. Die

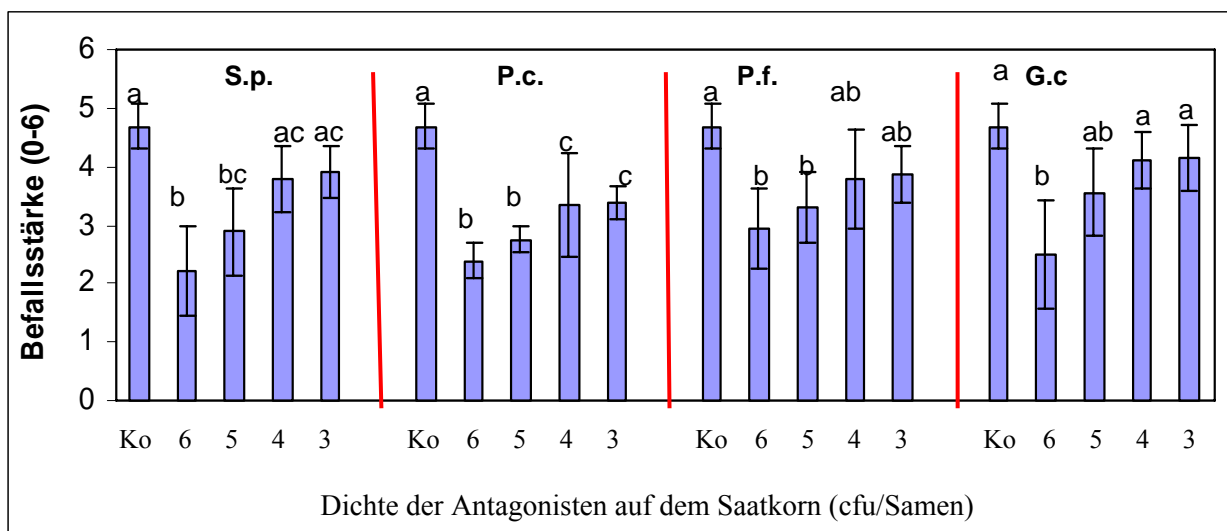
Dichte wurde mittels der Verdünnungsreihen bis  $10^{-7}$  hergestellt. Die Behandlungsmethode und cfu Bestimmung wurde wie unter 2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die notwendige Bakterienkonzentration als cfu/ml und die nach Saatgutpriming resultierende cfu/Samen ist in der Tab. 11 wurden zusammengefasst.

**Tab. 11:** Einfluss der Antagonistendichte cfu/ml auf die Ansiedlung im Samen.

Antagonisten	cfu/ml					
S.p.	$4 \times 10^{10}$	$4 \times 10^8$	$4 \times 10^7$	$4 \times 10^6$	$4 \times 10^4$	$4 \times 10^3$
P.f.	$7,4 \times 10^{10}$	$7,4 \times 10^9$	$7,4 \times 10^6$	$7,4 \times 10^5$	$7,4 \times 10^4$	$7,4 \times 10^3$
P.c.	$9 \times 10^{10}$	$9 \times 10^9$	$9 \times 10^7$	$9 \times 10^6$	$9 \times 10^4$	$9 \times 10^3$
G.c.	-	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	-
	cfu/Samen					
S.p., P.f., P.c.	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$
G.c	-	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$

### 3.4.2.1 Effekt auf den *Phoma lingam*- Kotyledonen-Befall

Die Minderung der Befallsstärke wurde zwei Wochen nach dem Einsatz der Antagonisten im Gewächshaus bonitiert (Abb. 22).



**Abb. 22:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der Antagonisten nach Priming-Behandlung des Saatgutes als  $\log_{10}$  cfu/Saatkorn auf die Befallsstärke (Skala = 0-6) nach Inokulation der Kotyledonen der Rapspflanzen der Sorte „Talent“ mit  $2 \times 10^5$  cfu/Pflanze bei  $2 \times 10^7$  cfu/ml von *P. lingam* bei 22 °C. Ergebnisse (Säulen) der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben innerhalb einer Variante sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 50$  Pflanzen pro Variante).

Der Einsatz der Antagonisten hat den Befall mit *P. lingam* bei einer Dichte der Antagonisten von  $10^6$  bzw.  $10^5$  cfu /Samen signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert (Abb. 22), wobei mit *G. catenulatum* bei  $10^5$  cfu/Samen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Während bei *P. chlororaphis* auch noch bei niedrigerer Dichte ( $<\log 5$ ) eine signifikante Befallsreduktion ermittelt wurde, war diese bei den anderen Antagonisten bei dieser Dichte nicht mehr signifikant.

#### **3.4.2.2 Effekte auf den *P. lingam*-Stängelbefall**

Der Einfluss verschiedener Konzentrationen der Antagonisten S.p., P.c., P.f. und G.c. auf dem Saatkorn wurde auf die Wirkung gegen Stängelbefall durch *P. lingam* untersucht. Die Infektion der Rapspflanzen erfolgte einerseits mit einem flüssigen Inokulum einer Dichte von  $2 \times 10^7$  cfu/ml oder mit einem Stück Agar aus einer *P. lingam* Kolonie auf V8 Medium, das direkt an den Stängel platziert wurde. Der Befall in der Kontrolle war bei Inokulation mit der Flüssigkultur nur geringfügig höher als bei Infektion mit dem Agarstück. Die Evaluierung erfolgte mittel eines Befallsindex (VDT = Volume of disease tissue) in Boniturklassen von 0-4 am 50. Tag nach Aussaat. Die Ergebnisse sind in Tab. 12 dargestellt. Die Wirkung der Antagonisten unterscheidet sich bei den verschiedenen Infektionstypen nicht (Tab. 12 A und B). Während P.f. gar keine oder nur in der höchsten Konzentration eine statisch signifikante Wirkung erzielt, war diese bei Einsatz von G.c. erst ab einer Dichte von  $10^4$  nicht mehr signifikant zur Kontrolle. Die Befallsminderung verursacht durch die Saatgutbehandlung mit S.p. war dagegen noch bis zu einer Dichte von  $10^4$  bzw. bis  $10^3$  bei Infektion mit Agarstücken signifikant. Für P.c. wurde bei allen getesteten Konzentrationen eine signifikante Befallsreduktion am Stängel ermittelt. Der Wirkungsgrad war mit 47 % bei P.c. am höchsten (Tab. 12A), bzw. mit 60 % bei S.p. bei Inokulation mit Agarstücken.

### **3.5 Wirkung der Saatgutbehandlung auf Befall mit *V. dahliae* unter Gewächshausbedingung**

#### **3.5.1 Einfluss auf den Befallsverlauf mit *V. dahliae***

Eine Wirkung der Saatgutbehandlung mit Antagonisten wurde ebenfalls auf den Befall mit dem Erreger *V. dahliae* im Gewächshaus untersucht. Die Applikation der Bakterien erfolgte durch Priming-Behandlung des Saatgutes (5 h) mit den Bakterien in einer 0,85 % (w/v) NaCl-Lösung. *G. catenulatum* wurde durch Saatgutinkrustierung mit Gummi-Arabicum appliziert

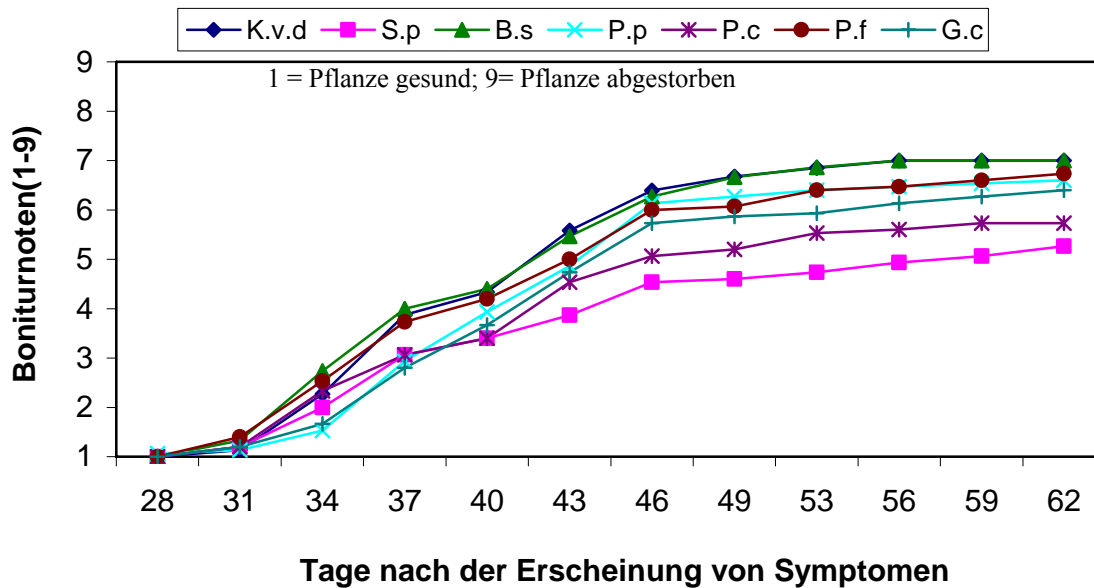
(2.5.1). Je Variante und Kontrolle wurden 20 Samen ausgesät. Der Boden wurde mit *V. dahliae* ELV25 Mikrosklerotien aus einer 4 Wochen alten Kultur auf Vermiculit im Verhältnis 20:1 infiziert (siehe 2.6.1). Die Pflanzschalen wurden alle 2 Tage gegossen. Eine Düngung erfolgte nicht.

**Tab.12:** Einfluss verschiedener Konzentrationen der Antagonisten ( $10^3$ - $10^6$  cfu/Samen) 50 Tage nach Priming-Behandlung des Saatgutes und nach Stängelapplikation von  $2 \times 10^5$  cfu/Pflanze bei  $2 \times 10^7$  cfu/ml *P. lingam*-Flüssigkultur (A) oder mit *P. lingam*-Myzel auf einem Agarstück (B) am Stängel der Rapssorte „Talent“ auf die Befallsstärke (VDT = 0-4) und Wirksamkeit (W%). Versuchsdurchführung im Klimaraum bei 12/12 Std. Belichtung, 20-24 °C und 70-75% Feuchtigkeit. Ergebnisse der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant unterschiedlich (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 40$  Pflanzen pro Variante).

A	Infektion mit Flüssiginokulum ( $2 \times 10^7$ cfu/ml)							
	$10^6$ cfu/Samen		$10^5$ cfu/Samen		$10^4$ cfu/Samen		$10^3$ cfu/Samen	
	VDT ± SD	W %	VDT ± SD	W %	VDT ± SD	W %	VDT ± SD	W %
Kontrolle	2,04 ± 1,1 a	-	2,04 ± 1,1 a	-	2,04 ± 1,1 a	-	2,04 ± 1,1 a	-
<i>S. plymuthica</i>	1,14 ± 0,8 b	44	1,26 ± 0,4 b	38	1,26 ± 0,7 b	38	1,54 ± 0,9 ab	25
<i>P. chlororaphis</i>	1,08 ± 0,4 b	47	1,08 ± 0,3 b	47	1,38 ± 0,4 bc	32	1,86 ± 0,9 c	9
<i>P. fluorescens</i>	1,81 ± 0,7 a	11,3	1,89 ± 0,7 a	7	2 ± 1 a	2	2,04 ± 0,9 a	0
<i>G. catenulatum</i>	1,09 ± 0,7 b	47	1,15 ± 0,6 b	44	1,36 ± 0,6 ab	33	1,82 ± 0,9 ab	11

B	Infektion mit Agarstück							
	$10^6$ cfu/Samen		$10^5$ cfu/Samen		$10^4$ cfu/Samen		$10^3$ cfu/Samen	
	VDT ± SD	W %	VDT ± SD	W %	VDT ± SD	W %	VDT ± SD	W %
Kontrolle	1,87 ± 1,4 a	-	1,87 ± 1,4 a	-	1,87 ± 1,4 a	-	1,87 ± 1,4 a	-
<i>S. plymuthica</i>	0,74 ± 0,5 b	60	0,75 ± 0,5 b	60	0,92 ± 0,6 bc	51	1,33 ± 1 c	29
<i>P. chlororaphis</i>	1,14 ± 0,4 b	39	1,22 ± 0,5 b	35	1,34 ± 1,1 bc	28	1,59 ± 0,4 bc	15
<i>P. fluorescens</i>	1,4 ± 0,7 b	25	1,56 ± 0,6 ab	17	1,7 ± 1 ab	15	1,55 ± 0,8 ab	9
<i>G. catenulatum</i>	0,71 ± 0,3 b	62	0,94 ± 0,6 bc	50	1,65 ± 0,8 ac	12	1,65 ± 0,8 ac	12

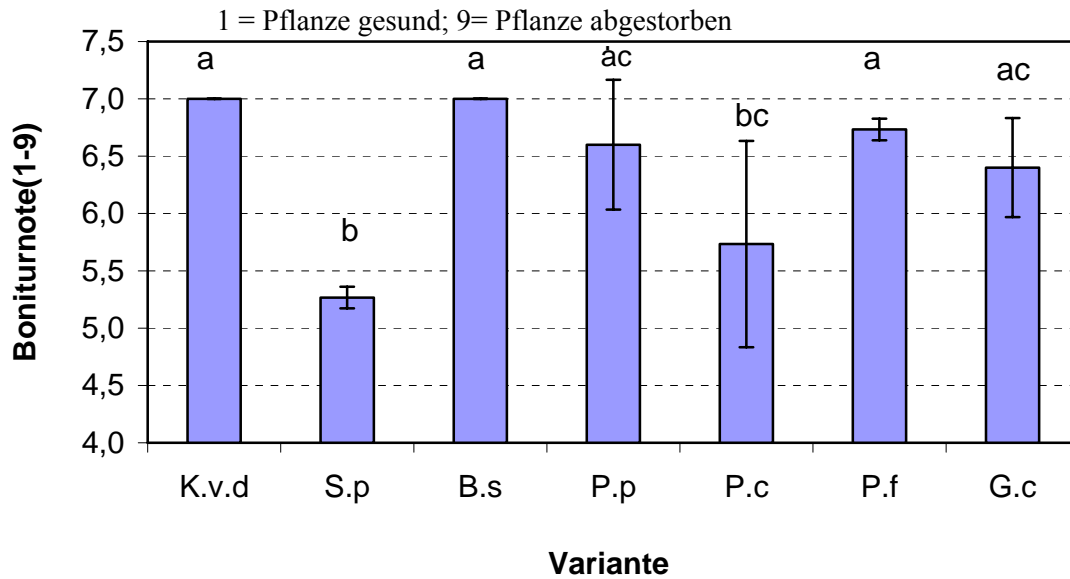
Die Bonitur der Befallssymptome erfolgte nach dem Schema von Zeise (1992) und wurde nach Sichtbarwerden der ersten Symptome alle drei Tage durchgeführt. Erste Befallssymptome wurden in der mit *P. fluorescens* behandelten Variante ca. 4 Wochen nach der Aussaat festgestellt. Kurz darauf zeigten sich bei allen Varianten an vereinzelt Pflanzen erste Befallssymptome. Der Befallsverlauf ist in der Abb. 23 dargestellt.



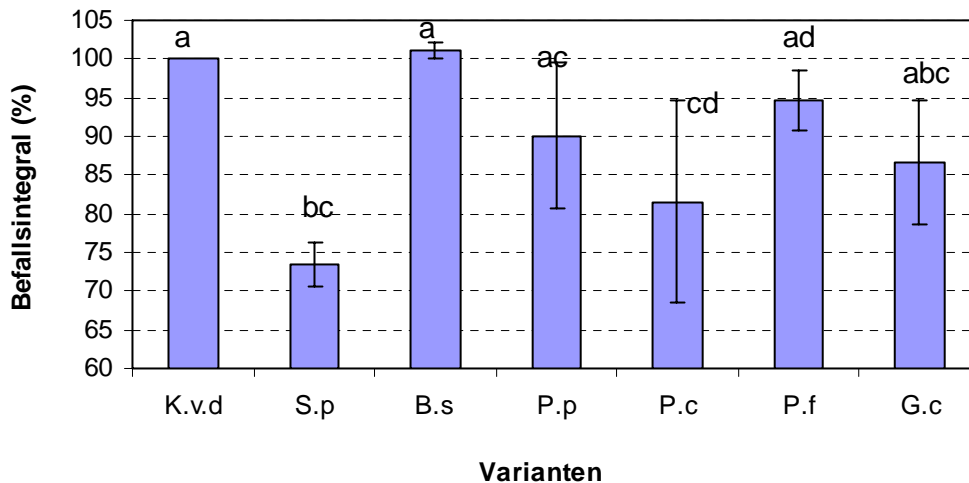
**Abb. 23:** Befallsverlauf (Boniturnoten 1-9) von *V. dahliae* an Raps bis 62 Tage nach Aussaat im Gewächshaus. Mittelwerte aus zwei Versuchen mit 15 Pflanzen je Variante. K.v.d = inokulierte, unbehandelte Kontrolle, S.p: *Serratia plymuthica*, B.s: *Bacillus subtilis*, P.p: *Paenibacillus polymyxa*, P.c: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f: *Pseudomonas fluorescens*, G.c: *Gliocladium catenulatum*.

In den ersten drei Wochen nach dem Auftreten erster Symptome war ein rascher Anstieg der Befallssymptome festzustellen. Bei den Pflanzen aller Varianten konnte eine Zunahme an halbseitigen Chlorosen und eine Vergilbung der ältesten Blätter wahrgenommen werden. Durch die künstliche Infektion des Bodens wurde eine gleichmäßige Infektion der Rapsorte (Talent) mit *V. dahliae* mit einem Befallnote von 7 in den unbehandelten Kontrollen erreicht. Zur besseren Auswertung des Versuchs wurde der Befall zum Abschluss des Versuchs verglichen. An den mit *S. plymuthica* bzw. *P. chlororaphis* Rif<sup>r</sup> behandelten Varianten wurde eine signifikant geringere Befallsnote (5,3 bzw. 5,7) gegenüber der Kontrolle verzeichnet, aber kein signifikanter Unterschied zu den anderen Varianten (Abb.24).

Um den Zeitfaktor in die Auswertung einzubeziehen, wurde der Nachweis der Befallsreduktion durch Vergleich der Integrale des Befallsverlaufs ermittelt (Abb. 25). Eine signifikante Reduzierung der Befallssymptome wurde bei Anwendung von *S. plymuthica* um 26 % und bei *P. chlororaphis* um 18% dokumentiert (Abb. 25).



**Abb. 24:** Befallsindex von *V. dahliae* an Winterraps im Gewächshausversuch neun Wochen nach Priming-Behandlung des Saatguts mit verschiedenen Antagonisten. K.v.d = inokulierte, unbehandelte Kontrolle, S.p: *Serratia plymuthica*, B.s: *Bacillus subtilis*, Pa.p: *Paenibacillus polymyxa*, P.c: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f: *Pseudomonas fluorescens*, G.c: *Gliocladium catenulatum*; Mittelwerte aus zwei Versuchen und Standardabweichung. Ergebnisse (Säulen) der Boniturnote mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 15$  Pflanzen pro Variante).

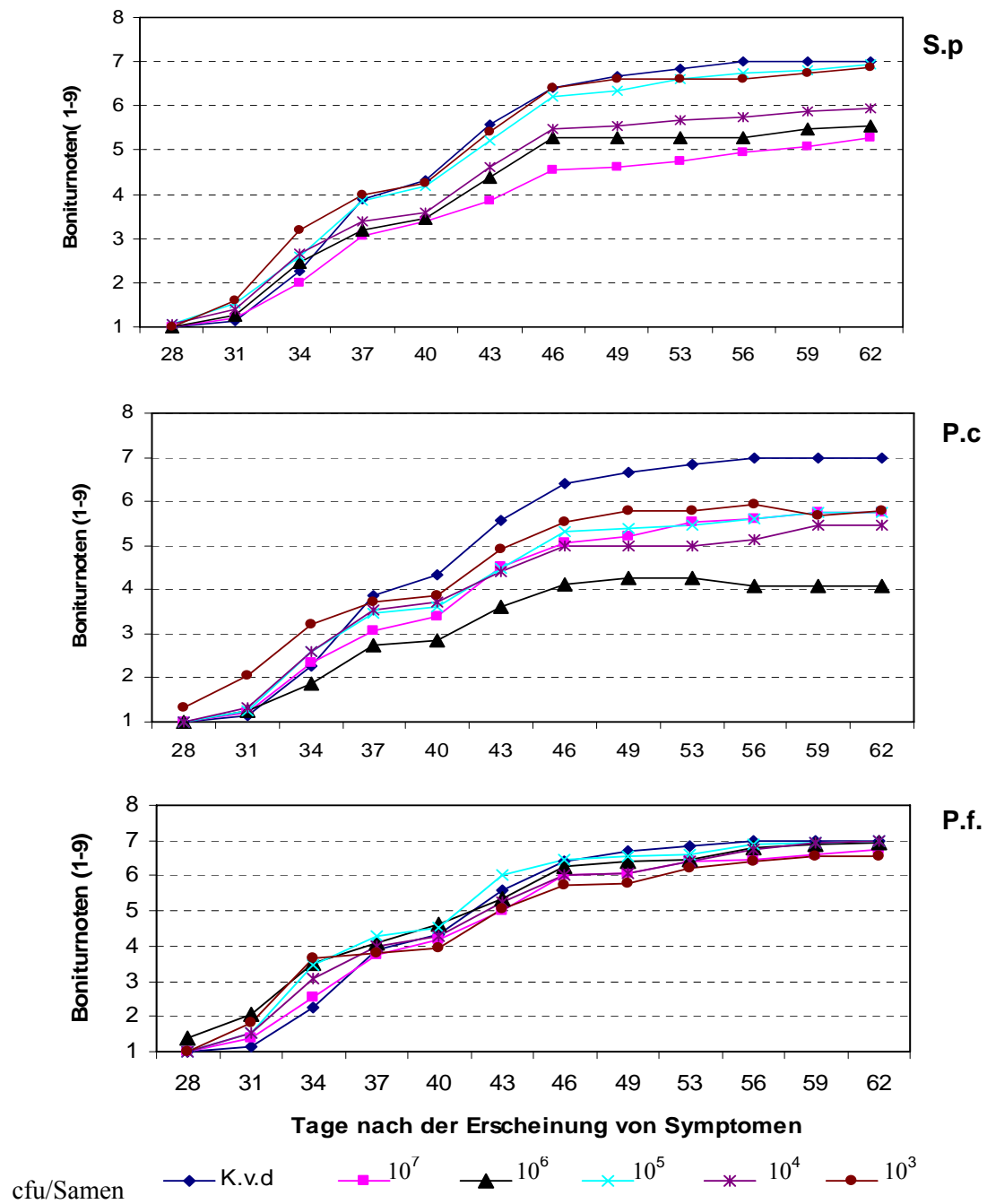


**Abb. 25:** Befallsintegral der einzelnen Varianten im Vergleich zur unbehandelten, mit *V. dahliae* infizierten Kontrolle (= 100 %). K.v.d = inokulierte, unbehandelte Kontrolle, S.p: *Serratia plymuthica*, B.s: *Bacillus subtilis*, P.p: *Paenibacillus polymyxa*, P.c: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f: *Pseudomonas fluorescens*, G.c: *Gliocladium catenulatum*; Mittelwerte aus zwei Versuchen und Standardabweichung, Ergebnisse (Säulen) mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 15$  Pflanzen pro Variante).

### 3.5.2 Einfluss der Inokulumsdichte auf den Befall mit *V. dahliae*

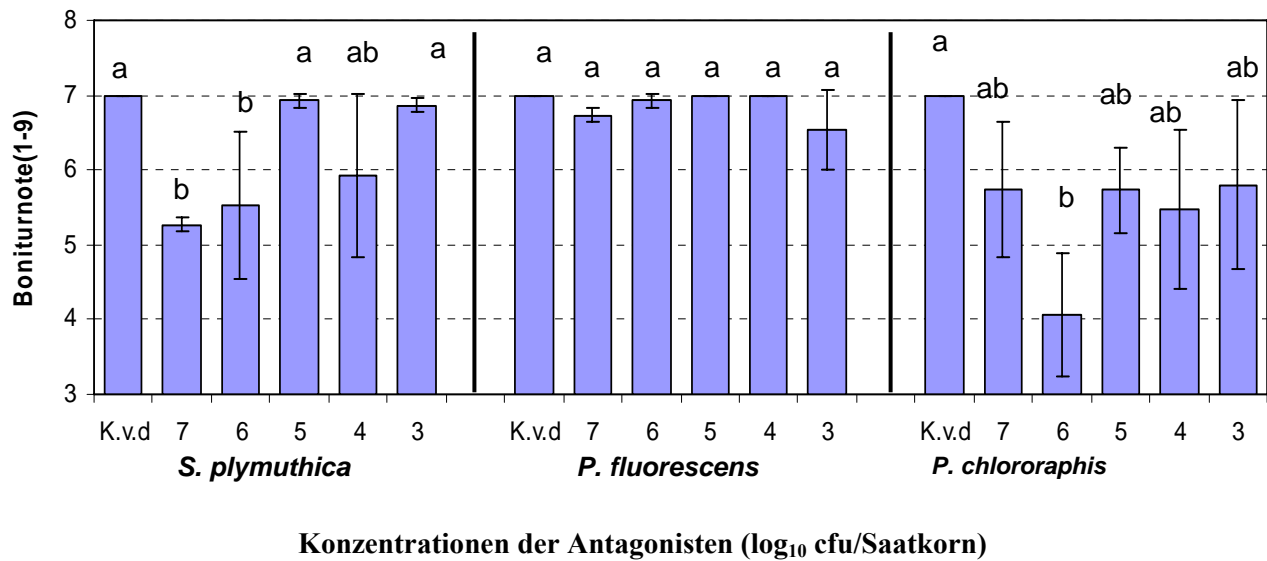
Auch gegen *V. dahliae* sollte diejenige Dosis Bakterien ermittelt werden, bei der noch ein signifikanter Effekt nachweisbar ist. Dazu wurden die Bakterienzellzahl von  $10^7$  bis  $10^3$  cfu/Samen in einem Gewächshausversuch nach sonst gleichen Versuchsbedingungen geprüft. Allerdings wurde auf die Anwendung der im vorangegangenen Versuch weniger wirksamen Antagonisten verzichtet und nur *S. plymuthica*, *P. chlororaphis* und *P. fluorescens* geprüft. Erste Befallssymptome wurden bei der mit *P. fluorescens* behandelten Variante ca. 4 Wochen nach der Aussaat festgestellt. Kurz darauf zeigten sich bei allen Varianten an vereinzelt Pflanzen erste Befallssymptome. Der Befallsverlauf ist in der Abb. 26 dargestellt. Mit *P. fluorescens* wurde selbst bei höchster Dichte der Antagonisten auf dem Saatkorn keine Wirkung erzielt. Mit *S. plymuthica* war die Wirkung bei  $10^7$  am höchsten und nahm dann mit abnehmender Bakteriendichte ab. Die Ausprägung der Befallssymptome hervorgerufen durch die Anwendung von *P. chlororaphis* war bei Anwendung von  $10^6$  cfu/Samen am höchsten. Alle anderen getesteten Bakteriendichten erzielten eine geringere Befallsausprägung gegenüber der Kontrolle, wiesen aber keine wesentlichen Unterschiede auf.

Auch diese Ergebnisse wurden zum Zeitpunkt der letzten Bonitur miteinander verglichen, ebenso wie die Befallsintegrale verglichen wurden. Beide Auswertungswege bestätigten die über den Verlauf der Infektion dokumentierten Beobachtungen (Abb. 27 und 28). Eine signifikante Reduktion der Befallssymptome wurde nur bei den Versuchsvarianten *S. plymuthica* von 26,6 % mit  $10^7$  bzw. bei *P. chlororaphis* von 35,2 % bei  $10^6$  cfu/Samen festgestellt (Abb.28), wobei in beiden Fällen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle vorlag. Auffällig ist, dass der Antagonist *P. chlororaphis* in der niedrigeren Konzentration von  $10^6$  besser wirkte als bei der höheren Konzentration. Die Reduktion erscheint zunächst gering, muss aber unter dem Gesichtspunkt der künstlichen Infektion des Bodens mit einer sehr hohen Dichte mit Mikrosklerotien des Krankheitserregers bewertet werden.

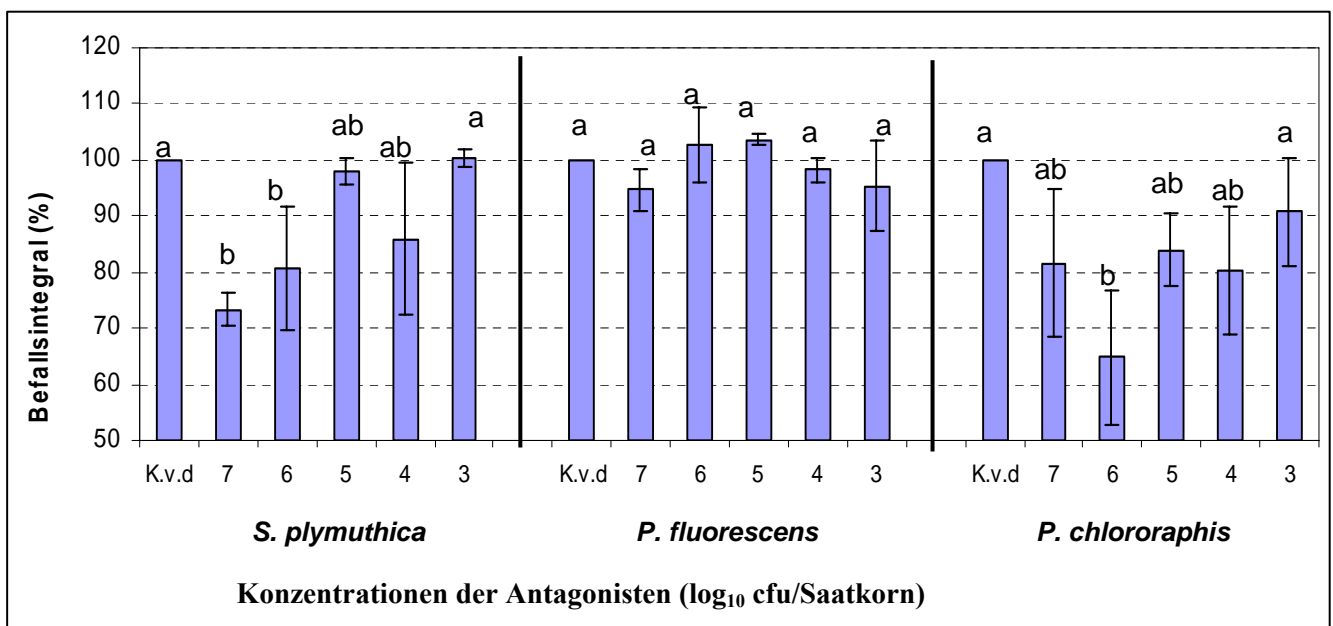


**Abb. 26:** Befallsverlauf (Boniturnoten 1-9) von *V. dahliae* an Raps 9 Wochen nach Aussaat. Mittelwerte aus zwei Versuchen mit je 15 Pflanzen pro Variante. Kontrolle. K.v.d = inokulierte, unbehandelte Kontrolle, S.p: *Serratia plymuthica*, P.c: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f: *Pseudomonas fluorescens*





**Abb. 27:** Befallsindex von *V. dahliae* an Winterraps im Gewächshausversuch neun Wochen nach Priming-Behandlung des Saatguts mit unterschiedlicher Dichte der verschiedenen Antagonisten. K.v.d = inokulierte, unbehandelte Kontrolle. Mittelwerte aus zwei Versuchen und Standardabweichung. Ergebnisse (Säulen) der Boniturnote mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 15$  Pflanzen pro Variante).



**Abb. 28:** Befallsintegrals der einzelnen Varianten im Vergleich zur unbehandelten, mit *V. dahliae* infizierten Kontrolle (= 100 %). K.v.d = inokulierte, unbehandelte Kontrolle 9 Wochen nach Primingbehandlung des Saatguts mit unterschiedlichen Dichten (cfu/Saatkorn) der Antagonisten an Winterraps im Gewächshausversuch. Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei Versuchen, Ergebnisse (Säulen) der Befallsintegral (%) mit verschiedenen Buchstaben innerhalb einer Variante sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 15$  Pflanzen pro Variante).

### 3.6 Spross- und Wurzelbesiedlung durch die Antagonisten

#### 3.6.1 Besiedlung von Rapskeimlingen durch Antagonisten

Die Besiedlung der Pflanze durch die Antagonisten wird als Voraussetzung für eine effektive Bekämpfung des Zielpathogens angesehen. Für diese Besiedlungsstudien wurden die mit Antagonisten behandelten Rapssamen in sterilem Sand mit Bodenextrakt als Nahrungsquelle in einer Plastikschiene ausgesät. Nach dem Aufgang der Pflanzen, ca. 5 Tage später, wurden die Keimlinge unter sterilen Bedingungen auf Rifampicin-Nähragarplatten ausgelegt. In Abb.29 ist das Wachstum des Antagonisten auf und um den Rapskeimlingen deutlich zu erkennen.



**Abb. 29:** Besiedlung der Rapskeimlinge durch Antagonisten.

Die Keimlinge wurden durch alle Antagonisten von der Wurzel bis zu den Keimblättern fast lückenlos besiedelt (Abb. 29 und Anhang 1).

Durch die Applikation des Rifampicin-resistenten Antagonisten ist eine Reisolierung auf rifampicin-haltigem Selektivmedium möglich (2.6.5). Durch diese Methode werden Aussagen über die Etablierung der Antagonisten in der Rhizosphäre und der Sprossregion möglich. Für *G. catenulatum* wurde die Lebendsporenzahl auf antibiotika-haltigen Malzextrakt-Agar als Selektivmedium ermittelt. Für alle Varianten wurde vor der Aussaat die Lebendkeimzahl pro

Samen (cfu/Samen) bestimmt. Sie lag bei  $3,9 \times 10^7$  für *S. plymuthica*,  $2,0 \times 10^6$  für *B. subtilis*,  $1,2 \times 10^6$  für *Pa. polymyxa*,  $1,6 \times 10^7$  für die beiden *Pseudomonas* spp. und  $1 \times 10^6$  für *G. catenulatum*. Die Versuche wurden im Klimaschrank und Gewächshaus in Boden mit und ohne *V. dahliae* im Boden durchgeführt. Testpflanzen wurden am 8. und 30. Tag nach Aussaat entnommen, in den oberirdischen Sprosstteil und den unterirdischen Wurzelteil geteilt und die gesamte Lebendzellzahl und die der rifamicin-resistenten Mutanten auf den Pflanzenteilen bestimmt. Die Ergebnisse für die Besiedlung der Rhizosphäre sind in der Tab. 13 (Klimaschrank) und in Tab. 14 (Gewächshaus) dargestellt. In Tab. 15 (Klimaschrank) und 16 (Gewächshaus) sind die Ergebnisse für die Besiedlung der Sprossachse wiedergegeben.

**Tab. 13:** Logarithmisch dargestellte Lebendzellzahlen (cfu/g Wurzelfrischgewicht) von Rifampicin-resistenten Antagonisten und anderen Bakterien sowie von dem Pilz *Gliocladium catenulatum* in der Rhizosphäre von Raps mit und ohne die Anwesenheit des Pflanzenpathogens *V. dahliae*. Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 Pflanzen im Verlauf des Pflanzenwachstums nach Priming-Behandlung des Saatgutes und Aussaat im Klimaschrank. S.p.: *Serratia plymuthica*, B.s.: *Bacillus subtilis*, P.p.: *Paenibacillus polymyxa*, P.c.: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f.: *Pseudomonas fluorescens*.

Antagonisten	cfu/g Wurzelfrischgewicht			
	Ohne <i>V. dahliae</i>		Mit <i>V. dahliae</i>	
	Mutanten	Gesamt	Mutanten	Gesamt
8 Tage nach Aussaat				
Kontrolle	-	$3 \times 10^7$	-	$8,6 \times 10^7$
<i>S. plymuthica</i>	$6 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$
<i>B. subtilis</i>	$1,8 \times 10^7$	$1 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$
<i>Pa. polymyxa</i>	$1,5 \times 10^5$	$8 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$5 \times 10^7$
<i>P. chlororaphis</i>	$5,3 \times 10^7$	$6 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$
<i>P. fluorescens</i>	$1 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$5,5 \times 10^7$	$8,3 \times 10^7$
<i>G. catenulatum</i>	$3 \times 10^6$	-	$2 \times 10^5$	-
30 Tage nach Aussaat				
Kontrolle	-	$2,2 \times 10^8$	-	$1,4 \times 10^8$
<i>S. plymuthica</i>	$2,2 \times 10^6$	$7,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	$6,6 \times 10^7$
<i>B. subtilis</i>	$5,6 \times 10^3$	$1 \times 10^8$	$5,6 \times 10^3$	$8 \times 10^8$
<i>Pa. polymyxa</i>	$1 \times 10^4$	$2 \times 10^8$	$7,6 \times 10^4$	$6 \times 10^8$
<i>P. chlororaphis</i>	$3,5 \times 10^7$	$4,8 \times 10^8$	$9 \times 10^5$	$1,5 \times 10^8$
<i>P. fluorescens</i>	$1,3 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	$2,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^8$
<i>G. catenulatum</i>	$7 \times 10^4$	-	$9 \times 10^4$	-

Ein Vergleich der Populationsdichte der Antagonisten im Wurzelbereich zeigt, dass die Gram-negativen Isolate *S. plymuthica*, *P. chlororaphis* bzw. *P. fluorescens* besonders über den Verlauf des Pflanzenwachstums in höheren Dichten auftreten als die Gram-positiven

Isolate *B. subtilis* und *P. polymyxa*. Gram-positiven Bakterien können aufgrund der Bildung von Sporen länger überleben und sind damit auch gegen Umwelteinflüsse resistent. Wichtig scheint jedoch eher die so genannte Rhizosphärenkompetenz zu sein, nämlich die Fähigkeit bestimmter Isolate, sich im Wurzelraum anzusiedeln und mit dem Wachstum der Wurzel auch den Zuwachs zu besiedeln, also mit der Pflanze mitzuwachsen. Dafür ist Zellteilung notwendig und nicht eine Überdauerung als Spore. Auffällig ist auch, dass nach 8 Tagen im Klimaschrank alle Antagonisten in hoher Population nachgewiesen wurden, während die Population im Gewächshaus schon eher zurückging. Ein Unterschied der Besiedlung in Boden mit oder ohne *V. dahliae* ist dagegen nicht zu verzeichnen. Auffällig war weiterhin, dass die autochthone Bakterienpopulation durch die Anwesenheit der Antagonisten nicht abnahm bzw. in einigen Fällen im Laufe des Wachstums noch zunahm.

**Tab. 14:** Logarithmisch dargestellte Lebendzellzahlen (cfu/g Wurzelfrischgewicht) von Rifampicin-resistenten Antagonisten und anderen Bakterien sowie von dem Pilz *Gliocladium catenulatum* in der Rhizosphäre von Raps mit und ohne die Anwesenheit des Pflanzenpathogens *V. dahliae*. Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 Pflanzen im Verlauf des Pflanzenwachstums nach Priming-Behandlung des Saatgutes und Aussaat im Gewächshaus. S.p.: *Serratia plymuthica*, B.s.: *Bacillus subtilis*, P.p.: *Paenibacillus polymyxa*, P.c.: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f.: *Pseudomonas fluorescens*.

Antagonisten	cfu/g Wurzelgewicht			
	Ohne <i>V. dahliae</i>		Mit <i>V. dahliae</i>	
8 Tage nach Aussaat	Mutanten	Gesamt	Mutanten	Gesamt
Kontrolle	-	1,5x10 <sup>8</sup>	-	2,6x10 <sup>8</sup>
<i>S. plymuthica</i>	2,8x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>8</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>	1,8x10 <sup>7</sup>
<i>B.subtilis</i>	1,5x10 <sup>4</sup>	8x10 <sup>7</sup>	9,3x10 <sup>4</sup>	5,5x10 <sup>7</sup>
<i>Pa. polymyxa</i>	2,9x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>7</sup>	9,3x10 <sup>4</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>
<i>P. chlororaphis</i>	1,8x10 <sup>7</sup>	9,6x10 <sup>7</sup>	9,6x10 <sup>7</sup>	3,3x10 <sup>8</sup>
<i>P. fluorescens</i>	1,7x10 <sup>7</sup>	5,8x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>8</sup>	3,4x10 <sup>8</sup>
<i>G. catenulatum</i>	1,3x10 <sup>5</sup>	-	2x10 <sup>4</sup>	-
30 Tage nach Aussaat	Mutanten	Gesamt	Mutanten	Gesamt
Kontrolle	-	1,6x10 <sup>8</sup>	-	1,8x10 <sup>8</sup>
<i>S. plymuthica</i>	3,4x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>8</sup>	3,3x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>8</sup>
<i>B.subtilis</i>	1,3x10 <sup>4</sup>	2,4x10 <sup>8</sup>	5x10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>8</sup>
<i>Pa. polymyxa</i>	1x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>8</sup>	5,5x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>8</sup>
<i>P. chlororaphis</i>	1x10 <sup>6</sup>	4,2x10 <sup>8</sup>	2,5x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>8</sup>
<i>P. fluorescens</i>	5,8x10 <sup>5</sup>	2,4x10 <sup>8</sup>	2,4x10 <sup>6</sup>	1,4x10 <sup>8</sup>
<i>G. catenulatum</i>	-	1,1x10 <sup>5</sup>	2,8x10 <sup>5</sup>	-

Das Pilz-Isolat *G. catenulatum* konnte sich über den gesamten Versuchszeitraum in etwa gleich bleibender Dichte in der Rhizosphäre halten und erreichte eine cfu/g Wurzelfrischmasse von durchschnittlich  $1,3 \times 10^5$  an Pflanzen, die mit *V. dahliae* infiziert waren und von  $2,8 \times 10^5$  cfu/g an Pflanzen, die nicht mit *V. dahliae* infiziert waren.

**Tab. 15:** Logarithmisch dargestellte Lebendzellzahlen (cfu/g Sprossfrischgewicht) von Rifampicin-resistenten Antagonisten und anderen Bakterien sowie von dem Pilz *Gliocladium catenulatum* in der Rhizosphäre von Raps mit und ohne die Anwesenheit des Pflanzenpathogens *V. dahliae*. Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 Pflanzen im Verlauf des Pflanzenwachstums nach Priming-Behandlung des Saatgutes und Aussaat im Klimaschrank . S.p.: *Serratia plymuthica*, B.s.: *Bacillus subtilis*, P.p.: *Paenibacillus polymyxa*, P.c.: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f.: *Pseudomonas fluorescens*.

Antagonisten	cfu/g Sprossfrischgewicht			
	Ohne <i>V. dahliae</i>		Mit <i>V. dahliae</i>	
8 Tage nach Aussaat	Mutanten	Gesamt	Mutanten	Gesamt
Kontrolle		$6,38 \times 10^5$	-	$7,28 \times 10^5$
<i>S. plymuthica</i>	$2,29 \times 10^5$	$4,66 \times 10^6$	$2,58 \times 10^5$	$5,26 \times 10^6$
<i>B. subtilis</i>	$6,45 \times 10^2$	$8,87 \times 10^5$	$7,69 \times 10^2$	$1,06 \times 10^6$
<i>Pa. polymyxa</i>	$8,03 \times 10^3$	$6,21 \times 10^5$	$9,46 \times 10^3$	$7,42 \times 10^5$
<i>P. chlororaphis</i>	$4,33 \times 10^7$	$6,71 \times 10^7$	$5,82 \times 10^7$	$9,02 \times 10^7$
<i>P. fluorescens</i>	$3,13 \times 10^6$	$3,22 \times 10^7$	$3,68 \times 10^6$	$3,89 \times 10^6$
<i>G. catenulatum</i>	-	-	-	-
30 Tage nach Aussaat	Mutanten	Gesamt	Mutanten	Gesamt
Kontrolle		$2,52 \times 10^3$		$1,48 \times 10^3$
<i>S. plymuthica</i>	$1,74 \times 10^3$	$4,07 \times 10^3$	$1,47 \times 10^3$	$2,45 \times 10^3$
<i>B. subtilis</i>	0	$8,62 \times 10^2$	0	$1,01 \times 10^3$
<i>Pa. polymyxa</i>	$3,35 \times 10^3$	$1,06 \times 10^4$	$1,45 \times 10^3$	$1,72 \times 10^3$
<i>P. chlororaphis</i>	$3 \times 10^7$	$3,33 \times 10^7$	$6,22 \times 10^3$	$1,28 \times 10^4$
<i>P. fluorescens</i>	$1,94 \times 10^7$	$2,34 \times 10^7$	$1,92 \times 10^3$	$2,47 \times 10^3$
<i>G. catenulatum</i>	-	-		-

An Sprossteilen wurde der Pilz nicht nachgewiesen (Tab. 15 und 16). Die Population von *B. subtilis* war nach 30 Tagen nicht mehr im Spross nachzuweisen. Gleiches gilt für *S. plymuthica* unter Gewächshausbedingungen. Die Populationsdichte am 8. Tag unterscheidet sich nicht wesentlich im Klimaschrank oder Gewächshaus oder in Erde mit oder ohne das Pflanzenpathogen. Unterschiede sind erst nach 30 Tagen sichtbar. Die Anwesenheit von *Pseudomonas* spp. im Spross kann bedeuten, dass diese Organismen endophytische Eigenschaften besitzen. Die Tatsache, dass *S. plymuthica* unter Gewächshausbedingungen zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachzuweisen ist, deutet darauf hin, dass diese Bakterien der

höheren Strahlung wahrscheinlich nicht gewaschen sind und ihnen endophytische Eigenschaften fehlen. Einziger Unterschied zwischen Varianten mit und ohne Pflanzenpathogen wurde im Klimaschrank für die Pseudomonaden nachgewiesen, die in vierfach höherer Potenz im Spross nachzuweisen waren sofern kein Pathogen inokuliert wurde.

**Tab. 16:** Logarithmisch dargestellte Lebendzellzahlen (cfu/g Sprossfrischgewicht) von Rifampicin-resistenten Antagonisten und anderen Bakterien sowie von dem Pilz *Gliocladium catenulatum* in der Rhizosphäre von Raps mit und ohne die Anwesenheit des Pflanzenpathogens *V. dahliae*. Mittelwerte und Standardabweichung aus 5 Pflanzen im Verlauf des Pflanzenwachstums nach Priming-Behandlung des Saatgutes und Aussaat im Gewächshaus. S.p.: *Serratia plymuthica*, B.s.: *Bacillus subtilis*, P.p.: *Paenibacillus polymyxa*, P.c.: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f.: *Pseudomonas fluorescens*.

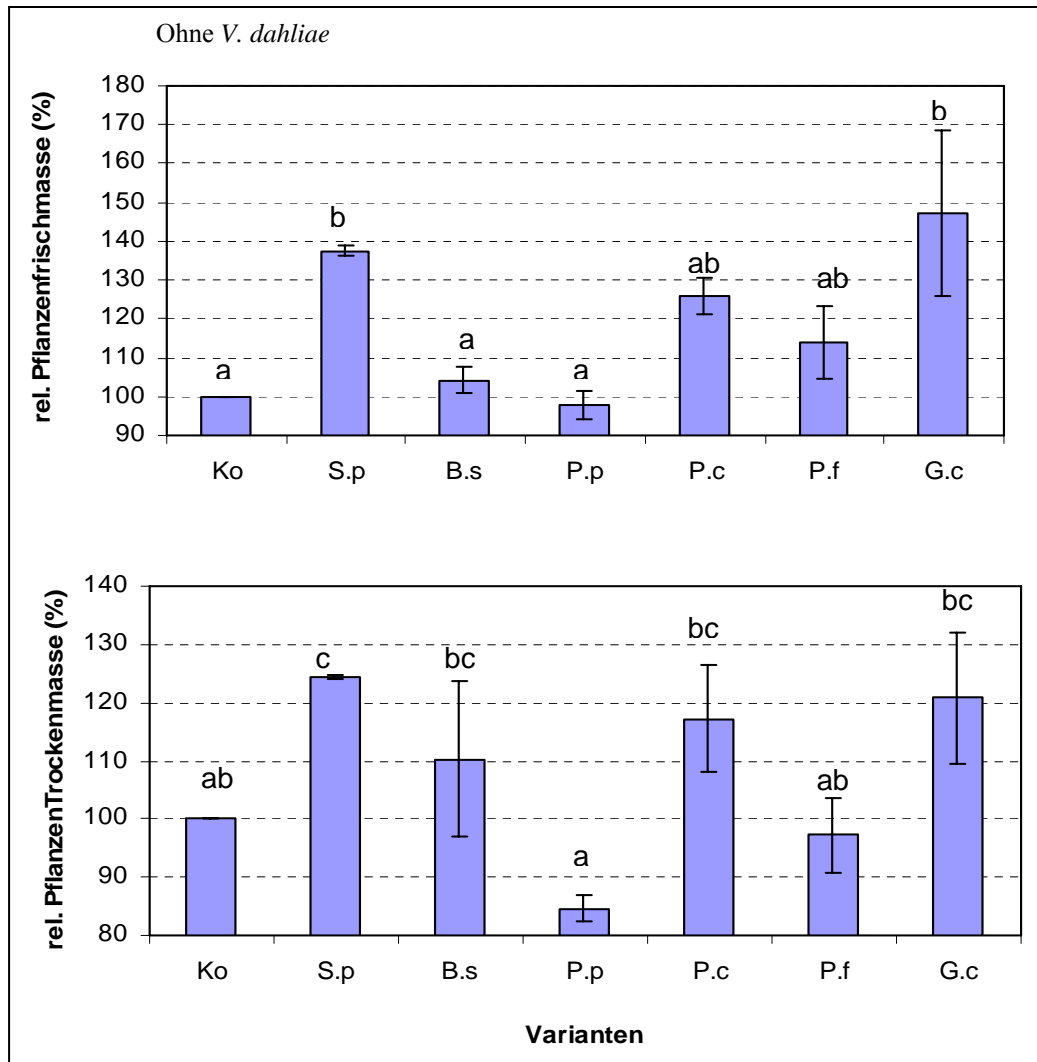
Antagonisten	cfu/g Sprossfrischgewicht			
	Ohne <i>V. dahliae</i>		Mit <i>V. dahliae</i>	
8 Tage nach Aussaat	Mutanten	Gesamt	Mutanten	Gesamt
Kontrolle	-	5,39x10 <sup>5</sup>	-	7,3x10 <sup>5</sup>
S. plymuthica	2x10 <sup>5</sup>	4,03x10 <sup>6</sup>	2,56x10 <sup>5</sup>	5,46x10 <sup>6</sup>
B.subtilis	5,56x10 <sup>2</sup>	7,64x10 <sup>5</sup>	7,67x10 <sup>2</sup>	1,16x10 <sup>6</sup>
P.p.	6,97x10 <sup>3</sup>	5,39x10 <sup>5</sup>	9,43x10 <sup>3</sup>	7,30x10 <sup>5</sup>
P.c.	4,30x10 <sup>7</sup>	6,70x10 <sup>7</sup>	5,80x10 <sup>7</sup>	9,x10 <sup>7</sup>
P.f.	2,84x10 <sup>6</sup>	2,92x10 <sup>7</sup>	3,66x10 <sup>6</sup>	3,86x10 <sup>6</sup>
G.c.	-	-	-	-
30 Tage nach Aussaat	Mutanten	Gesamt	Mutanten	Gesamt
Ko	-	2,78x10 <sup>4</sup>	-	1,27x10 <sup>4</sup>
S.p.	0	8,65x10 <sup>4</sup>	0	3,48x10 <sup>6</sup>
B.s.	0	1,54x10 <sup>5</sup>	0	3,31x10 <sup>4</sup>
Pa.p.	1,12x10 <sup>2</sup>	4,73x10 <sup>4</sup>	2,6x10 <sup>3</sup>	1,21x10 <sup>4</sup>
P.c.	6,22x10 <sup>4</sup>	1,75x10 <sup>7</sup>	6,57x10 <sup>4</sup>	1,84x10 <sup>5</sup>
P.f.	4,27x10 <sup>3</sup>	3,26x10 <sup>4</sup>	5,47x10 <sup>3</sup>	8,91x10 <sup>4</sup>
G.c.	-	-	-	-

### 3.7 Auswirkung der Antagonisten auf das Pflanzenwachstum

#### 3.7.1 Einfluss der Antagonisten auf das Frisch- und Trockengewicht

In den Gewächshausversuchen wurde der Einfluss auf das Pflanzenwachstum beobachtet. Die Zunahme der Frisch- und Trockenmasse wurde für die Priming-Behandlung des Saatgutes

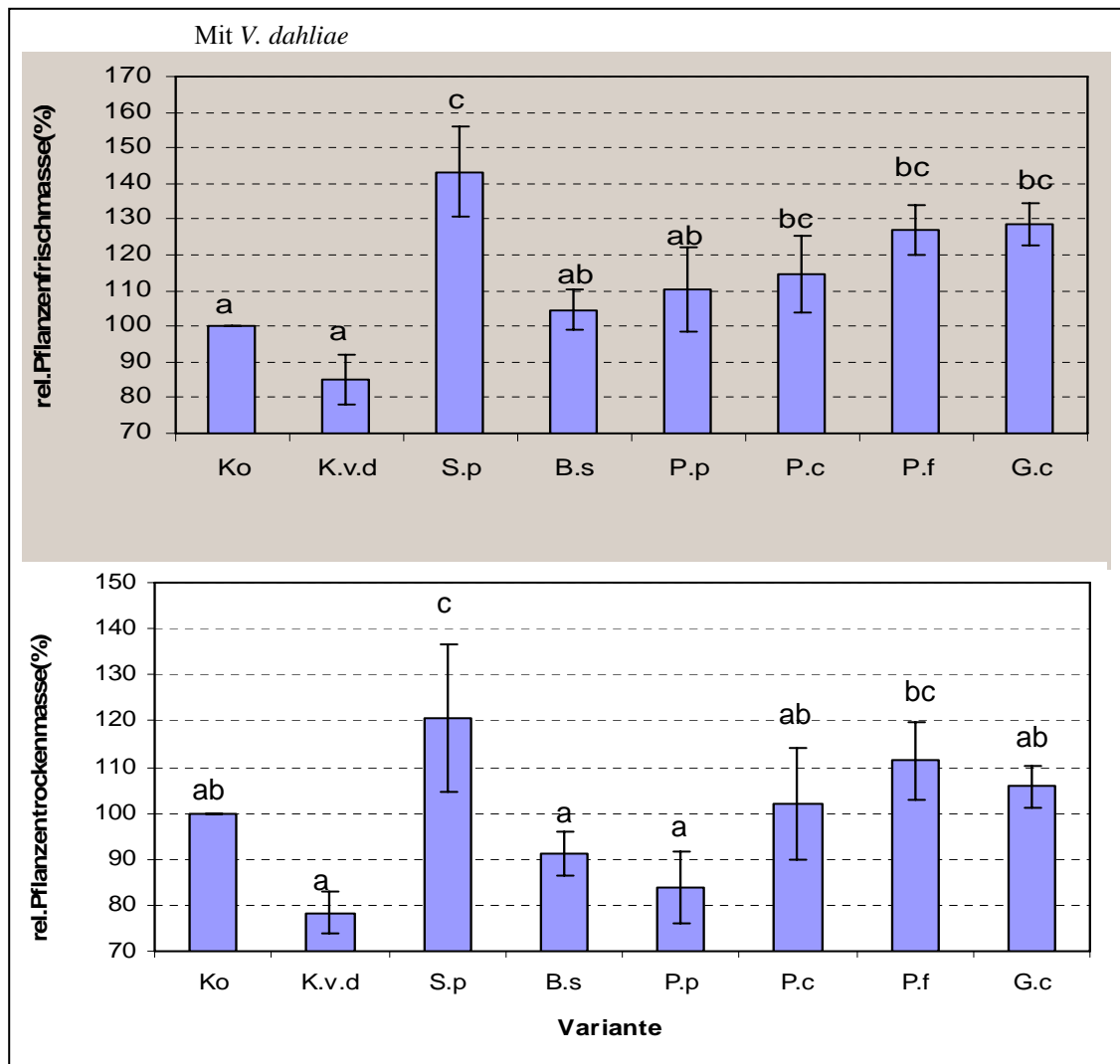
(Bakterienisolate) und Saatgutinkrustierung (*G. catenulatum*) ermittelt. Nach 9 Wochen wurden die Pflanzen geerntet. Um den Einfluss eines Raps pathogens zu ermitteln, wurden ein Teil der Versuche mit vorheriger Behandlung des Bodens mit *V. dahliae* durchgeführt.



**Abb.30:** Relative Pflanzenfrisch- und Pflanzentrockenmasse der Rapsorte „Talent“ im Gewächshausversuch neuen Wochen nach Versuchbeginn in den nicht inokulierten, unbehandelten Kontrollen (Ko) oder nach Behandlung des Saatgutes mit Antagonisten S.p: *Serratia plymuthica*, B.s: *Bacillus subtilis*, P.p: *Paenibacillus polymyxa*, P.c: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f: *Pseudomonas fluorescens*, G.c: *Gliocladium catenulatum*. Ergebnisse (Säulen) mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 15$  Pflanzen pro Variante).

Die Ergebnisse sind in Abb. 31 mit und Abb. 30 ohne vorherige Inokulation des Bodens mit *V. dahliae* dargestellt. *S. plymuthica* erwies sich als am wirkungsvollsten unter den Antagonisten. Die Pflanzenfrischmasse der mit *S. plymuthica*, *P. chlororaphis* und *G. catenulatum* behandelten Varianten nahm gegenüber der unbehandelten Kontrolle um 37,5 bzw. 25,7 und 47,5 % im Frischmassegewicht zu. Für die Trockenmasse wurde eine Zunahme von 24,3 bzw.

17,3 und 20,8 % ermittelt (Abb. 30). Die Behandlung mit *B. subtilis*, *P. polymyxa* und *P. fluorescens* ergab keine signifikante Zunahme der Frisch- bzw. Trockenmasse.



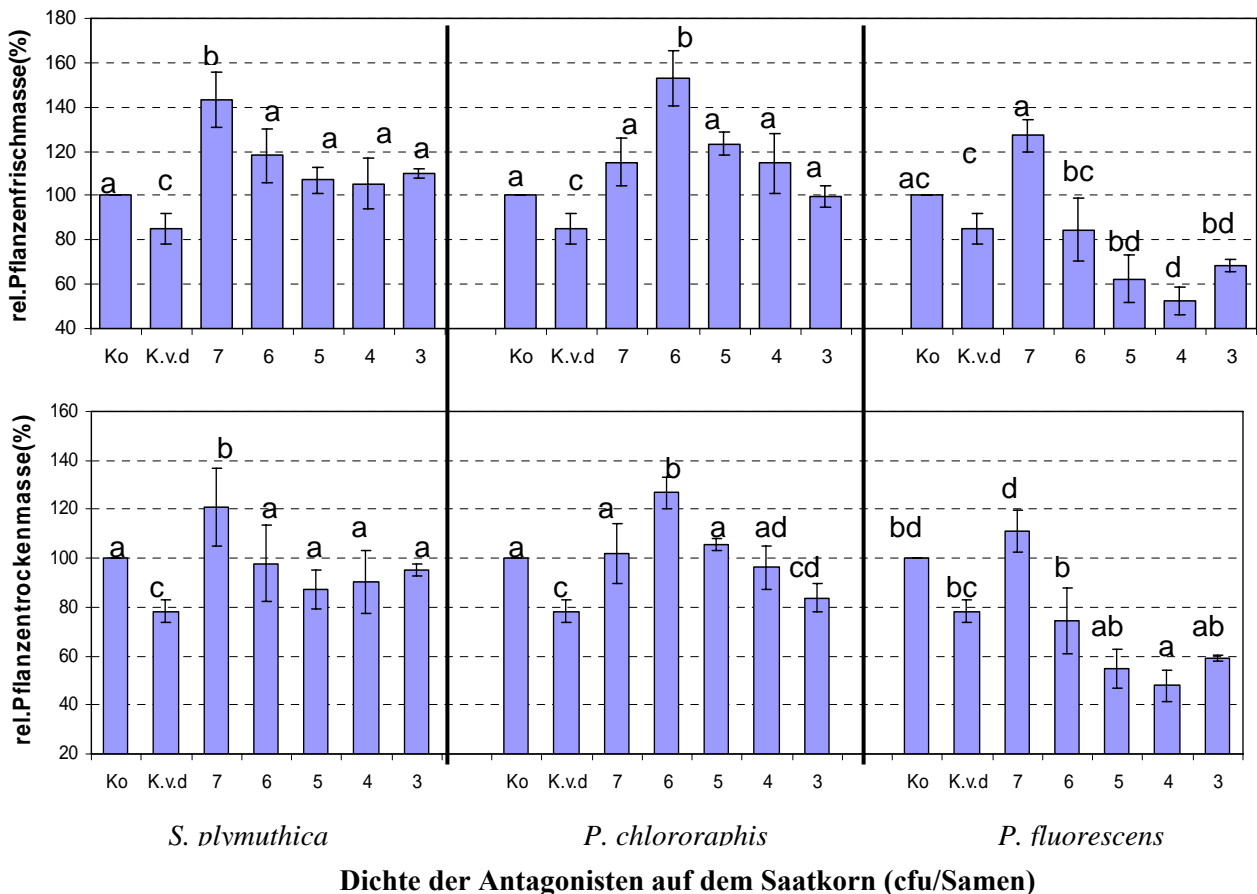
**Abb.31:** Relative Pflanzenfrisch- und Pflanzentrockenmasse der Rapssorte „Talent“ im Gewächshausversuch neuen Wochen nach Versuchbeginn in den nicht inokulierten, unbehandelten Kontrollen (Ko), den mit *Verticillium dahliae* inokulierten, unbehandelten Kontrollen (K.v.d.) oder nach Behandlung des Saatgutes mit Antagonisten S.p: *Serratia plymuthica*, B.s: *Bacillus subtilis*, P.p: *Paenibacillus polymyxa*, P.c: *Pseudomonas chlororaphis*, P.f: *Pseudomonas fluorescens*, G.c: *Gliocladium catenulatum*. Ergebnisse (Säulen) mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 15$  Pflanzen pro Variante).

Deutlicher wird der Effekt in Anwesenheit von *V. dahliae*, wobei wiederum eine signifikante Zunahme der mittleren Masse im Vergleich beiden Kontrollen bei den Varianten mit *S. plymuthica* verzeichnet wurde (Zunahme um 58,3 %). Dieser Effekt war in den mit *P. fluorescens* und *G. catenulatum* behandelten Varianten geringer um (42 und 43,7%) *B. subtilis*, *P. polymyxa* hatten keinen Einfluss auf die Trockenmasse.



### 3.7.2 Einfluss der Inokulumdichte auf das Pflanzenwachstum

Der Einfluss der Inokulumdichte wurde für mit *S. plymuthica*, *P. chlororaphis* und *P. fluorescens* ermittelt (Abb. 32). Während bei *S. plymuthica* und *P. fluorescens* nur bei der höchsten Konzentration statistisch signifikante Effekte verzeichnet wurden, war bei *P. chlororaphis* mit  $10^7$  wiederum eine geringere Wirkung zu verzeichnen als bei  $10^6$  cfu/Samen.



**Abb. 32:** Relative Pflanzenfrisch- und Pflanzentrockenmasse der Rapssorte „Talent“ im Gewächshausversuch 9 Wochen nach Versuchbeginn in den nicht inokulierten, unbehandelten Kontrollen (Ko), den mit *Verticillium dahliae* inokulierten, unbehandelten Kontrollen (K.v.d.) oder nach Behandlung des Saatgutes mit verschiedener Konzentrationen als  $\text{Log}_{10}$  cfu/Saatgut der Antagonisten Ergebnisse (Säulen) mit verschiedenen Buchstaben innerhalb einer Variante sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 15$  Pflanzen pro Variante).

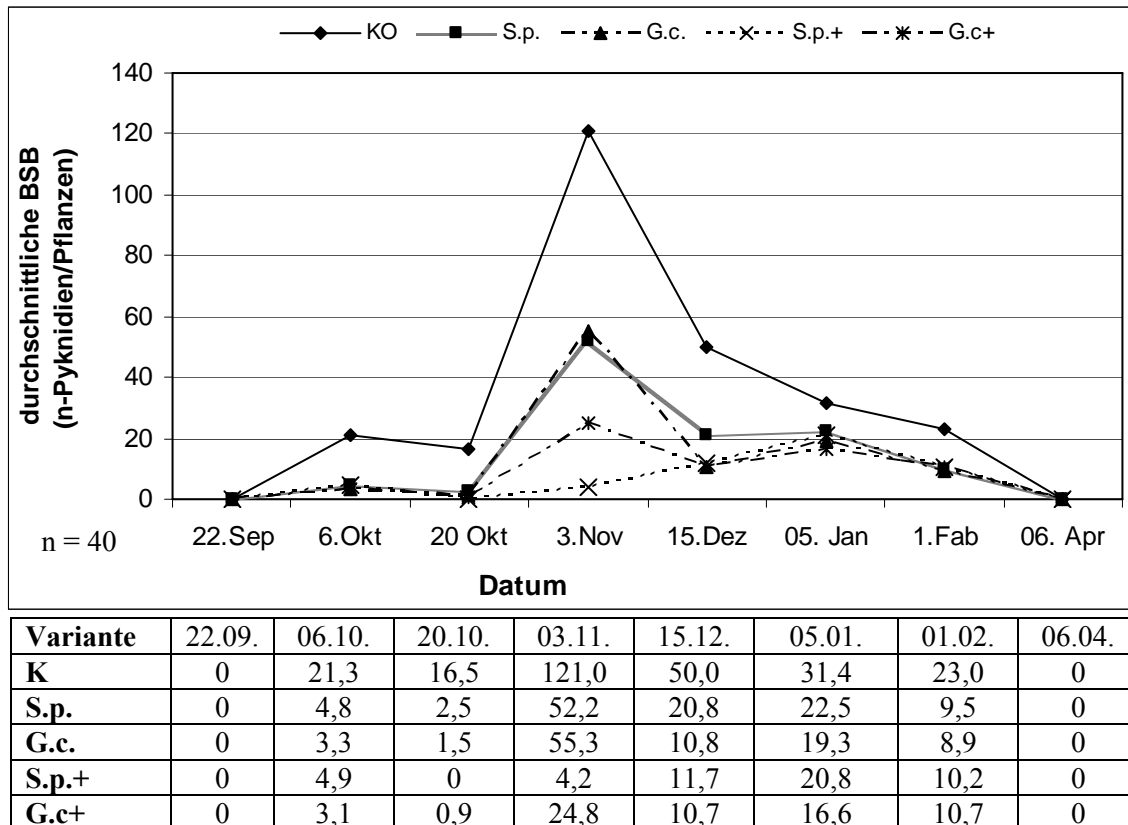
### 3.8 Prüfung von *Serratia plymuthica* und *Gliocladium catenulatum* im Feldversuch

#### 3.8.1 Witterungsverlauf

Neben acker- und pflanzenbaulichen Parametern nimmt die Witterung als übergeordneter Faktor bestimmenden Einfluss auf das Epidemiegesehen von Pflanzenkrankheiten. Im Anhang 2 werden Niederschlags- und Temperaturmittelwerte am Standort Hohenschulen im Untersuchungszeitraum 2005-2006 dargestellt. Das Versuchsjahr war in den Herbst- und Wintermonaten durch unterdurchschnittlich Niederschläge gekennzeichnet. In der weiteren Vegetationsperiode verlief die Niederschlagskurve im Frühjahr bis Juli, mit Ausnahme des Monats Mai, deutlich unter dem langjährigen Mittel. Der Winter war durch die längere Frostperioden während es Versuchszeitraums gekennzeichnet. Die Lufttemperaturen befanden sich während der Herbstentwicklung der Rapspflanzen im September und Oktober auf der Höhe der langjährigen Werte. Der März zeichneten sich durch Temperaturen unter dem langjährigen Mittel aus. In der weiteren Vegetationsperiode fiel eine vergleichbar erhöhter Temperaturverlauf auf.

#### 3.8.2 Wirkung gegen *P. lingam*

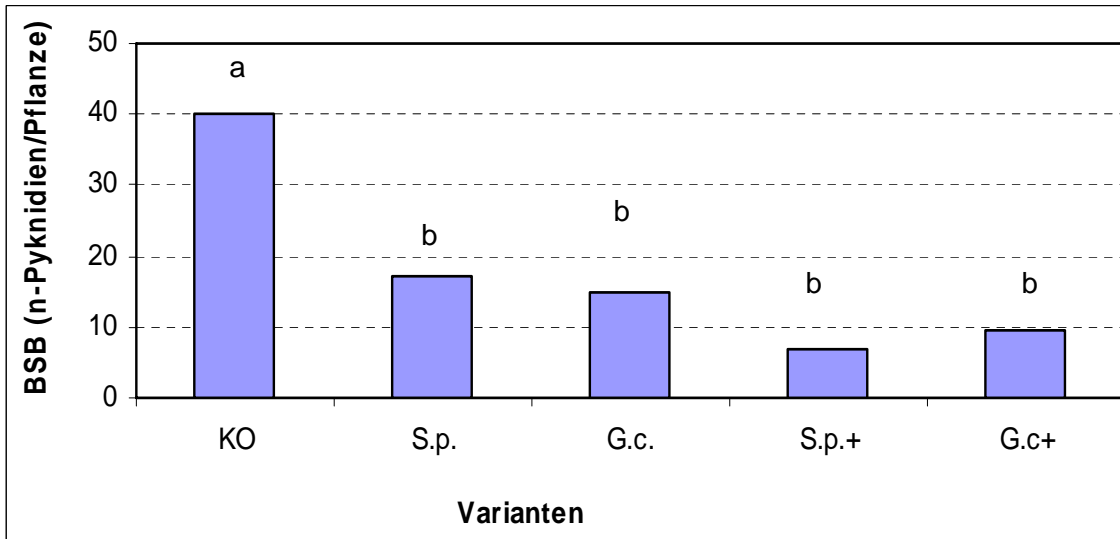
Im Feld wurde die Wirkung der Antagonisten *S. plymuthica* (Saatgutpriming) und *G. catenulatum* (Saatgutinkrustierung) ohne und mit einer zusätzlichen Applikation von Metconazol am 7. Oktober in jeweils 4 Wiederholungen im Parzellenversuch geprüft. Angaben über die ackerbaulichen Maßnahmen sind in Tab. 2 wiedergegeben. Zunächst wurde die Wirkung auf die *P. lingam* Befallsstärke und Befallshäufigkeit ermittelt. Die Fungizidbehandlung erfolgte nach Dokumentation der ersten Symptome am 6. Oktober. Schon zu diesem Zeitpunkt fiel auf, dass die mit Antagonisten behandelten Varianten in der Befallsstärke deutlich unter der unbehandelten Kontrolle lag, die Saatgutbehandlung mit Antagonisten also eine befallsreduzierende Auswirkungen nach sich zog. Die Bonitur der Blätter am 20.10. in der unbehandelten Kontrolle ergab durchschnittlich 21,3 Pyknidien je Pflanze, wohingegen das Befallsniveau in der antagonistischen behandelten Variante (S.p., G.c.) bei 2,5 bzw. 1,5 Pyknidien je Pflanze stagnierte. Die zusätzliche Fungizidbehandlung (Variante S.p.<sup>+</sup>, G.c.<sup>+</sup>) reduzierte den Befall auf 0 bzw. 0,9 Pyknidien je Pflanze. Am 3.11. wurde deutlich, dass die Fungizidapplikation den im Vergleich zur Kontrolle hohen *P. lingam* Befall gegenüber der reinen Antagonistenvariante noch mal reduzierte (Abb. 33). Der durchschnittliche Blattbefall in der Kontrolle betrug 121 Pyknidien/Pflanze und wurde auf 4,2 bzw. 24,9 reduziert.



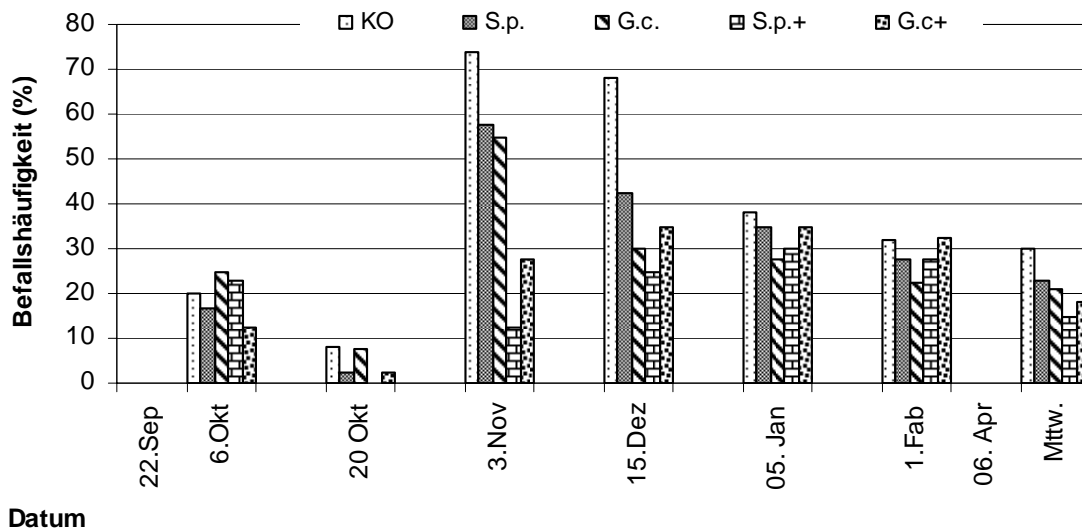
**Abb. 33:** Einfluss der Saatgutbehandlung mit *S. plymuthica* (S.p.) und *G. catenulatum* (G.c.) auf die Befallsstärke (BSB = n-Pyknidien) mit *Phoma lingam* auf den Blattorganen mit und ohne Metconazol Behandlung am Versuchsstandort Hohenschulen 2005/2006. Varianten: KO: unbehandelte Kontrolle, S.p.:  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen, G.c.:  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen, S.p.+ : S.p.+ Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha), G.c.+ : G.c.+ Caramba®. Metconazol wurde am 7. Oktober appliziert. n= 40 Pflanzen pro Variante.

Bis März ging der Blattbefall dann kontinuierlich zurück und im April wurde kein Blattbefall mehr registriert. In Abb. 34 wurde die mittlere Befallsstärke (BSB) über den Boniturzeitraum von 6.5 Monaten ermittelt. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen der unbehandelte Kontrolle und allen behandelten Variante ermittelt. Zwischen den Behandlungen wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt.

Die Befallshäufigkeit wurde ebenfalls ermittelt. Die Ergebnisse wurden in Abb. 35 zusammengefasst. Die gemittelte Befallshäufigkeit verdeutlicht, dass die Ausbreitung des Erregers *P. lingam* am Boniturtermin 03.11 und 15.12. in den Kontrollen mit 74 % bzw. 68 % wesentlich über den Behandlungen lagen, die bei Variante S.p.+ mit 12,5 % bzw. 25 % am niedrigsten ausfiel. In den Fungizidbehandlungen war die Befallshäufigkeit nur am 3.11. wesentlich reduziert gegenüber den anderen Behandlungen.

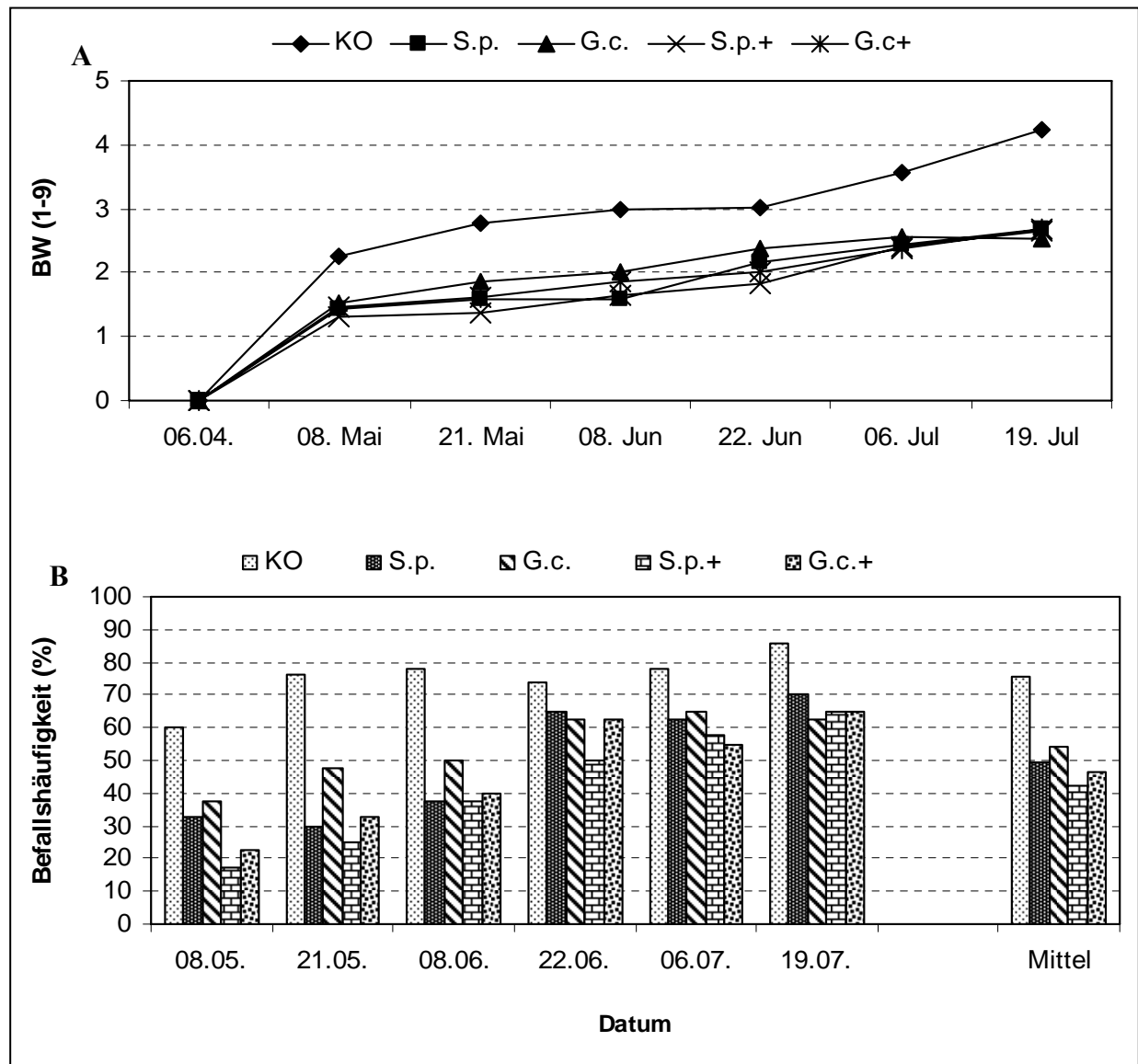


**Abb. 34:** Mittlere Befallsstärke (BSB = n-Pyknidien) mit *Phoma lingam* vom 22. September bis 6. April auf den Blattoorganen in der unbehandelten Kontrolle (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p.+ und G.c.+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober). Ergebnisse (Säulen) der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 40$  Pflanzen pro Variante).



**Abb. 35:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf die Befallshäufigkeit (BHB = prozentualer Anteil befallener Pflanzen) durch *P. lingam* auf den Blattoorganen in der unbehandelten Kontrolle (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p.+ und G.c.+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober). Ergebnisse (Säulen) der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 40$  Pflanzen pro Variante).

Im weiteren Verlauf der Vegetationsperiode wurden keine Unterschiede zwischen den Behandlungen und den Kontrollparzellen ermittelt. Ab April wurde dann der Wurzelhalsbefall bonitiert.



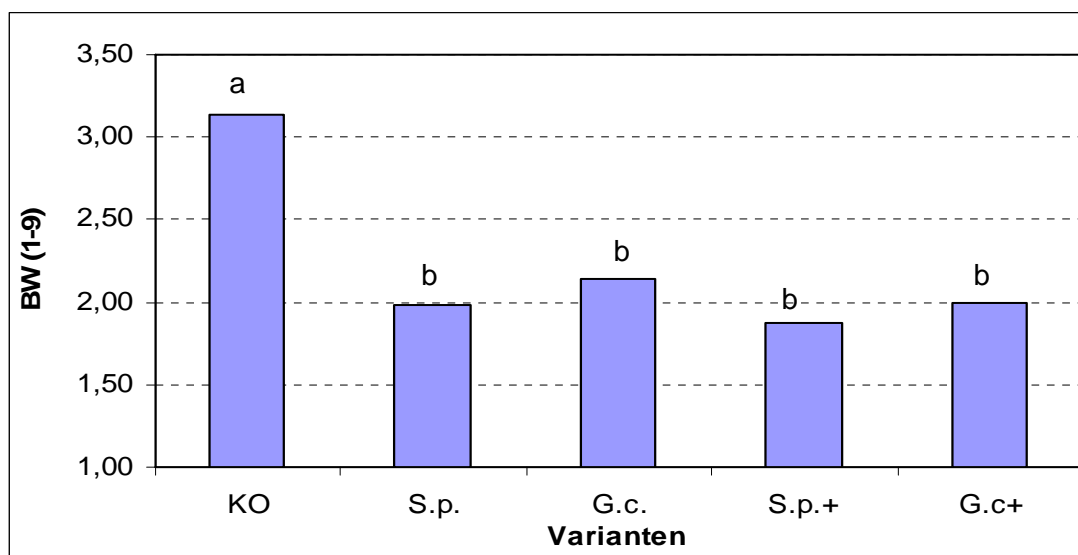
**Abb. 36:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf den Befallswert (BW = Skala 1-9) "A" und die Befallshäufigkeit (BHB = prozentualer Anteil befallener Pflanzen) "B" durch *P. lingam* am Wurzelhals in der unbehandelten Kontrolle (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p.+ und G.c.+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober).

In der Abb. 36 A ist der Befallswert und in Abb. 36 B die Befallshäufigkeit wiedergegeben. Über den weiteren Versuchzeitraum ermittelte maximale Boniturwerte von 4,24 (Skala 1-9) liegen im mittleren bis geringen Befallsniveau. In Tab. 17 sind die Befallswerte zusammengefasst. Erste Symptome am Wurzelhals wurden Anfang Mai erfasst. Der Befallswert in den Varianten S.p. und G.c. ohne Fungizidbehandlung und S.p.+ und G.c.+ mit

Fungizidbehandlung im Herbst unterscheidet sich nicht. Alle antagonistengebundenen Varianten setzten sich jedoch deutlich von der Kontrolle ab. Die Auswertung über den mittleren Befallswert bestätigt den signifikanten Unterschied zu den Kontrollparzellen (Abb. 37). Der Unterschied in der Befallshäufigkeit zwischen fungizidbehandelten und nur mit Antagonisten behandelten Parzellen besteht nur am ersten Boniturtermin im Mai. Der Unterschied zwischen behandelten Parzellen und den Kontrollparzellen wurde im Verlauf der Vegetationsperiode immer geringer.

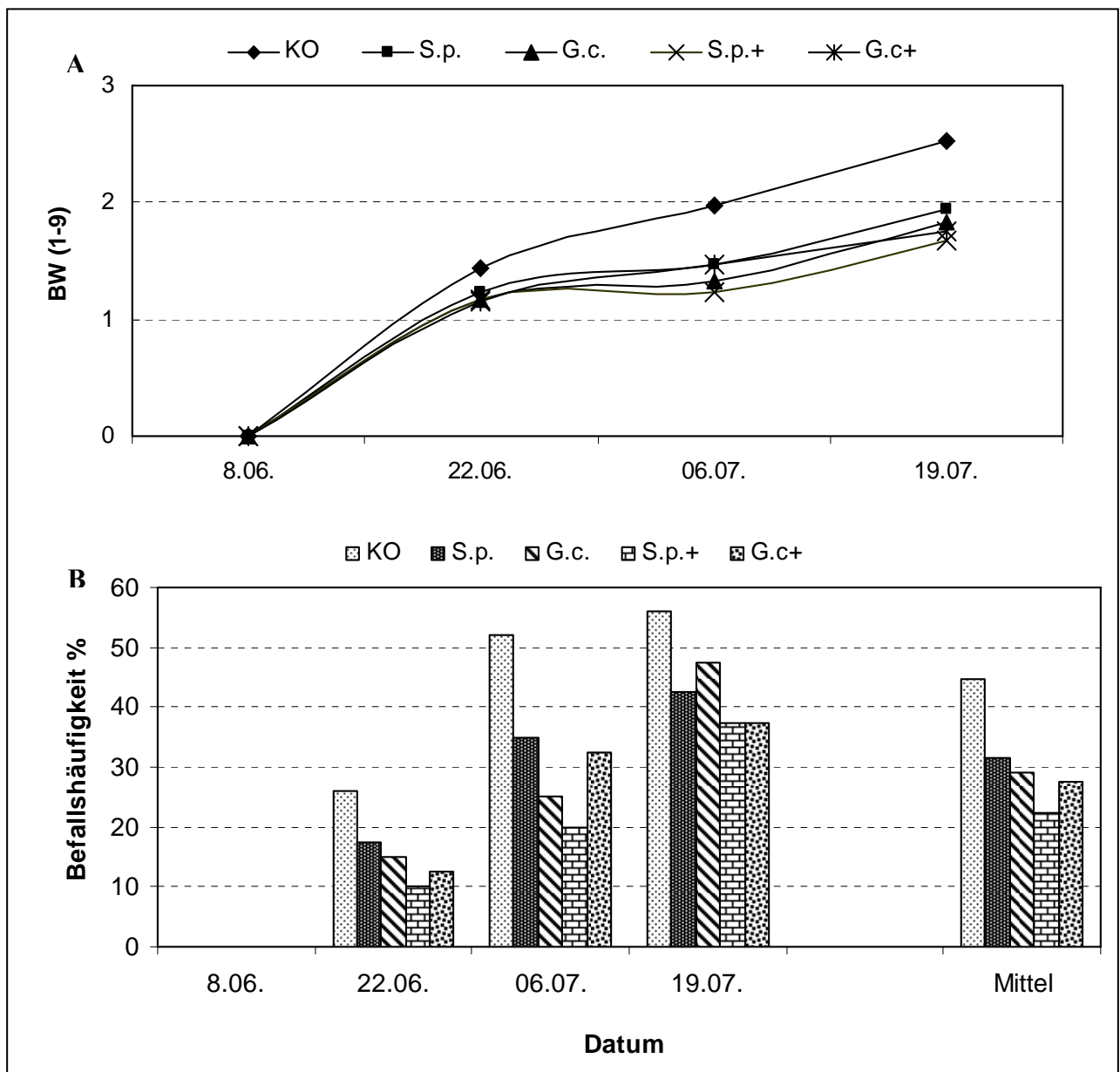
**Tab. 17:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf den Befallswert (BW = Skala 1-9) durch *P. lingam* am Wurzelhals in der unbehandelten Kontrolle (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p.+ und G.c.+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober).

Variante	06.04.	08.05.	21.05.	08.06.	22.06.	06.07.	19.07.	Mittel
KO	0	2,3	2,8	3,0	3,0	3,6	4,3	3,1
S.p.	0	1,4	1,6	1,6	2,2	2,5	2,7	2,0
G.c.	0	1,5	1,9	2,0	2,4	2,6	2,5	2,1
S.p.+	0	1,3	1,4	1,6	1,8	2,4	2,6	1,8
G.c.+	0	1,5	1,6	1,8	2,0	2,4	2,7	2,0



**Abb. 37:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf den mittleren Befallswert (BW = Skala 1-9) mit *P. lingam* am Wurzelhals aus den Boniturterminen vom 8. Mai bis 19. Juli in der unbehandelten Kontrolle (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p.+ und G.c.+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober). Ergebnisse (Säulen) der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD- Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 40$  Pflanzen pro Variante).

Ab Juni wurde zusätzlich der Stängelbefall ermittelt. Die Einzelergebnisse der Analysen zum *P. lingam* Stängelbefall sind in den Abb. 38 A und B und Tab. 18 dargestellt.



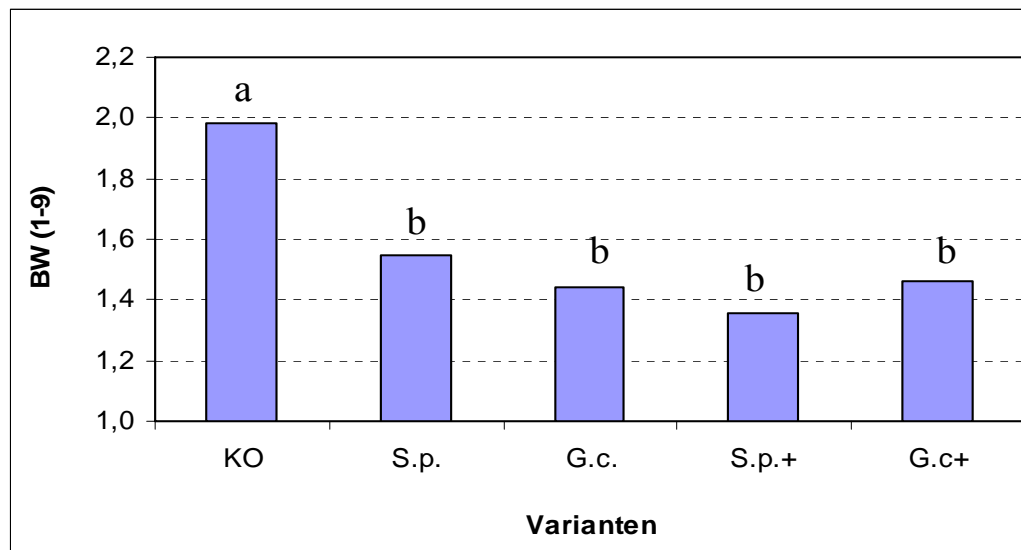
**Abb. 38:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf den Befallswert (BW = Skala 1-9) "A" und die Befallshäufigkeit (BHB = prozentualer Anteil befallener Pflanzen) "B" durch *P. lingam* am Stängel in der unbehandelten Kontrolle (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p.+ und G.c.+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober).

Die über den Wurzelhals getroffenen Aussagen werden durch die ermittelten Befallswerte und die Befallshäufigkeit für den Stängelbefall bestätigt. Zwischen den behandelten Varianten war wieder kein Unterschied erkennbar.

**Tab. 18:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf den Befallswert (BW = Skala 1-9) durch *P. lingam* am Stängel in der unbehandelten Kontrolle (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p+ und G.c+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober). Boniturtermine vom 22. Juni bis 19. Juli.

Variante	08.06.	22.06.	06.07.	19.07.	Mittel
KO	0	1,4	2,0	2,5	2,0
S.p.	0	1,2	1,5	1,9	1,5
G.c.	0	1,2	1,3	1,8	1,4
S.p.+	0	1,2	1,2	1,7	1,4
G.c+	0	1,5	1,5	1,7	1,5

Die Auswertung der mittleren Befallswerte des Stängelbefalls ergab wiederum eine signifikante Reduktion gegenüber den Kontrollparzellen (Abb. 39).

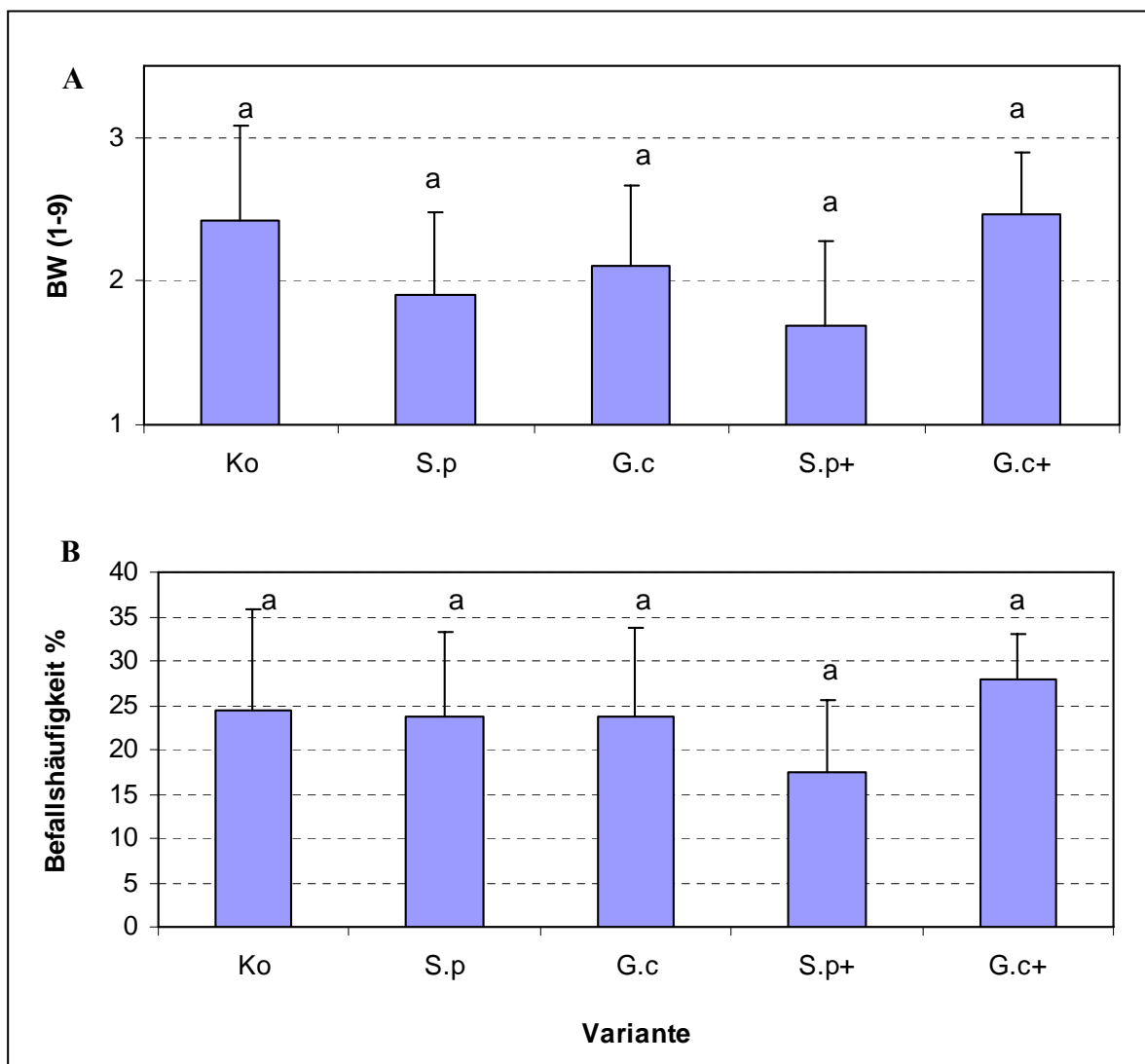


**Abb. 39:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf den mittleren Befallswert (BW = Skala 1-9) mit *P. lingam* am Stängel aus den Boniturterminen vom 8. Mai bis 19. Juli in der unbehandelten Kontrolle (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p+ und G.c+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober). Ergebnisse (Säulen) der Befallsstärke mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD- Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 40$  Pflanzen pro Variante).



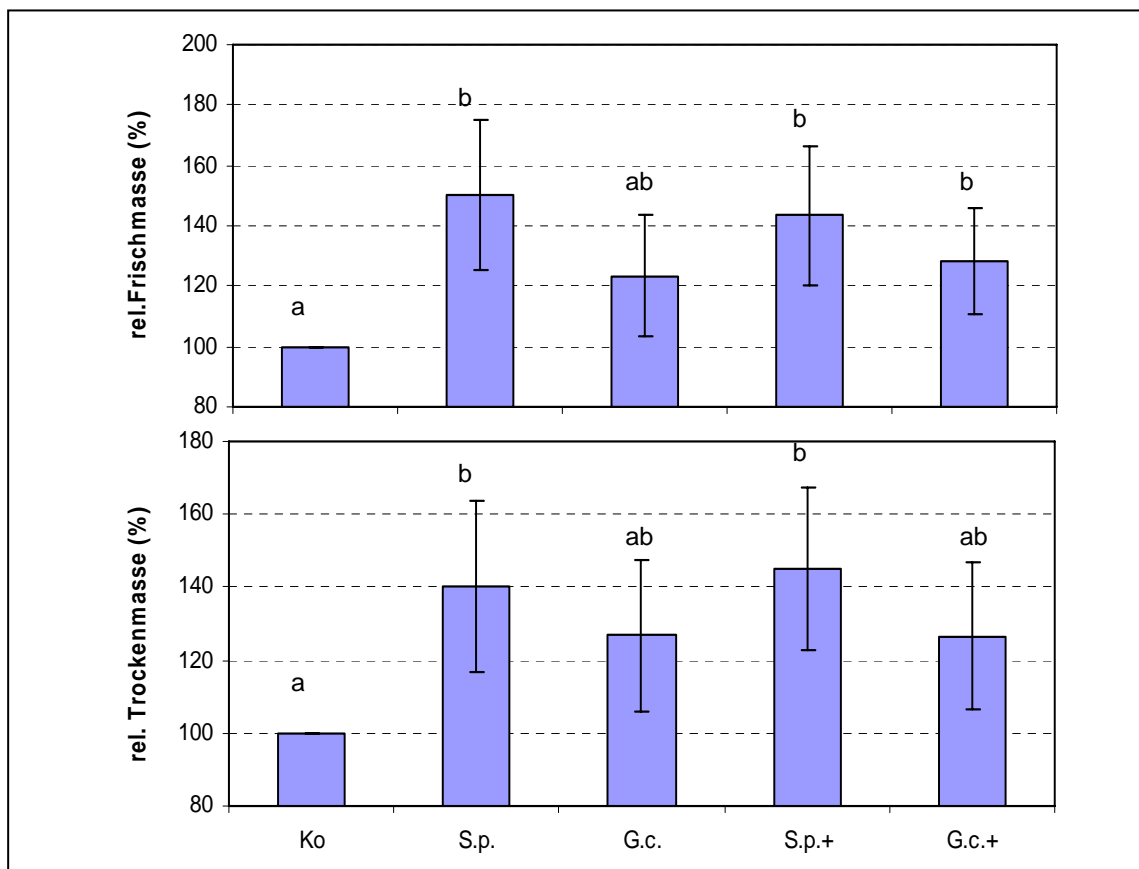
### 3.8.3 Wirkung gegen *V. dahliae*

Der bodenbürtige Krankheitserreger *V. dahliae* war in diesem Versuch am Standort Hohenschulen von großem Interesse, eindeutige Symptomausprägungen in Form von Mikrosklerotien im Mark und unter der Kutikula der Stängel zeigten sich aber immer erst gegen Ende der Vegetationszeit. Die durchschnittlichen Befallswerte (1-9) wurden zwei Tage nach der Ernte ermittelt. Erst dann ließ sich die Krankheit eindeutig nachweisen.



**Abb. 40:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf den Befallswert (BW = Skala 1-9) "A" und die Befallshäufigkeit (BHB = prozentualer Anteil befallener Pflanzen) "B" von *Verticillium dahliae* am Stängel in der unbehandelten Kontrolle (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p+ und G.c+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober). Ergebnisse (Säulen) der Befallshäufigkeit (%) mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD- Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 45$  Pflanzen pro Variante).

Erste Symptome waren ab Anfang Juli in Form von halbseitigen Chlorosen auf der Kutikula von Stängel sichtbar. Die Abb. 40 dokumentiert Befallswert und Befallshäufigkeit als Ausmaß des Befalls mit *V. dahliae*. Die maximale Ausprägung der Befallshäufigkeit von 28 % wurde in der G.c.<sup>+</sup> Variante ermittelt und die minimale von 17,46 % in der (S.p.<sup>+</sup>) Variante. Der Befallswert von *V. dahliae* erreichte einen maximalen Wert von 2,47 (BW= Skala 1-9) in der G.c.<sup>+</sup> Variante und den niedrigsten Wert von 1,68 in der S.p.<sup>+</sup> Variante. Im Vergleich zu den Kontrollen mit einem mittleren Wert von 2,42 lagen die Behandlungen mit Ausnahme von G.c.<sup>+</sup> unter diesem Wert, die Unterschiede waren jedoch in keinem Fall signifikant. Weder für den Befallswert noch für die Befallshäufigkeit konnte ein Einfluss der Fungizidmaßnahme dokumentiert werden. Der Befallshäufigkeit konnten mit 25,00 % in der unbehandelten Kontrolle und 17,46 % in S.p.+ Variante festgestellt werden.



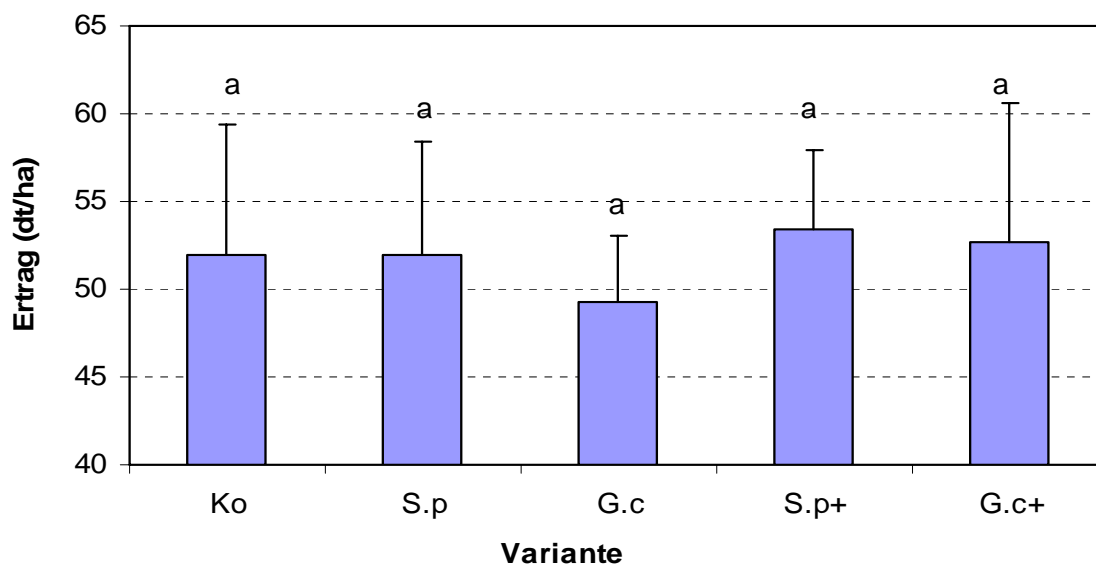
**Abb.41:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf die relative Pflanzenfrisch- und Pflanzentrockenmasse 10 Wochen (BBCH 18-19) nach Versuchbeginn in der unbehandelten Kontrolle (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p+ und G.c+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober). Ergebnisse (Säulen) der Befallshäufigkeit (%) mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD- Test bei  $p < 0,05$ ,  $n = 40$  Pflanzen pro Variante).

### 3.8.4 Wachstumsförderung

In Jugendstadium ist eine vitale Pflanze ausschlaggebend für den weiteren Erfolg besonders vor Eintritt des Winters. Deshalb wurde 10 Wochen nach Aussaat die Frisch- und Trockenmasse ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 41 dargestellt. Die mit *S. plymuthica* behandelten Pflanzen hatten eine signifikant höhere Masse als die Pflanzen aus der Kontrolle. Die Pflanzenfrischmasse bzw. Pflanzentrockenmasse der mit *S. plymuthica* und *G. catenulatum* behandelten Pflanzen nahm gegenüber der unbehandelten Kontrollen um 50,3 bzw. 23,3 % im Frischgewicht und um 40,1 bzw. 27,9 % im Trockengewicht zu (Abb. 46). Der Fungizideinsatz zeigte keine zusätzliche Steigerung der Pflanzenfrisch- oder Pflanzentrockenmasse.

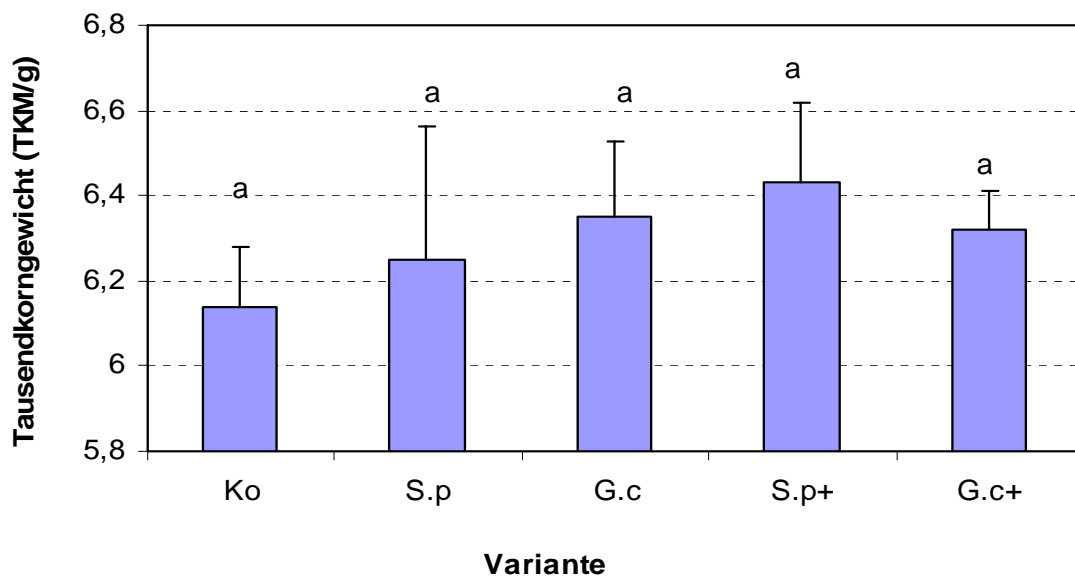
### 3.8.5 Auswirkung auf Ertrag und TKG

Die Bonitur wachstumsfördernder Effekte im Freiland erfolgte ebenfalls zu Versuchsende durch die Ermittlung des Rapsertes. Die erzielten Ernteerträge unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 42).



**Abb. 42:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf den Ertrag (in dt/ha) in den unbehandelten Kontrollen (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p+ und G.c+ mit einer Behandlung mit Caramba<sup>®</sup> (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober). Ergebnisse (Säulen) des Ertrages mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ).

Das Tausendkorngewicht war mit 6,4 g am höchsten in der S.p.<sup>+</sup> Variante und mit 6,1 g am niedrigsten in den Kontrollen (Abb.43). Signifikante Unterschiede wurden aber ebenfalls nicht nachgewiesen.

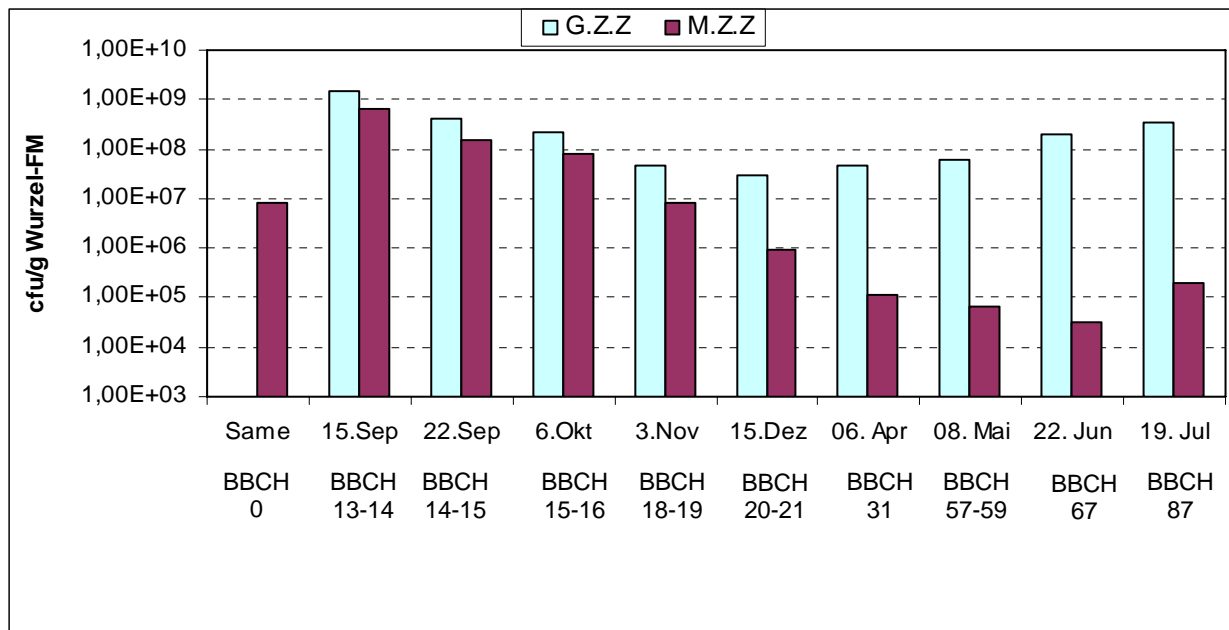


**Abb. 43:** Einfluss der Saatgutbehandlung auf das Tausendkorngewicht (TKG/g) in den unbehandelten Kontrollen (Ko) und den Behandlungen mit *S. plymuthica*  $7,9 \times 10^6$  cfu/Samen (S.p.), *G. catenulatum*  $8,5 \times 10^5$  cfu/Samen (G.c.) und S.p+ und G.c+ mit einer Behandlung mit Caramba® (60% Metconazol, 0,7 l/ha am 7. Oktober). Ergebnisse (Säulen) des Ertrages mit verschiedenen Buchstaben sind statistisch signifikant verschieden (Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$ ).

### 3.8.6 Besiedlung der Rhizosphäre mit *S. plymuthica*

Da insbesondere der Einfluss der Antagonisten auf den Befall mit *P. lingam* wahrscheinlich auf einer Induktion von Resistenzmechanismen der Pflanze zurückzuführen ist, stellt sich die Frage, ob sich die Antagonisten in der Rhizosphäre ansiedeln können, um so nachhaltige Effekte zu erzielen. In Abb. 44 sind die Besiedlungsdichten mit dem antibiotika-resistenten antagonistischen Bakterium *S. plymuthica* in der Rhizosphäre von Winterraps in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Pflanzen dargestellt. In diesem Versuch wurden die bakteriellen Gesamtzellzahl (G.Z.Z) als Bezugsgröße für die Zelldichte der Testorganismen erfasst. Eine Dichte von  $7,9 \times 10^6$  Bakterien je inokuliertem Rapssamen war ausreichend eine Besiedlung der Keimwurzel durch die applizierten Bakterien herbeizuführen. Im Laufe der weiteren Pflanzenentwicklung nahm die Zellzahl des Antagonisten stetig ab und reduzierte sich bis zum Versuchende nach 11 Monaten auf einen Wert von  $2 \times 10^5$  cfu/g Wurzelfrischmasse, während die Gesamtzellzahl der Rhizosphäre-

bakterien konstant blieb. Im September war die Zelldichte auf  $1,53 \times 10^9$  cfu/g Wurzel-FM und die der Rifampicin-resistenten Mutante *S. plymuthica* (M.Z.Z) auf  $6,79 \times 10^8$  cfu/g WFM, entsprechend 44,4 % der Gesamtzellzahl. Die hohen Durchschnittstemperaturen im September und Oktober von 14 bzw. 11°C waren wahrscheinlich förderlich für die Aktivität der Rhizosphärebakterien. Die Gesamtzellzahl wies über den gesamten Vegetationsverlauf relativ gleich bleibende Werte von durchschnittlich  $3,19 \times 10^8$  cfu/g WFM auf.



**Abb. 44:** Besiedlung der Rapsrhizosphäre mit kultivierbaren Rhizobakterien (G.Z.Z) sowie Abundanz der rifampicin-resistenten Mutante von *S. plymuthica* (M.Z.Z) im Verlauf der Vegetationsperiode nach Priming-Behandlung des Saatgutes. Bakterienzahl als cfu/g Wurzelfrischmasse (WFM). Die Daten basieren auf der Lebendkeimzahlbestimmung auf TSA-Medium bzw. für *S. plymuthica* auf Rifampicin-haltigem TSA-Agar nach Inkubation über 2 Tage bei 25 °C.

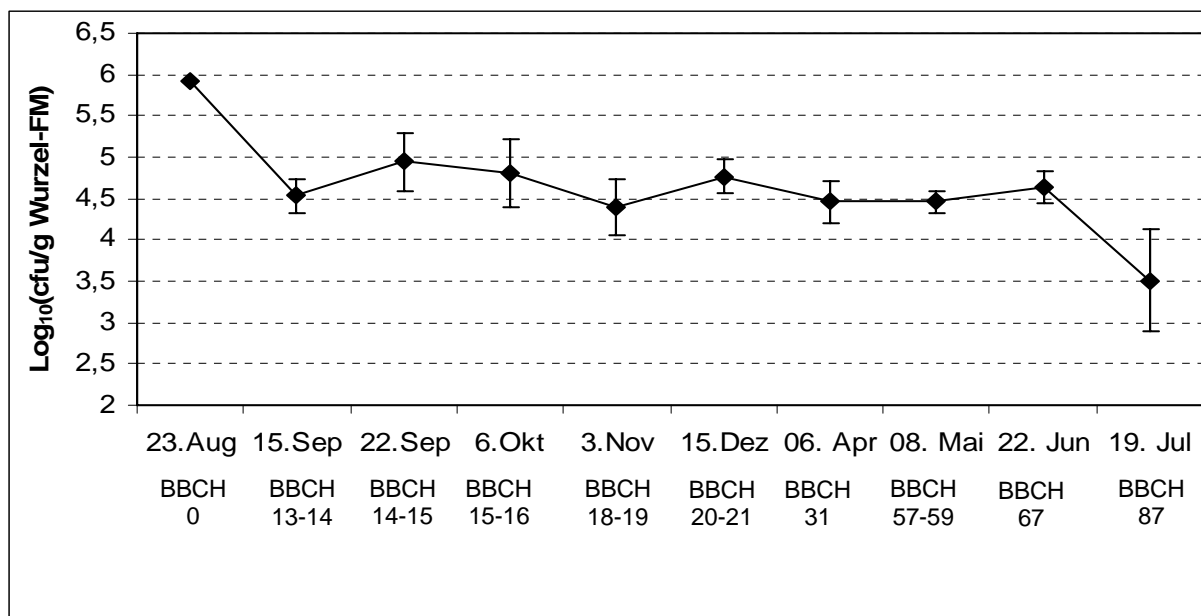
Die durch den Dauerfrost eingetretene Verringerung sowohl der bakteriellen Gesamtpopulation als auch der Population von *S. plymuthica* hielt bis in das Frühjahr an. Während die Gesamtpopulation jedoch wieder anstieg, erholte sich die Population des Antagonisten nicht. In Tab. 19 ist die Populationsdichte des Antagonisten ins Verhältnis zur Gesamtpopulation gesetzt. Es wird deutlich, dass die Zelldichte des Antagonisten im Laufe der Vegetationszeit bis auf unter 0,1% sinkt.

**Tab. 19:** Durchschnittliche Gesamtzellzahl (G.Z.Z) und Lebezellzahlen der Rifampicin-resistenten Mutante *S. plymuthica* (M.Z.Z) in der Rhizosphäre von Winterraps nach einer Priming-Behandlung des Saatgut (Werte in cfu/g Wurzel-FM).

Isolat	Art	Durchschnitt der Zelldichte			
		Herbst	Winter	Frühjahr	Sommer
<b>GZZ</b>		$5,49 \times 10^8$	$3,04 \times 10^7$	$5,4 \times 10^7$	$2,69 \times 10^8$
<b>HRO-C48<sup>Rif</sup></b>	<i>S. plymuthica</i>	$2,31 \times 10^8$	$9,38 \times 10^5$	$8,91 \times 10^4$	$1,16 \times 10^5$
<b>M.Z.Z von G.Z.Z (%)</b>		42,07	3,09	0,18	0,04

### 3.8.7 Besiedlung der Rhizosphäre mit *Gliocladium catenulatum*

Auch die Abundanz des antagonistischen Pilzes *G. catenulatum* in der Rhizosphäre von Raps wurde im Verlauf der Vegetationsperiode bestimmt. Die erfassten Lebendkeimzahlen sind in Abb. 45 dargestellt. Mit  $8,5 \times 10^5$  Sporen je Saatkorn wurde eine ausreichende Besiedlung der Keimwurzel herbeiführen. Nach Aussaat sank die Zahl stark ab und blieb dann über die Vegetationsperiode weitgehend unverändert, um dann mit zunehmender Seneszenz der Pflanze wieder abzunehmen. *G. catenulatum* wurde mit  $\log_{10} 3,5 - 5,0$  cfu/g WFM festgestellt.



**Abb. 45:** Abundanz von *Gliocladium catenulatum* nach Saatgutinkrustierung im Verlauf der Vegetationsperiode. Die Daten basieren auf der Lebendkeimzahlbestimmung auf selektivem Medium nach Inkubation von 5 Tagen bei 25 °C. Werte in Pilzkolonien pro Gramm Wurzelfrischmasse (WFM).

## 4 Diskussion

Der chemische Pflanzenschutz ist zweifellos in seiner heute betriebenen Intensität mit einer Reihe ökologisch unerwünschter Nebenwirkungen behaftet, die in den komplexen Naturhaushalt eingreifen (Philipp, 1988). Die Nutzung von rhizosphärenkompetenten Bakterien und Pilzen mit antimykotischen Wirkmechanismen könnte zukünftig eine intelligente Möglichkeit schaffen, bodenbürtige Pflanzenpathogene zu kontrollieren, die mit den herkömmlichen Methoden des chemischen Pflanzenschutzes bislang nicht in vertretbarer Weise bekämpft werden konnten. Aus diesem Grund besteht die dringende Notwendigkeit, nach alternativen Bekämpfungsmaßnahmen zu suchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, aus dem Potential bakterieller bzw. pilzartiger Antagonisten aus der Rhizosphäre von Winterraps (*Brassica napus* L. var. *napus*) wirksame, antimykotische Stämme gegen *V. dahliae* Kleb. bzw. *Phoma lingam* zu selektieren. Einige Antagonisten wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Besiedlung der Rapswurzel und zur Unterdrückung des Befalls von Rapspflanzen mit *V. dahliae* bzw. *Phoma lingam* beurteilt. Im Vordergrund stand dabei der Einsatz als Saatgutbehandlung und die Erprobung unter Gewächshaus-, Klimaschrank- und Feldbedingungen. Erster Selektionsschritt war jedoch der Dualtest im Labor.

### 4.1 Überprüfung *in vitro*- Hemmwirkung ausgewählter Antagonisten

Zur Auswahl antimykotisch wirksamer Antagonisten wurde ihre Hemmaktivität gegenüber *V. dahliae* und *P. lingam* in Dual-Kulturen überprüft. Zahlreiche Autoren kritisierten allerdings diese Vorgehensweise, da keine generelle Beziehung zwischen der Fähigkeit eines Isolats, ein Pathogen *in vitro* zu hemmen und der Krankheitsunterdrückung *ad planta* besteht (Campbell 1994; Kloepper, 1991). Demgegenüber ermittelten andere Autoren (Fravel 1988; Stanley et al. 1994; Mottesinos et al. 1996), dass ein enger Zusammenhang zwischen der *in vitro*-Hemmwirkung und der *ad planta*-Wirksamkeit ihrer Antagonisten existiert. Kein Versuchsansteller wird jedoch bestreiten, dass sich Hemmmechanismen wie die Konkurrenz um Nährstoffe sowie durch Mikroorganismen induzierte Resistenz mit Hilfe von Dualkulturversuchen erfassen lassen (Blakeman & Fokkema, 1982). Da die Schwächung des pilzlichen Erregers durch Hemmstoffe nach wie von zahlreichen Autoren (u.a. Cook & Baker 1983) als von zentraler Bedeutung beim Angriff nekrotropher Mycoparasiten bzw. Bakterien

angesehen wird, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Selektion der Antagonisten zunächst anhand der Hemmwirkung auf Agar-Nährmedien. Die Bildung von Antimycotika durch Antagonisten hängt überwiegend vom verwendeten Medium ab (Bakker & Schippers, 1987). Um diesen Faktor zu berücksichtigen und möglichst die antibiotisch wirksamsten Antagonisten sicher zu erfassen, wurde die Auswahl in der vorliegenden Arbeit wie bei Broadbent et al. (1971), und Heupel (1992) auf verschiedenen Medien durchgeführt. Hierzu wurden die zwei nährstoffreichen Medien V8 und WA verwendet, welche sich in Voruntersuchungen als sehr geeignet für das Myzelwachstum von *P. lingam* bzw. *V. dahliae* var. *longisporum* und Bakterien erwiesen.

Alle Antagonisten konnten das Myzelwachstum mit einem Hemmhof von  $\geq 10$  mm auf WA- und/oder V8-medium unterdrücken. Die Ergebnisse schließlich rechtfertigten die Verwendung von verschiedenen Medien; da wie in anderen Arbeiten (Sasse 1997) auch in dieser Untersuchung bei einigen Antagonisten nur auf einem der beiden Testmedien eine antagonistische Wirkung erzielt wurde. Bei der Überprüfung der Hemmaktivität in Dual-Kulturen zeigte sich allerdings bei Heupel (1992), dass ein dextrosereiches Nährmedium, wie PDA, ungeeignet ist, weil hier die Hemmwirkung der meisten Antagonisten unterdrückt wird. Auch Wong & Baker (1984) stellten unterschiedliche Hemmaktivitäten bei fluoreszierenden Pseudomonaden abhängig vom Nährmedium fest. Vermutlich steuert die Zusammensetzung der verschiedenen Medien die Ausscheidung der Sekundärmetaboliten und beeinflusst damit die unterschiedliche *in vitro*-Hemmwirkung der antagonistischen Mikroorganismen.

In den vorliegenden Untersuchungen zur *in vitro*-Hemmaktivität zeigten die ausgewählten Antagonisten bei optimalen, den Rhizosphärebakterien angepassten Temperaturen von 22 °C eine unterschiedliche Wirkung gegenüber *V. dahliae* und *P. lingam*. Da der pathogene Pilz *P. lingam* jedoch die Winterrapspflanzen bereits bei niedrigen Temperaturen 10 °C infizieren kann, müssen die Antagonisten auch bei diesen Bedingungen wirksam sein. Aus diesem Grund wurde die antagonistische Wirksamkeit zusätzlich bei 10 °C getestet. Die Isolate mit der stärksten Hemmwirkung bei 22 °C zeigten auch bei 10 °C eine sehr gute Wirkung, außer *Bacillus subtilis* und *Paenibacillus polymyxa*. Aufgrund der Herbstsaat ist diese Tatsache eine wichtige Voraussetzung beim Einsatz der Antagonisten *ad planta* unter Freilandbedingungen. Weil eine Primärinfektion der Rapspflanze von den im Boden überdauernden Mikrosklerotien von *V. dahliae* und Ascosporen in Pseudothecien von *P. lingam* auf Pflanzenresten ausgeht, war die Selektion von Antagonisten anhand ihrer



Fähigkeit, die Mikrosklerotien-Keimung von *V. dahliae* und Asco- und Pyknidiosporen von *Phoma lingam* zu hemmen, von Bedeutung. In den vorliegenden Untersuchungen dazu zeigte sich, dass die Keimung der Mikrosklerotien und Pyknidiosporen im Vergleich zur Kontrolle von den Antagonisten unterschiedlich stark gehemmt wurde. Auffällig war die starke antagonistische Wirkung der Antagonisten *S. plymuthica*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *B. subtilis* und *G. catenulatum*. Kienath et al. (1991) konnten mit dem Einsatz des pilzlichen Antagonisten *Gliocladium roseum* die Lebensfähigkeit der Mikrosklerotien von *V. dahliae* bis zu 100 % reduzieren. Beim Vergleich der vorliegenden Ergebnisse stellte sich heraus, dass die Isolate insgesamt das Myzelwachstum von *V. dahliae* und *P. lingam* stärker beeinflussten als die Mikrosklerotien- und Pykniden-Keimung. Auch bei Knappe (1994) und Berg (1994) wurde das Myzelwachstum von *V. dahliae* durch die antagonistischen Isolate stärker gehemmt als die Mikrosklerotien-Keimung.

Die Bestimmung der antagonistischen Wirkmechanismen von Antagonisten ist Gegenstand einer Fülle von Untersuchungen. Im Dualtest wurde jedoch nur die Antibiose getestet. Alle Antagonisten hatten in diesem Test eine antagonistische Aktivität gegen *V. dahliae* und *P. lingam*, auch das autoklavierte Kultursubstrat. Als Beispiel seien hier nur die antibiotikabildenden Mikroorganismen *Trichoderma* spp. (Gliotoxin, Gliovirin, Viridin) (Cook & Baker, 1989), *B. subtilis* (Fengymycin) (Loeffler et al., 1986), und besonders *P. fluorescens* (Anthranilinsäure, Phenazin-1-Carboxylat, Pyrrolnitrin, Pyoluteorin, Pyocyanin) (Weller & Cook, 1983) bzw. (Acetylphloroglucinole,  $\beta$ -Lactone, Fluopsine, Salicylsäure und Sorbistine) (Defago & Haas, 1990) und Pyrrolnitrin aus *Serratia plymuthica* (Berg, 1996) genannt.

#### 4.2 Saatgutbehandlung mit antagonistischen Mikroorganismen

Produkte zur Saatgutbehandlung haben die Vorzüge zur Umweltgesundheit beizutragen und die Arbeitssicherheit zu verbessern. Sie sind gegen Insekten und Krankheiten im Einsatz und verbessern die Ertragssicherheit zu verbessern und können zu einem Bestand mit gesunden, kräftigen Pflanzen beitragen. Heutige moderne Produkte müssen hohe Standards an Sicherheit und Wirksamkeit erfüllen.

Das Problem der Formulierung Gram-negativer Bakterien konnte bislang nicht praktikabel gelöst werden, weil diese Mikroorganismen keine Sporen ausbilden, die durch ihre

Stresstoleranz die Weiterverarbeitungsprozesse überstehen könnten. Für eine Beizung, Inkrustierung oder Pilierung von Saatgut mit synthetischen Pflanzenschutzmitteln kommen oft spezielle Bindemittel zum Einsatz. Die Pilierung erfordert spezielle Auftragungsmaschinen und Techniken und ist eine der teuersten Methoden. Sie sind für Gram-negative Bakterien jedoch weniger gut geeignet (Müller, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Saatgut-Priming versucht. Diese Applikationsform bietet den Vorteil, dass sich die eingesetzten Mikroorganismen zielgenau am Ort des zu erwartenden Befalls platzieren lassen und dort über einen gewissen Zeitraum wirksam bleiben. Diese Methode der Saatgutbehandlung ist kostengünstig und eine relativ umweltschonende Applikationsform, insbesondere zur Bekämpfung keimlingsschädigender Pathogene oder zur Bekämpfung der Pathogene, die mit Saatgut übertragen werden. Andere Vorteile des Saatgut-Primings ist, dass keine Hilfsstoffe gebraucht werden. Der für die Herstellung infiltrierten Saatguts (Saatgut-Priming) in der Regel notwendige anschließende Trocknungsprozess kann jedoch zu einem Absterben eines großen Teils der applizierten Bakterien führen (Taylor & Harman, 1990).

Eine effektive Wurzelbesiedlung besonders der Keimwurzel mit antagonistischen Mikroorganismen kann durch eine Applikation dieser Organismen an das Saatgut ermöglicht werden. Modellvorstellungen gehen davon aus, dass die am Saatgut fixierten Mikroorganismen aufgrund ihrer hohen Populationsdichte einen Wettbewerbsvorteil gegenüber natürlichen Konkurrenten besitzen und deshalb die Wurzel und das Hypokotyl der keimenden Pflanze verstärkt besiedeln können (Kloepper et al. 1989). Noga et al. (1990) berichtete von Risiken des Einsatzes von Hilfsstoffen. Durch Tenside kann die epikutuläre Wachsschicht derart verändert oder gar zerstört werden, dass die Infektion durch pilzliche Pathogene wie *B. cinerea* gefördert wird. So dient zum Beispiel Cellulose *Pythium ultimum* als Nahrungsquelle und kann zu einem verstärkten Krankheitsverlauf führen (Taylor & Harman 1990). Ausgehend von diesen Berichten wurden Untersuchungen durchgeführt, in denen die Eignung antagonistisch wirksamer Bakterienstämme und Pilz (*Gliocladium catenulatum*) für neue Applikationsformen ermittelt werden sollte. Um das Problem eines Absterbens eines größten Teils der applizierten Bakterien zu lösen, wurden das Saatgut-Priming und die Inkrustierung verglichen. Grundannahme bei Beginn der vergleichenden Versuche zur Eignung der Antagonisten für ein Saatgutinkrustierungsverfahren bzw. Saatgut-Priming war, dass die Antagonisten durch Saatgut-Priming länger im Saatgut überdauern werden. Das gilt besonders für die Gram-negativen Bakterien (*Serratia plymuthica*,

*Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas chlororaphis*), da die Isolate von *Bacillus subtilis* und *Paenibacillus polymyxa* Sporen bilden können. Erst durch Verwendung des Saatgut-Priming wurde die Mortalität deutlich herabgesetzt, so dass für diese Varianten die Anzahl vitaler Zellen über die Lagerdauer bis 60 Tage bei +4°C bzw. Raumtemperatur relativ stabil blieb. Für *Gliocladium catenulatum* konnte das Priming nicht eingesetzt werden, weil Myzel und Sporen des Pilzes nicht in den Samen eindringen konnten.

Die während der anschließenden Trocknung der behandelten Samen vorliegende Temperatur scheint maßgebliche Bedeutung für die Vitalität der Bakterien zu besetzen. Von Heupel (1992) wurden ähnliche Erfahrungen bei der Pilierung von Rübensaatgut mit Bakterien gemacht. Die in den Versuchen zum Priming erreichten Bakteriendichten in der Größenordnung von  $3 \times 10^7$  je Rapssaatkorn stellen für Saatgut dieser Korngröße möglicherweise das mit dieser Methode erreichbare Maximum dar. Bei der Saatgutinkrustierung wurden Dichten von  $10^6$  bis  $6 \times 10^6$  je Rapssaatkorn erreicht

### 4.3 Wirkung der Antagonisten gegen *Phoma lingam*

*P. lingam* kann alle Pflanzenteile anfälliger Sorten besiedeln (Gugeln & Petrie 1992). Ein Blattbefall im Herbst stellt nach Hammond et al. (1985) das potentielle Inokulum für den späteren Befall an der Stängelbasis und dem Wurzelhals dar. Der Pilz kann nach dem Eindringen in die Blattstiele systemisch in den Wurzelhals und die Stängelbasis wandern und dort die typischen Symptome hervorrufen (Hammond & Lewis 1987). Daraus resultierte die Überlegung, die Hemmwirkung der Antagonisten gegen *P. lingam* zunächst an Rapsblättern zu untersuchen. Zur Überprüfung der Keimblattreaktionen auf die Infektion mit *P. lingam* wurde bereits eine reproduzierbare Methode etabliert (Delwiche & Williams 1979; Volke 1999), wobei Keimblätter im Entwicklungsstadium BBCH11-12 nach mechanischer Verletzung mit einer sterilen Nadel mit einer Sporensuspension von *P. lingam* inokuliert und 14 Tage später der Befall bonitiert wird. Die ganze Versuchsdauer betrug somit von der Aussaat bis zur Befallsbonitur lediglich drei bis vier Wochen. Unter Berücksichtigung, dass ein Befall mit *P. lingam* eine Verletzung voraussetzt, erschien es für den *ad planta* Test in der vorliegenden Arbeit sinnvoll, ebenfalls Rapskeimlinge und den erwähnten Test einzusetzen, da er eine kürzere Versuchsdauer ermöglicht, als bei Verwendung von jungen Rapspflanzen im BBCH11, zumal für einen Test an Laubblättern keine erprobte Infektionsmethode vorlag.

Im *ad planta*-Test der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund des Versuchsaufwands die Zellen der Antagonisten eingesetzt, da das Hauptaugenmerk zunächst nur den wirksamen Organismen, galt. Eine Möglichkeit, die Überlebensfähigkeit der Antagonisten auf der Pflanze zu verbessern, beschreiben Suslow & Schroth (1981). Sie fanden, dass die Verwendung des Haftmittels Methylcellulose, wahrscheinlich aufgrund der langkettigen Struktur, den Mikroorganismen einen effektiven Schutz vor einer Austrocknung gewährt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Bakterienzellen nach Zentrifugation in 0,5%iger Carboxymethylzellulose und 0,02%igem Tween 20 resuspendiert. Zur Vereinheitlichung wurde die Dichte der Antagonistensuspensionen mittels der Thoma-Kammer eingestellt. Die Inokulation mit *P. lingam*-Sporen erfolgte 6 Stunden nach der Verletzung, so dass die bakteriellen Antagonisten einen Vorsprung bekamen, die verletzten Stellen sowie andere Bindungsstellen des Pathogens besetzen zu können.

Alle Antagonisten waren in den *ad planta* Versuchen mit den Rapskeimlingen auch bei einem hohen Befallsdruck antagonistisch wirksam gegen *P. lingam*. *S. plymuthica*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens* und *G. catenulatum* konnten den Befall nach Blattapplikation im Klimaschrank und Gewächshaus um z. T. über 50 % reduzieren. Der Anteil gesunder Pflanzen stieg von unter 10 % in den unbehandelten Kontrollen auf über 40 % in einigen Fällen über 50%. Die Wirkung der Gram-positiven Bakterien blieb hinter der Wirkung der Gram-negativen wesentlich zurück (Abb. 12 und 13). Die im Dualtest ermittelte starke antagonistische Wirkung von *B. subtilis* konnte *ad planta* also nicht wiederholt werden. Die Verwendung der Priming-Behandlung des Saatguts führte ebenfalls zu einer deutlichen Befallsreduktion. Am auffälligsten war sie bei *S. plymuthica*, *P. chlororaphis* und *G. catenulatum* in Klimaschrankversuchen. Im Gewächshaus war der Anteil gesunder Pflanzen nur noch bei *S. plymuthica* und *G. catenulatum* höher als bei den anderen Antagonisten. Die Prüfung verschiedener Antagonistendichten im Saatkorn hat gezeigt, dass der Effekt konzentrationsabhängig ist und bei einer Dichte von unter  $10^5$  nicht mehr signifikant ist.

Eine Prüfung der Wirksamkeit erfolgte auch auf den Wurzelhals- und Stängelbefall. Die Pflanzen wurden zuerst mit den Zellen der Antagonisten behandelt und danach mit den Pykno-sporen des Pathogens inokuliert. Abweichend vom Test an den Keimlingen wurde hier eine Zeitspanne zwischen der Ausbringung der Antagonisten und der Inokulation mit dem Pathogen von 48 h eingehalten. Die Antagonisten hatten also ausreichend Zeit sich zu

etablieren, in der Hoffnung, dass die sie unter den Bedingungen ihr Wirkpotential möglichst vollständig entfalten konnten und gegebenenfalls auch eine Resistenz der Pflanzen induzieren konnten. Hierfür wird in der Regel eine Zeitspanne von ein paar Tagen bis zu einer Woche benötigt (Hammerschmidt & Kuc 1995). *P. fluorescens* WCS374 benötigte mindestens einem Tag, um eine signifikante Resistenz gegen die *Fusarium*-Welke an Rettich zu induzieren (Leemann et al. 1995). Die verwendeten Antagonisten waren wirksam gegen *P. lingam* im Vergleich zur Kontrolle. *P. polymyxa* bzw. *B. subtilis* zeigten erneut, vergleichbar mit dem Test an den Rapskeimlingen, ein eingeschränktes antagonistisches Potential. Andere Autoren hatten mit Vertretern dieser Gattung in ihren Arbeiten allerdings mehr Erfolg. So wies Sasse (1997) *P. polymyxa* neben einigen *Pseudomonaden* als den wirksamsten Antagonisten gegen *Verticillium longisporum* an Winterraps aus.

*S. plymuthica* war von allen getesteten Isolaten der wirksamste Antagonist gegen den Erreger der Rapswurzelhals- und Stängelfäule. Der Befall mit *P. lingam* wurde selbst bei starkem Infektionsdruck ( $2 \times 10^5$  Sporen/Pflanze) noch um bis zu 54 % im Gewächshaus bzw. 63 % im Klimaschrank reduziert. In der Literatur findet man sehr häufig *B. subtilis* als wirkungsvollen Antagonisten zahlreicher phytopathogener Pilze, u.a. an Bohne (Baker et al. 1985, Pleban et al. 1995). Wie in zahlreichen anderen Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten waren auch in der vorliegenden Arbeit *G. catenulatum* und *Pseudomonaden* sehr effektiv. Mit dem *G. catenulatum*, *P. fluorescens* und *P. chlororaphis* konnte der Befall mit *P. lingam* selbst bei starkem Infektionsdruck ( $2 \times 10^5$  Sporen/Pflanze) noch um bis zu 52 % reduziert werden. Gleichzeitig konnten *S. plymuthica*, *G. catenulatum* und *P. chlororaphis* bei Saatgutbehandlung den Befall mit *P. lingam* selbst bei starkem Befallsdruck ( $2 \times 10^5$  Sporen/Pflanze) im Vergleich zu *P. fluorescens* und den Kontrollen reduzieren. Doch nicht alle Pflanzen waren vor dem Befall mit *P. lingam* ausreichend geschützt.

#### 4.4 Biologische Bekämpfung von *V. dahliae* durch den Einsatz Antagonisten

Für die Überprüfung der Wirksamkeit antagonistischer Mikroorganismen *ad planta* war zunächst die Entwicklung eines geeigneten Inokulationstestsystems für *V. dahliae* notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurden *ad planta*-Untersuchungen mit *V. dahliae* mit Hilfe des Boniturschemas nach Zeise (1992) bonitiert. Holtschulte (1992) stellte fest, dass etwa drei bis

vier Wochen nach der Inokulation von *V. dahliae* unter Gewächshausbedingungen sich bei den inokulierten Rapspflanzen häufig vom Blattrand des ältesten Blattes ausgehend zunächst Chlorosen zeigten. Aber auch in der vorliegenden Untersuchung erschienen Befallssymptome von *V. dahliae* nach etwa 30 Tagen.

Die Bestimmung eines geeigneten Versuchszeitraumes ist für einen schnellen Routinetest zur Überprüfung der *ad planta*-Wirksamkeit der Antagonisten von Bedeutung. *V. dahliae* hat zwar keinen definitiv an ein bestimmtes Wachstumsstadium der Rapspflanzen gebundenen Infektionszeitpunkt (Holtschulte, 1992). Jedoch legte Zeise (1990) den gefährdeten Infektionszeitraum der Rapspflanzen von der Keimung bis zum Zeitpunkt des Rosettenstadiums fest. Aus diesem Grund wurde der *ad planta*-Untersuchungszeitraum auf die ersten 10 Wochen nach Pflanzenaufbau festgelegt.

Wie in den anderen Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten konnten auch in diesen Untersuchungen wieder die Antagonisten *S. plymuthica* und *P. chlororaphis* den Befall am stärksten vermindern. Sie konnten den *V. dahliae*-Befall bei 5% Mikrosklerotien im Durchschnitt um 26,6 % bzw. 35,6 % reduzieren. Kurze et al. (2001) konnte in Gewächshausversuchen nach Applikation von *S. plymuthica* eine Senkung des Befalls von *V. dahliae* um 18,5 % und *Phytophthora cactorum* um 33,4 % an Erdbeeren beobachten. Hökeberg et al. (1997) wiesen im Feldversuch eine starke Reduktion mit Hilfe von *P. chlororaphis* MA342 gegen *Drechslera teres* (78 %) und *Microdochium nivale* (80 %) an Weizensamen nach. Die antagonistische Wirksamkeit des Isolats *P. fluorescens* war *ad planta* etwas geringer als *S. plymuthica* und *P. chlororaphis* und das *Bacillus subtilis* bzw. *G. catenulatum* hatten keine Wirkung gegen den *V. dahliae*-Befall. In der Literatur wurde am häufigsten *Bacillus subtilis* und Stämme der *Gliocladium* Gattung z.B. *G. virens*, *G. roseum* und *Trichoderma* spp. als Antagonisten untersucht. Aber in der vorliegenden Arbeit konnte der *V. dahliae*-Befall nicht unterdrückt werden.

#### **4.5 Dosis-Wirkungsprinzip: Ein wichtiger Faktor in der biologischen Kontrolle phytopathogener Pilze**

Die Konzentration des Antagonisten, die des Pathogens und die Effizienz der einzelnen Untereinheiten, die miteinander in Wechselwirkung treten, bestimmt das Ausmaß der möglichen Pathogenkontrolle (Johnson, 1994). Eine Behandlung von Zuckerrübensaatgut mit

*Pseudomonas putida* in einer Konzentration von  $5 \times 10^7$  cfu/Saatkorn erzielte einen um 40-53 % geringeren Befallswert mit *Pythium ultimum* als eine Zelldichte von  $2 \times 10^8$  cfu/Saatkorn. Larena et al. (2003) stellten fest, dass es notwendig ist, *P. oxalicum* mit einer Rate von ca.  $10^6$ - $10^7$  cfu/g im Pflanzensubstrat und in der Rhizosphäre vor dem Verpflanzen anzuwenden, um eine Wirkung gegen *Fusarium* und *Verticillium* bei Tomaten zu erzielen.

Mit den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Antagonisten wie *S. plymuthica*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, und *G. catenulatum* wurden durch Applikation am das Saatgutes positive Ergebnisse im *in vitro*-Tests gegen *P. lingam* und *V. dahliae*-Befall evaluiert. Die Zelldichten von  $10^5$  bis  $10^7$  cfu/Saatkorn erzielten dabei eine stärkere Reduzierung des *P. lingam*-Befall auf Kotyledonen und am Stängel unter Gewächshausbedingungen. Durch Primingapplikation des Saatgutes von  $10^6$  bis  $10^7$  cfu/Saatkorn wurde gegenüber *V. dahliae* eine signifikante Reduktion beobachtet. Eine konzentrationsabhängige Wirkung des Isolats *P. chlororaphis* wurde an Rapspflanzen *in vitro* festgestellt, wobei das Optimum der Befallsreduktion von *V. dahliae* mit 35,6 % nach Applikation einer Zelldichte von  $10^6$  cfu/Saatkorn beobachtet werden konnte (Abb. 22 und 27 ). Mit *G. catenulatum* und *P. fluorescens* konnte keine Verringerung des *V. dahliae*-Befall festgestellt werden.

#### 4.6 Etablierung ausgewählter Antagonisten an dem Rapswurzel

Ein wirksamer Schutz der jungen Pflanzen vor bodenbürtigen pathogenen Pilzen setzt eine erfolgreiche Besiedlung des Saatgutes und des sich entwickelnden Wurzelsystems durch Antagonisten voraus (Weller, 1988). Die Antagonisten sollten sich gegenüber den natürlich vorkommenden Mikroorganismen in ausreichendem Maße durchsetzen und sich am Wurzelsystem vermehren können, um so einen Angriff der Pathogene durch Präsenz entgegen zu wirken (Elad & Chet, 1987). Da *V. dahliae* mit Infektionshyphen in die unverletzte Pflanzenwurzel eindringt, wurden in den vorliegenden Untersuchungen das Besiedlungsverhalten an der Wurzel und zusätzlich am Sprossabschnitt mit antibiotika-resistenten bakteriellen Mutanten der Antagonisten durchgeführt. Untersuchungen zum Besiedlungsverhalten verschiedener Mikroorganismen an der Pflanzenwurzel sind der Vergangenheit vielfach vorgenommen worden. Allerdings kann die Fähigkeit und das Ausmaß der Wurzelbesiedlung bei den verschiedenen Bakterien-Familien unterschiedlich sein (Milus & Rothrock, 1993).

In den eigenen Untersuchungen konnten nach Priming-Behandlung des Saatgutes mit den Antagonisten mit einer Applikationsmenge von  $1,2-4 \times 10^7$  der Bakterienisolaten *S. plymuthica* bzw. *P. chlororaphis* und *P. fluorescens* die Rapswurzel in hohem Maße besiedelt werden. Dabei zeigte sich unter Gewächshausbedingungen, dass 8 Tage nach Pflanzenaufwurf im Durchschnitt  $3,9 \times 10^7$  und nach 30 Tagen immerhin noch mit  $1,12 \times 10^6$  cfu/g Wurzel-FM reisoliert werden konnten (Tab. 13 und 14). Sasse (1997) fand mit einer Bakterien-Applikationsmenge von  $8 \times 10^5$  cfu/Rapskorn mit fluoreszierenden Pseudomonaden, dass sie im Durchschnitt nach 10 Tagen mit  $1,8 \times 10^6$  und nach 30 Tagen mit  $5,1 \times 10^5$  cfu/cm Wurzel reisoliert werden konnten. Brückner (1998) beobachtete, dass *P. fluorescens* in Konzentrationen von  $10^6$  bis  $10^8$  cfu/g Wurzel-FM am 7. Tag nach Aufwachen der Pflanzen auf  $10^4$  bis  $10^5$  cfu/g Wurzel-FM am Versuchsende nach 60 Tagen in der Rhizosphäre von Raps zurückgingen. Liljeroth et al. (1991) fanden eine starke Differenzen der Populationsdichte von Rhizosphärebakterien in verschiedenen Wurzelbereichen von Weizenkeimlingen. Mit zunehmendem Alter der Wurzelsegmente nahm die Populationsdichte der Bakterien zu und erreichte nach 8 Tagen ihr Maximum.

Die untersuchten Bakterienisolate der Arten *S. plymuthica* bzw. *P. chlororaphis* und *P. fluorescens* können als rhizosphärenkompetent bezeichnet werden, weil sie im Boden eine große Konkurrenzskraft besitzen und die Fähigkeit haben, sich in kürzester Zeit im ganzen Wurzelsystem auszubreiten. Damit haben sie einen erheblichen Vorteil gegenüber anderen bakteriellen oder pilzliche Antagonisten. Bei der Überprüfung der Fähigkeit zur Sprossbesiedlung ergab sich, dass der ermittelte Bakterienanteil von *P. chlororaphis* und *P. fluorescens* geringer war als an der Wurzel. Es wurden Lebendzellzahlen von durchschnittlich nur  $10^3$  bis  $10^4$  cfu/g oberirdischen Pflanzenabschnitten nachgewiesen (Tab. 15, 16). Auch aus Kotyledonen konnten keine Lebendzellzahlen von *S. plymuthica* festgestellt werden. Sasse (1997) fand Lebendzellzahlen der fluoreszierenden Pseudomonaden von durchschnittlich nur  $1,7 \times 10^4$  pro gesamten oberirdischen Pflanzenabschnitt. Heupel (1992) und Williams (1990) stellten ebenfalls fest, dass die fluoreszierenden Pseudomonaden in der Lage waren, den Spross teil zu besiedeln. Sikora et al. (1990) fanden nach einer Saatgutbehandlung mit dieser Bakteriengruppe am Hypokotyl, außerhalb des Rhizosphärenbereichs, fluoreszierende Pseudomonaden in unterschiedlicher Anzahl. Sie beschrieben die Fähigkeit der Pseudomonaden zur Hypokotylbesiedlung als einen entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Mikroorganismen, weil das Hypokotyl neben der Wurzel beim Durchstoßen der Bodendecke Angriffspunkte für pilzliche Pathogene bietet.



Bei der Untersuchung der Zusammensetzung der Rhizosphäre von Raps stellte Berg (1994) fest, dass 20 % der antifungisch wirkenden Mikroorganismen zur Art *B. subtilis* gehörten. Auch in der vorliegenden Arbeit gehörten *B. subtilis* und *Peanobacillus polymyxa* zu den bakteriellen Antagonisten mit guter antifungischen Wirksamkeit *in vitro* (Biotest I, II) und wurden aus diesem Grund ebenfalls auf ihre Fähigkeit zur Besiedlung von Spross und Wurzel untersucht. Scher et al. (1984) sagten jedoch aus, dass Gram-positive Bakterien keine starken Wurzelbesiedler sind.

In den vorliegenden Untersuchungen konnten nach Priming-Behandlung des Saatgutes mit *B. subtilis* und *P. polymyxa* mit einer Applikationsmenge von  $2-1,2 \times 10^6$  cfu/Saatkorn eine relativ starke Besiedlung der Wurzeloberfläche und in geringem Maße auch des oberirdischen Sprossteil durch die *Bacillus*-Isolate nachgewiesen werden. Aber die Besiedlung war gering im Vergleich zu den Bakterienisolaten *S. plymuthica* bzw. *P. chlororaphis* und *P. fluorescens*. Dabei zeigte sich unter Gewächshausbedingungen, dass sie nach 8 Tagen nach Pflanzenaufbau im Durchschnitt mit  $1,2 \times 10^5$  und nach 30 Tagen immerhin noch mit  $5,2 \times 10^4$  cfu/g Wurzel-FM reisoliert werden konnten (Tab. 13, 14, 15, 16). Auch Berg et al. (1996) bestätigen die Fähigkeit der *Bacillus* spp. zur Wurzelbesiedlung. Sie stellten fest, dass von *B. subtilis* in 28 Tagen der Wurzelspitzenabschnitt der ältesten Wurzel von *Photinia* am stärksten besiedelt wurde (Lebendzellzahlen von  $10^4-10^5$  cfu/g Wurzel-FM). Brückner (1998) fand in *in vitro* Versuchen, dass *B. subtilis* sich wie *P. fluorescens*, ausgehend von inokuliertem Saatgut in Konzentrationen von  $10^6$  bis  $10^8$  cfu/g Wurzel-FM 7 Tage nach Auflaufen der Pflanzen und von  $10^4$  bis  $10^5$  cfu/g Wurzel-FM am Versuchsende nach 60 Tagen in der Rhizosphäre von Raps etabliert hatte.

Es konnte ein Überblick über die bakterielle Besiedlung und die Gesamtzellzahl der verschiedenen Bakteriengruppen in der Rhizosphäre von Rapspflanzen unter Klimaschrank- und Gewächshausbedingung gewonnen werden. Eine durchschnittliche Besiedlungsdichte von  $1,74 \times 10^8$  cfu/g Wurzel-FM wurde ermittelt. Dieser Wert ist vergleichbar mit Ergebnissen von Kleeberger et al. (1983), die  $10^7-10^8$  Bakterien pro Gramm Wurzelfrischmasse für die Rhizosphäre von Gerste und Weizen ermittelten. Lambert et al. (1987) gaben für die Maisrhizosphäre  $10^8$  Bakterien pro Gramm Wurzelfrischmasse an. Berg (1996) ermittelte für die Rapsrhizosphäre eine durchschnittliche Bakterienzahl von ebenfalls  $1,5 \times 10^8$  cfu/g Wurzel-FM.

Das Pilz-Isolat *G. catenulatum* konnte sich über den gesamten Versuchszeitraum verglichen mit den Bakterienisolaten nicht in gleicher Dichte durchsetzen. Dabei erreichten die ermittelten cfu/g Wurzel-FM von *G. catenulatum* an der Wurzeloberfläche Lebendzellzahlen von durchschnittlich  $1,3 \times 10^5$  cfu/g Wurzel-FM im Gewächshaus, wenn die Pflanzen mit *V. dahliae* infiziert wurden, und von  $2,8 \times 10^5$  cfu/g Wurzel-FM, wenn die Pflanzen nicht mit *V. dahliae* infiziert wurden. Im Spross wurde der Pilz nie nachgewiesen. Zachow (2003) isolierte den Pilz aus der Erdbeerrhizosphäre mit einem Durchschnittswert über 2 Jahre von maximal  $\log_{10} 0,3 \times 10^5$  cfu/g FM.

Ein wichtiger Faktor ist die Besiedlung der Wurzel in Abhängigkeit vom Wirtsgenotyp, der durch seine Wurzelexudate die spezifische Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft beeinflusst (Shiomi et al., 1999). Dieser Rhizosphären-Effekt wird durch die von den Wurzeln abgegebenen Exsudate hervorgerufen. Bei Wurzelexsudaten handelt es sich um aktiv oder passiv von der Pflanze ausgeschiedene Stoffwechselprodukte wie Zucker, Aminosäuren, organische Säuren, höhere Fettsäuren und Vitamine (Hoffmann et al., 1985). Die Exsudate fördern das Wachstum der Bakterien in der Rhizosphäre, da sie ihnen eine attraktive Nahrungsquelle bieten.

#### 4.7 Wachstumsförderung

In Gewächshaus- und Feldversuchen konnte eine signifikante Steigerungen des Wachstums der Rapspflanzen und eine effektive Reduktion von *P. lingam* und *V. dahliae* durch die Antagonisten nachgewiesen werden. Eine direkte Förderung des Pflanzenwachstums erzielen Bakterien, insbesondere *P. fluorescens* und *S. plymuthica*, durch die Synthese verschiedener Phytohormone, wie z.B. Cytokinin, Gibberillin (Arshad & Frankenberger, 1991) oder Auxin (Indol-3-Essigsäure) (Kamensky et al., 2003), wie auch durch die Förderung der Phosphataufnahme der Pflanze (Muhammad & Frankenberger, 1991). Nach Applikation des *S. plymuthica* Stamms C48 wurden ebenfalls Ertragssteigerungen an Erdbeeren von durchschnittlich 296 % (*V. dahliae* infiziert) und 60 % (*P. cactorum* infiziert) gemessen (Kurze et al. 2001). Naseby et al. (2000) stellten auch für *Trichoderma*-Isolate eine signifikante Wachstumsförderung der Wurzelfrischmasse an Erbsenpflanzen fest.

Eine direkte Förderung des Pflanzenwachstums erzielten insbesondere *S. plymuthica*, *G.*

*catenulatum* und *P. chlororaphis* (Abb. 30). Diese Antagonisten erhöhten auch die Frischmasse der Rapspflanzen im Durchschnitt auf 43 % bis 53 %, bzw. die Trockenmasse um 21 % bis 27 %. Die Ergebnisse aus der Variante mit *P. fluorescens* ergab ein etwas anderes Bild. Nur mit  $10^7$  cfu/Samen wurde bei der Frisch- und Trockenmasse im Vergleich mit den Kontrollen ein signifikanter Unterschied verzeichnet, der bei den Konzentrationen von  $10^5$  bis zur  $10^3$  cfu/Samen nicht mehr festgestellt werden konnte. Eine Applikation mit fluoreszierenden Pseudomonaden steigerte die Auflauftrate von Gurken im Vergleich zur mit *Pythium ultimum* infizierten Kontrolle um 50% (Vogt & Buchenauer, 1997). Die Autoren zeigten eine Verbesserung der pflanzenwachstumsfördernden Wirkung verschiedener hormonbildender Stämme bei gleichzeitiger Inokulation des Bodens mit der jeweiligen Vorstufe des Hormons. Suslow & Schroth (1982b) konnten nach Applikation von *Pseudomonas* spp. als Saatgutbeschichtung eine signifikante Seigerung der Biomasse (Wurzeln und Triebe) von Zuckerrüben im Gewächshaus um 20 bis 69 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachten. Die maximale Steigerung der Frischmasse bei Raps lag zwischen 33 % und 80 %, bei Salat bei 51 % und für Zuckerrübe bei 8 % (Richter 2001). Obwohl Dolej und Bachow (1995) aus Kulturfiltraten der stationären Wachstumsphase von *Bacillus subtilis* verschiedene Auxinkonjugate isolierten, bei deren struktureller Untersuchung eine wachstumsfördernde Vorstufe von Auxin (Indol-3-Pyruvatsäure) identifiziert werden konnte, konnten in den vorliegenden Untersuchungen die Stämme von *Bacillus subtilis* und *Paenibacillus polymyxa* bei der Frisch- und Trockenmasse keine signifikante Unterschiede erreichen.

## 4.8 Feldversuche

### 4.8.1 Effekte der Antagonisten unter Feldbedingungen

Feldversuche wurden durchgeführt, um die Wirkung der Antagonisten zu prüfen. Die Wirkung von *S. plymuthica* und *G. catenulatum* an der Rapssort "Talent" gegen die Pathogene *P. lingam* und *V. dahliae* wurde über einen Zeitraum von 11 Monaten ausgewertet. In diesem Versuch wurde *S. plymuthica* als Priming-Behandlung des Saatgutes mit  $7,9 \times 10^6$  cfu/Saatkorn und *G. catenulatum* als Saatgutinkrustierung mit  $5,8 \times 10^5$  cfu/Saatkorn angewendet. Anschließend wurde das flüssige Insektizid Chinook und das pulvrige Fungizid DMM mit dem Wasser adsorbierenden Mineral Talkum im Pelletierapparat gebeizt. Bakterielle Zellen konnten durch Priming-Behandlung des Saatgutes in die Samen eindringen.

In diesem Versuch wurden der Befall von *P. lingam* auf Blattorgane, Wurzelhals und Stängel bonitiert, die Populationdynamik der Antagonisten, die Wachstumsförderung von Raps, der Befall mit *V. dahliae* und der Ertrag ausgewertet. In der vorliegenden Untersuchung verursachten die Antagonisten im Herbst eine signifikante Reduktion des *P. lingam* Befalls an Blattorgane. Am 3.11. wurde deutlich, dass die Fungizidapplikation den im Vergleich zur Kontrolle hohen *P. lingam* Befall gegenüber der reinen Antagonistenvariante noch mal reduzierte und der durchschnittliche Blattbefall in der Kontrolle betrug 121 Pyknidien/Pflanze und wurde auf 4,2 bzw. 24,9 je Pflanze reduziert (Abb.33). Die Befallsstärke (BSB) wurde über den Boniturzeitraum von 6,5 Monaten ermittelt. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen der unbehandelten Kontrolle und allen behandelten Varianten ermittelt und zwischen den Behandlungen kein signifikanter Unterschied ermittelt (Abb.34). Im Frühling und Sommer wurde eine signifikante Reduktion des Befalls am Wurzelhals und der Stängelfäule ermittelt (Abb. 37, 39). Über den weiteren Versuchszeitraum ermittelte maximale Boniturnwerte von 4,24 (Skala 1-9) liegen im mittleren bis geringen Befallsniveau. Erste Symptome am Wurzelhals wurden Anfang Mai erfasst. Der Befallswert in den Varianten S.p. und G.c. ohne Fungizidbehandlung und S.p.<sup>+</sup> und G.c.<sup>+</sup> mit Fungizidbehandlung im Herbst unterscheidet sich nicht. Alle antagonistischen behandelten Varianten setzten sich jedoch deutlich von der Kontrolle ab. Die Auswertung über den mittleren Befallswert bestätigt den signifikanten Unterschied zu den Kontrollparzellen. Der Unterschied in der Befallshäufigkeit zwischen Fungizidbehandelten und nur mit Antagonisten behandelten Parzellen besteht nur am ersten Boniturtermin im Mai. Der Unterschied zwischen behandelten Parzellen und den Kontrollparzellen wurde im Verlauf der Vegetationsperiode immer geringer. Ab Juni wurde zusätzlich der Stängelbefall ermittelt. Die über den Wurzelhals getroffenen Aussagen werden durch die ermittelten Befallswerte und die Befallshäufigkeit für den Stängelbefall bestätigt. Zwischen den behandelten Varianten war wieder kein Unterschied erkennbar und eine signifikante Reduktion gegenüber den Kontrollparzellen (Abb. 39). Der Einfluss der Antagonisten auf den Befall mit *V. dahliae* war gering im Vergleich zur Kontrolle. Eine deutliche Reduktion des *V. dahliae* Befalls konnte nicht nachgewiesen werden. Müller (2006) stellte ebenfalls fest, dass in Hohenlieth und Hovedissen (Versuchsstandorten) Effekt von *S. plymuthica* auf *V. dahliae* zu gering ausfielen. Kurze et al. (2001) konnte in verschiedenen Freilandversuchen an Erdbeeren die Wirkung von *S. plymuthica* bestätigen, und hier wurde eine Reduktion des Befalls zwischen 9,6 % (*Phytophthora cactorum*) und 24,2 % (*V. dahliae*) festgestellt.

Der Ernteverlust wurde durch Wurzelhallsbefall von 10-20% dokumentiert. Schramm (1989) berichtet von stark befallenen Einzelpflanzen mit Ertragsverlusten bis zu 65 %. Die Ergebnisse zeigten bei starkem Befallsauftreten der Erreger *P. lingam* und *V. dahliae* eine ertragssteigernde Wirkung von 2,9 bis zu 6,7 %, obwohl über 70% der Pflanzen mit Insekten, z.B. dem Großer Rapsstängelrüssler *Ceutorhynchus napi* und der Kohlschotenmücke *Dasineura brassica* befallen waren. Müller (2006) bestätigte eine Ertragsteigerung durch Anwendung von *S. plymuthica* von 2 bis 5 %.

Die Rhizosphäre stellt aufgrund des dort vorherrschenden Nährstoffangebotes ein bevorzugtes Habitat für Bodenmikroorganismen dar (Lynch, 1990). In der vorliegenden Arbeit wies die Gesamtzellzahl über den gesamten Vegetationsverlauf des Rapses relativ gleich bleibende Werte von durchschnittlich  $3,2 \times 10^8$  cfu/ g Wurzel-FM auf und sank nur während der Winterruhe der Pflanzen leicht ab. Berg (1994) ermittelte für die Rhizosphäre von Winterraps bakterielle Gesamtzellzahlen von durchschnittlich  $1,5 \times 10^8$  cfu/g Wurzel-FM. Die Betrachtung der Populationsentwicklung der antibiotika-resistenten Bakterien in der Rhizosphäre von Winterraps in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Pflanzen lässt vermuten, dass eine Population von  $7,9 \times 10^6$  Bakterien je inokuliertem Rapssamen ausreicht, um eine Besiedlung der Keimwurzel durch die applizierten Bakterien herbeizuführen. Im Laufe der weiteren Pflanzenentwicklung trat eine Abnahme der Zelldichte der Rhizosphärebakterien auf. Anfangs hohe Besiedlungsdichten reduzierten sich zum Versuchsende nach 11 Monaten im Entwicklungsstadium BBCH 87 auf Werte von  $2 \times 10^5$  cfu/g Wurzelfrischmasse. Diese Werte decken sich in wesentlichen mit denen anderer Autoren, die bakterielle Zelldichten an verschiedenen Kulturpflanzen in den Größenordnungen von  $10^3$  bis  $10^7$  cfu/g Wurzel-FM feststellten (Klopper et al. 1991). Müller (2006) beobachtete eine Zelldichte von *S. plymuthica* im Durchschnitt von  $4 \times 10^7$  cfu/g Wurzel-FM im Entwicklungsstadium Sechsstadium und von  $10^5$  cfu/g Wurzel-FM im Entwicklungsstadium Rosettestadium. Somit wurde das Priming hinsichtlich der Etablierung von *S. plymuthica* HRO-C48 in der Rapsrhizosphäre positiv bestätigt. Das Potential von  $8,5 \times 10^5$  Sporen von *G. catenulatum* je inokulierten Rapssamen war ausreichend, eine Besiedlung der Keimwurzel durch den applizierten Pilz herzuführen. Aber auch bei diesem Pilz sanken die Lebendkeimzahlen nach Aussaat ab, sicher auch weil in der Aussaatmaschine eine gewisse Menge der Trägersubstanz um das Saatkorn verloren wurde. Im Laufe der weiteren Pflanzenentwicklung trat eine Angleichung der Sporendichten in der Rhizosphäre auf. Die Populationsentwicklung des Pilzes wies bis zum Entwicklungsstadium BBCH87 (Samenreifen) einen deutlich sinkenden Trend auf.

## 5 Zusammenfassung

*Verticillium dahliae* var. *longisporum* und *Phoma lingam* gehören zu den wichtigsten Krankheitserregern beim Raps (*Brassica napus*). Eine chemische Bekämpfung ist nur gegen *P. lingam* möglich. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Wirksamkeit mikrobieller Antagonisten gegen *V. dahliae* und *P. lingam* in *in vitro* Tests, in Klimakammer- und Gewächshaus- und Feldversuchen untersucht werden. Zusammenfassend können folgende Ergebnisse genannt werden:

Sechs bakterielle Antagonisten (*Serratia plymuthica* C48, *Pseudomonas fluorescens* 1Re, *P. chlororaphis* MA342 *Bacillus subtilis* B2g und *Paenibacillus polymyxa* 1P1-2) und ein pilzlicher Antagonisten (*Gliocladium catenulatum* J1446) wurden zunächst *in vitro* getestet. In Dual-Kulturen erzeugten alle Antagonisten außer *P. fluorescens* Hemmzonen von 5-10 mm gegenüber dem Myzel bzw. den Pyknidiosporen von *P. lingam* und gegenüber Mikrosklerotien von *V. dahliae* bei 22°C. Während für diese Antagonisten eine Wirkung auch bei 10°C nachgewiesen werden konnte, bildete *B. subtilis* bei dieser Temperatur keine Kolonie aus. Lichtmikroskopische Untersuchungen belegten cytologische Effekte der Antagonisten und ihrer Kulturfiltrate auf die Hyphen und Koniden von *V. dahliae* bzw. *P. lingam*.

Durch Blattapplikation konnten alle Antagonisten, außer *B. subtilis*, den Befall der Rapskotyledonen mit *P. lingam* im Entwicklungsstadium BBCH 11/12 bis zu 14 Tage nach der Infektion reduzieren. *P. chlororaphis* erzielte einen Wirkungsgrad von 54 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Isolate *S. plymuthica*, *P. fluorescens* und *G. catenulatum* reduzierten den *P. lingam* Befall um 44-50 %. Die Hemmung des Befalls am Wurzelhals wurde an Jungpflanzen im Entwicklungsstadium BBCH14/15 geprüft. Dazu wurden die Pflanzen mit einer Antagonisten-Suspensionen von  $2 \times 10^5$  cfu/Pflanze behandelt und 2 Tage später mit dem Pathogen, ohne vorherige künstliche Verletzung unter Verwendung von Pyknidiosporen ( $2 \times 10^7$  cfu/ml) oder mit einem gewachsenen *P. lingam* Myzel an den Stängeln inokuliert. Nach 50 Tagen wurde der Befall bonitiert. *S. plymuthica* reduzierte den Befall um 53-93 %, *P. chlororaphis* um 26-89 % und *G. catenulatum* um 46-77%.

Da Umwelteinflüsse die Wirkung der mikrobiellen Antagonisten bei Blattapplikation im Feld erheblich reduzieren können, erschien es sinnvoll eine Saatgutbehandlung zu versuchen. Um

die Besiedlung der Pflanze verfolgen zu können, müssen die applizierten Mikroorganismen von anderen differenziert werden können. Deshalb wurden von den Bakterienisolaten stabile rifampicin-resistente Mutanten hergestellt. Im Dualkulturtest zeigten sie keine abweichenden Eigenschaften gegenüber den Wildstämmen. Eine einfache Saatgutbeizung ist bei Raps nicht möglich, da die anschließende Beizung von Insektiziden und Fungiziden die Antagonisten abtötet. Deshalb wurde ein sogenanntes Primingverfahren entwickelt, bei dem die Bakterien direkt ins Innere des Saatkorns positioniert werden. Der daraus resultierende Schutz vor äußerlichen Einwirkungen wirkte sich signifikant positiv auf die Lagerstabilität nur der Gram-negativen Zellen aus. Das Pilzisolat *G. catenulatum* wurde mit Gummi-Arabicum und Xanthan auf die Oberfläche des Saatkorns angebracht. Nach 60 Tagen wurde eine Sporendichte von  $7 \times 10^5$  cfu/Saatkorn ermittelt. Das Besiedlungsverhalten an Wurzel und Sprossteil wurde nach Auflauf der Rapspflanzen mit Hilfe Rifampicin-resistenter Mutanten verfolgt. Durch Priming wurden nur bei den Gram-negativen Isolaten nach 30 Tagen noch Dichten von  $>10^7$ /g Wurzelfrischmasse nachgewiesen, während für Gram-positive Isolate Inkrustierungsverfahren besser geeignet waren. Eine signifikante Reduktion des Befalls der Kotyledonen mit *P. lingam* wurde nur durch *S. plymuthica*, *P. chlororaphis* und *G. catenulatum* erzielt, wobei der Effekt dichtabhängig war und unter  $10^5$  cfu/Saatkorn keine statistisch abgesicherte Wirkung mehr erzielt wurde. Mit denselben Isolaten wurden ebenfalls gegen Stängelinfection signifikante Ergebnisse erzielt.

Der Befall mit *V. dahliae* wurde mittels des Boniturschemas nach Zeise erfasst. Während von den bakteriellen Isolaten wiederum nur *S. plymuthica* und *P. chlororaphis* eine signifikante Befallsreduktion verursachten, wurde mit *G. catenulatum* keine Wirkung in Gewächshaus und Klimakammerversuchen nachgewiesen.

Nur für *S. plymuthica* wurde eine signifikante Steigerung der Pflanzenmasse neun Wochen nach Aussaat ermittelt die auch bei Infektion der Pflanzen mit *V. dahliae* anhielt.

In einem Feldversuch am Standort Hohenschulen wurde die Wirkung von *S. plymuthica* (Priming mit  $7,9 \times 10^6$  cfu/Saatkorn) und *G. catenulatum* ( $8,5 \times 10^5$  cfu/Saatkorn) in der Saison 2005/2006 geprüft. Die Saatgutapplikation mit Antagonisten führte zu einer signifikanten Reduktion des Blattbefalls von 40 Pyknidien/Pflanze in den Kontrollen auf unter 20, wobei eine Fungizidbehandlung mit 0,7 l/ha Caramba® am 7. Oktober den Befall noch geringfügig, aber nicht signifikant weiter reduzierte (auf 10 Pyknidien/Pflanze). Der Befallswert für den

Wurzelhals wurde in allen Behandlungen von über 3 auf ca. 2 und der Befallswert Stängel von 2 in den Kontrollen auf 1,3-1,6 in den Behandlungen signifikant reduziert. Die Reduktion des Befallswerts bei *V. dahliae* war nicht signifikant. Während *S. plymuthica* eine signifikante Steigerung der Pflanzenmasse um ca. 40 % in der 10. Wochen nach Aussaat verursachte, war die Steigerung von ca. 25 % in den *Gliocladium* Parzellen nicht immer signifikant. Weder für den Ertrag noch für das TKG wurde ein Einfluss der Behandlungen nachgewiesen. Die durchschnittliche Zelldichte von *S. plymuthica* fiel von anfänglich  $>10^8$  cfu/g Wurzelfrischmasse im September auf ca.  $10^5$  zur Ernte ab. Die Abundanzen von *G. catenulatum* war in etwa unverändert über die gesamte Vegetationsperiode  $5 \times 10^4$  cfu/g Wurzelfrischmasse.

Ein Einsatz von *Serratia plymuthica* zur Saatgutbehandlung gegen *Phoma lingam* und *Verticillium dahliae* erscheint vielversprechend, da in Gewächshaus- und Klimakammerversuchen gegen beide Pathogene wiederholt eine signifikante Befallsreduktion nachgewiesen werden konnte. Im Feld ließ sich dieser Effekt wiederholen, aber nur bei *P. lingam* statistisch signifikant absichern. Weitere Versuche im Feld, eventuell mit künstlicher Infektion, müssen folgen, um die Effekte abzusichern.



## 6 Summary

*Verticillium dahliae* var. *longisporum* and *Phoma lingam* are the most important pathogens of oil seed rape (*Brassica napus*). Chemical control is possible only against *P. lingam*. The objective of this investigation was to evaluate the effect of microbial antagonists against *V. dahliae* and *P. lingam* in *in vitro* tests, in climate chambers and greenhouse trials and in one field test. The following results were obtained:

Six bacterial antagonists (*Serratia plymuthica* C48, *Pseudomonas fluorescens* 1Re, *P. chlororaphis* MA342 *Bacillus subtilis* B2g und *Paenibacillus polymyxa* 1P1-2) and one fungal antagonist (*Gliocladium catenulatum* J1446) were first tested *in vitro*. In dual cultures all antagonists except *P. fluorescens* caused inhibition zones of 5-10 mm against the mycelium or pycnidiospores of *P. lingam* and against microsclerotia of *V. dahliae* at 22°C. The effect was also measured at 10°C, however, *B. subtilis* did not produce colonies at this temperature. Lightmicroscopic investigations revealed cytolytic effects of the antagonists and of their culture filtrates on hyphae and conidia of *V. dahliae* or *P. lingam*.

In rape cotyledons infested with *P. lingam*, all of the antagonistic, except of *B. subtilis*, were able to reduce the disease after leave application until 14 days after infection in the developmental phase BBCH 11/12. *P. chlororaphis* reached control of 54 % compared to the untreated controls. The isolate *S. plymuthica*, *P. fluorescens* and *G. catenulatum* reduced *P. lingam* infestation by 44-50 %.

The reduction of the infestation of the root collar in BBCH14/15 was evaluated as well. Plants were treated with a suspension of the antagonists of  $2 \times 10^5$  cfu/plant and 2 days later inoculated with the pathogen. Without injury of the plant, they were inoculated either with a suspension of pycnidiosporea at  $2 \times 10^7$  cfu/ml or with *P. lingam* mycelium positioned on the stalk. After 50 days the infection was evaluated. *S. plymuthica* reduced the infection by 53-93%, *P. chlororaphis* by 26-89 % and *G. catenulatum* by 46-77%.

As environmental factors can reduce the efficiency of microbial antagonists when applied on leaves, it was considered reasonable to test seed application. In order to monitor the colonisation of the roots, one must be able to differentiate between the antagonist and other micro-organisms. Therefore stable rifampicin-resistant mutants were produced, which gave equal results in the dual test systems compared to the wild types. A simple seed treatment on

oil seed rape seeds is not possible, as the antagonists are subsequently killed by the application of insecticides and fungicides. A priming procedure was therefore developed which enable the positioning of the bacteria directly into the inner core of the seed. The resulting protection produced a better storage stability of all Gram-negative strains. The fungus *G. catenulatum* was applied together with Arabic gum and xanthan on the seed surface. After 60 days a spore density of  $7 \times 10^5$  cfu/seed was detected. The colonisation on roots and stalks was assessed after germination with the help of the rifampicin-resistant mutants. The priming resulted in a density of  $>10^7$ /g root fresh mass only with Gram-negative isolates after 30 days, whereas for Gram-positive isolates the simple seed treatment was superior. A significant reduction of the infestation of the cotyledones with *P. lingam* was achieved only with *S. plymuthica*, *P. chlororaphis* and *G. catenulatum*. The effect was density depended and below  $10^5$  cfu/seed no statistically significance was recorded. With the same isolates significant effects were assessed also of the infection of the stakes.

Infestation with *V. dahliae* was assessed using a schema following instructions of Zeise. Whereas of the bacterial isolates again *S. plymuthica* and *P. chlororaphis* gave significant control effects, *G. catenulatum* caused no reduction, neither in greenhouse nor in climate chamber trials.

Only for *S. plymuthica* a significant increase in plant biomass was recorded nine weeks after sawing, which was also recorded when the plants had been inoculated with *V. dahliae*.

In a field trial at Hohenschulen *S. plymuthica* (priming with  $7,9 \times 10^6$  cfu/seed) and *G. catenulatum* ( $8,5 \times 10^5$  cfu/seed) were tested in the season 2005/2006. The seed treatment with antagonists caused a significant reduction of the leave infection, reducing the number of pycnidia/plant of 40 in the controls to below 20 in the treatment. A fungicide treatment with 0,7 l/ha Caramba<sup>®</sup> on October 7 could reduce the infection further without a significant difference (to 10). The infection of the root collar was significantly reduced from an infestation index of 3 to appr. 2 and on the stalk the index dropped significantly from 2 in the controls to 1,3-1,6 in the treatments. The control of *V. dahliae* was not significant. *S. plymuthica* produced a significantly higher plant biomass increasing at 40% until week 10 after sawing. The increase by 25% obtained with *Gliocladium* was not significant. No effects were recorded on the final yield or the thousand corn weight. The mean cell density of *S. plymuthica* dropped from  $> 10^8$  cfu/g fresh root biomass in September to appr.  $10^5$  at harvest.

The abundance of *G. catenulatum* was more or less stable over the whole vegetation period with  $5 \times 10^4$  cfu/g fresh root biomass.

The use of *Serratia plymuthica* for seed treatment against *Phoma lingam* and *Verticillium dahliae* is promising considering that greenhouse and climate chamber trials produced significant control effects against both pathogens. In the field the significant control effects were obtained only against infection with *P. lingam*. Additional trials in the field will have to check again for significant effects, possibly in plots artificially infested with the pathogens.

---

## 7 Literatur

**Ahlers, D. 1987:** Untersuchungen über den Erreger der Krankhaften abreife an Winterraps. Gesunde Pflanzen 39: 375-383.

**Alabouvtte, C. & Brunin, B. 1970:** Recherches sur la maladie du colza due à *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et de Not. I. Rôle des restes de culture dans la conservation et la dissémination du parasite. Ann. Phytopathol. 2: 463-475.

**Alström, B. & Gerhardson, B. 1988:** Differential reactions of wheat and pea genotypes to root inoculation with growth-affecting rhizobacteria. Plant Soil 109:263-269.

**Amelung, D., Schulz, R. -R. & Daebler, F. 1996:** Einfluss der Fruchtfolge auf Rapskrankheiten. Raps 14: 52-55.

**Anonymus, 1997a:** <http://www.cbs.nl/ned/kfig/I1b0005c.htm>.

**Anonymus, 1997b:** [http://www.usda.gov/nass/fruit/pvg-bban/vegetables\\_annual\\_summary\\_01.17.97](http://www.usda.gov/nass/fruit/pvg-bban/vegetables_annual_summary_01.17.97).

**Arshad, M. & Frankenberger, W. T. JR. 1991:** Microbial production of plant hormones. In: Keister, D. L.; Cergan, P. B. (eds.), The Rhizosphere and Plant Growth, Kluwer Academic Publishers, S. 327-334.

**Baker, C. J., Stavely, J. R. & Mock, N. 1985:** Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Dis. 69: 770-772.

**Baker, R. & Griffin, G. J. 1995:** Molecular strategies for biological control of fungal plant-pathogens. Lewis Publishers, CRC Press. 153-182.

**Bakker, A. W. & Schippers, B. 1987:** Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas spp.*-mediated plant growth-stimulation. Soil Biol. Biochem. 19: 451-457.

**Barbetti, M. J. 1976:** The role of pycnidiospores of *Leptosphaeria maculans* in spread of blackleg disease. Aust. J. Exp. Agric. Animal Hus. 16: 911-914.

**Benhamou N., Gagné S., Quéré DL. & Dehbi L. 2000:** Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. Phytopathology 90, 45–56.

**Berg, G. 1994:** Charakterisierung der Rhizosphärebakterien von *Brassica napus L.* (Raps) und ihrer antifungischen Wirkmechanismen gegen *Verticillium dahliae* Kleb. Dissertation, Universität Rostock

**Berg, G. 1996:** Rhizobacteria of oilseed rape antagonistic to *Verticillium dahliae* var. longisporum STARK. Z. PflKrankh. Pflschutz 103: 20-30.

**Berg, G. & Ballin, G. 1994:** Bacterial antagonists to *Verticillium dahliae* Kleb. Phytopathology 141:99-110.

- Berg, G., Rokot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A. & Smalla, K. 2002:** Plantdependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3328-3338.
- Blakeman, J.P. & N. J. Fokkema 1982:** Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20: 167-192.
- Boerema, G.H. & van Kesteren, H. A. 1964:** The nomenclature of two fungi parasitizing *Brassica*. *Persoonia* 3: 17-28.
- Bowers, J. H. & Parke, J. L. 1993:** Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas after seed treatment with bacterial agents for biological control. *Phytopathology* 83:1466-1473.
- Bowers, J. H.; Nameth, S. T.; Riedel, R. M. & Rowe, R. C. 1996:** Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *Pratylenchus penetrans* and *P. crenatus*. *Phytopathology* 86:614-621.
- Broadbent, P., Bakker, K. F. & Waterworth, Y. 1971:** Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. biol. Sci.* 24: 925-944.
- Brown, A. G. P., Barbetti, M. J. & Wood, P. MCR. 1976:** Effect of benomyl on blackleg disease of rape in Western Australia. *Austr. J. Exp. Agric. Animal Hus.* 16: 276-279.
- Brunin, B. 1972:** Action en champ du benomyl contre *Leptosphaeria maculans* (desm.) Ces. et de Not., agent de la nécrose du collet de colza. *Phytiatrie-Phytopharmacie* 21: 143-150.
- Bokor, A., Barbetti, M. J., Brown, A. G. P., Macnish, G. C. & Wood, P. 1975:** Blackleg of rapeseed. *J. Agric. Western Australia* 16: 7-10.
- Brückner, S. 1998:** Möglichkeiten einer biologischen Kontrolle von *Verticillium dahliae* an Winterraps mit Hilfe antagonistischer Rhizosphärenbakterien. Dissertation, Universität Rostock.
- Buberl, C. & Hoffmann, G. M. 1992:** Neue Wege bei der Erfassung einer *Phoma*- Resistenz in Raps. *Raps* 10: 32-34.
- Busch, H. 1987:** Resistenzzüchtung bei 00-Winterraps. Arbeitstagung 1987 der „Arbeitsgemeinschaft der Saatzuchtleiter“ Irdning, Österreich, 101-113.
- Callan, N. W., Mathre, D. E. & Miller, J. B. 1990:** Bio-priming seed treatment for biological control of *Pythium ultimum* pre-emergence damping-off in sh2 sweet corn. *Plant Dis.* 74: 368-372.
- Campbell, R. 1994:** Biological control of soil-borne diseases: some present problems and different approaches. *Crop Protection* 13: 4-13
- Cernusko, R. 1996:** Entwicklung und Erprobung enzymatischer und immunologischer Nachweismethoden für *Verticillium dahliae* Kleb. im Raps (*Brassica napus* L.). Dissertation, Universität Göttingen.

- Cernusko, R. Garbe, V. & Wolf, G. 2000:** Ergebnisse eines Monitorings zur Bedeutung des Auftretens von *Verticillium* und *Phoma lingam* an Winterraps in der Bundesrepublik Deutschland.
- Chandelier, P. & Fotre-Muller, M. J. 1989:** "Pieds secs" du colzo. La lutte chimique est-elle interessante, *Phytoma* 413 :60-61.
- Chernin, L. & I. Chet. 2002:** Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests In: Burns, R. and Dick, R. (eds.). *Enzymes in the Environment*. Marcel Dekker Inc., New York, NY. pp. 171-225.
- Cunningham, G. H. 1927:** Dry-rot of swedes and turnips: its causes and control. New Zealand Dept. Agric. Bull. 133: 1-51.
- Daebeler, F. Amelung, D. & Engel, K. H. 1985:** Zur Verwechslungsmöglichkeit der durch *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. verursachten Wurzelfäule mit *Rhizoctonia solani* K. und *Verticillium dahliae* Kleb. *Nachr.-bl. PflSchutz DDR* 39:180-181.
- Daebeler, F. & Seidel, D. 1989:** Auswirkungen der Fruchtfolge auf Krankheitserreger des Winterrapses. *Raps* 3:130.
- Davies, J. M. L. 1986:** Diseases of oilseed rape. In: Scarisbrick, D.H. & Daniels, R.W. (eds.) *Oilseed rape*. London, UK: Collins, S. 195-236.
- De Bellis, P. & Ercolani, G. L. 2001:** Growth interactions during bacterial colonization of seedling rootlets. *Appl. Environm. Microbiol.* 67:1945-1948.
- Defaog, G. & Haas, D. 1990:** Pseudomonads as antagonists of soilborne plant pathogens: Modes of action and genetic analysis. In: Boolag, J.-M. & Stotzky, G. (eds.): *Soil Biochemistry*, Vol. 6, Marcel Dekker, New York und Basel, S. 249-291.
- Delwiche, P. A. 1980:** Genetic aspects of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) resistance in rapeseed (*Brassica napus*). Ph.D. Thesis, Univ. of Wisconsin, Madison, 144 S.
- Delwiche, P. A., & Williams, P. H. 1979:** Screening for resistance to blackleg of crucifers in the seedling stage. *Cruciferae Newsletter* 4: 24.
- Dolej, S. & H. Bochow 1995:** Phytohormone als Stoffwechselprodukte phytosanitär effektiver *Bacillus subtilis* Isolate und ihre Induktor-Wirkung für pflanzliche Resistenz. *Phytomedizin. Mitteilungen der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft e. V.*, 25. Jahrgang, 3: 24-25.
- Domsch, K. H.; Gams, W. & Anderson, T. H. 1993:** *Compendium of soil fungi*. IHW-Verlag, S. 836-839.
- Duamkhamanee, R. 1996:** Untersuchungen zur Sporulation und Überdauerung von *Phoma lingam* (Teleomorph: *Leptosphaeria maculans*) an zwei Standorten mit unterschiedlichem Befallsdruck. Dissertation, Universität-Geasmothochschule Kassel.

- Dutta, B. K. 1981:** Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control of *Verticillium* wilt. Plant and Soil 63:209-216.
- Elad, Y. & Chet, I. 1987:** Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. Am. Phytopath. Soc. 77: 190-195.
- Emmert, E. A. B. & Handelsmann, J. 1999:** Biocontrol of plant disease: a Grampositive perspective. FEMS Microbiol. Lett. 171:1-9.
- Engelhard, A. W. 1957:** Host index of *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth. (including *Verticillium dahliae* Kleb.) Plant Disease Rep. Suppl. 244: 23-49.
- Evans, I. R. 1988:** Blackleg of canola. Alberta Agriculture Agrifax, Agdex 149: 623-633.
- Feser, M. 1992:** Die Integration chemischer Pflanzenschutzmaßnahmen gegen *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. (Imperfektstadium *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm.), dem Erreger der Wurzelhals- und Stengelfäule an Winterraps. Dissertation TU München-Weihenstephan.
- Fitt, B. D. L., Gladders, P. Turner, J.A., Sutherland, K. G. Welham, S. L., & Davies, J. M. 1997:** Prospects for developing a forecasting scheme to optimise use of fungicides for disease control on winter oilseed rape in the UK. Aspects of Appl. Biol. 48: 135-142.
- Frauen, M. 1992:** Raps: Resistenzzüchtung macht Fortschritte. Pflanzenschutz-Praxis 92: 29-31.
- Fravel, D. R.; Kim, K. K. & Papavizas, G. C. 1987:** Viability of microsclerotia of *Verticillium dahliae* reduced by a metabolite produced by *Talaromyces flavus* Phytopathology 77:616-619.
- Fravel, D. R. 1988:** Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Ann. Rev. Phytopathol. 26:75-91
- Gladders, P. & Musa, T. M. 1979:** The development of *Leptosphaeria maculans* in winter oilseed rape and its implication for disease control. Br. Crop Protection Conf. - Pests and Diseases 129-136
- Gabrielson, R. L., Mulanax, M. W., Matsuoka, K., Williams, P. H., Whiteaker, G. P. & Maguire, D. 1977:** Fungicidal eradication of seedborne *Phoma lingam* on crucifers. Pl. Dis. Rep. 61: 118-121.
- Garbe, V. 1994:** Raps: Kosten sparen über die Sorte. DLG-Mitteilungen 7: 18-21.
- Garbe, V. 2000:** Investigations on fungicide application in oilseed rape in systems of integrated pest management. IOBC/WPRS Bulletin 23: 197-202.
- Garber, R. H. & Houston, B. R. 1966:** Penetration and development of *Verticillium albo-atrum* in the cotton plant. Phytopathology 56:1121-1126.
- Gasoni, L., Cozzi, J. & Kobayashi, K. 1998:** Survival of potential biocontrol bacteria in various formulations and their ability to reduce radish damping-off caused by *Rhizoctonia*

*solani*. Plant Diseases and Protection 105: 41-48.

**Gladders, P. & Symonds, B.V. 1995:** Occurrence of canker (*Leptosphaeria maculans*) in winter oilseed rape in eastern England, 1977-1993. IOBC/WPRS Bulletin 18: 1-11.

**Gugel, R. K. & Petrie, G. A. 1992:** History, occurrence, impact and control of blackleg of oilseed rape. Can. J. Plant Pathol. 14: 36-45.

**Hammerschmidt, R. & Kuc, J. 1995:** Induced Resistance to Disease in Plants. Dordrecht: Kluwer. 182 S.

**Hammond, K. E. & Lewis, B.G. 1987:** The establishment of systemic infection in leaves of oilseed rape by *Leptosphaeria maculans*. Plant Pathol. 36: 135-147.

**Hammond, K. E. & Lewis, B. G. & Musa, T. 1985:** A systemic pathway in the infection of oilseed rape plants by *Leptosphaeria maculans*. Plant Pathol. 34: 357-365.

**Handelsmann, J. & Stabb, E. V. 1996:** Biocontrol of soil-borne plant pathogens. The Plant Cell, 8:1855-1869.

**Heale, J. B. 1988:** *Verticillium* spp. The cause of vascular wilts in many species. In: Siduh, G. S. (ed.): Genetics of Plant Pathogenic Fungi. London, San Diego, 291-312.

**Henderson, M. P. 1918:** The blackleg disease of cabbage caused by *Phoma lingam* (Tode) Desm. Phytopathology 8: 379-431

**Henni, J. E. 1988:** Evaluation of the effectiveness of certain antagonistic fungi against *Verticillium dahliae* Kleb. Cryptogamie, Mycology 8:203-207.

**Heppner, C. & Heitefuß, R. 1996:** Wenn der Raps zu früh abreift. DLG-Mitteilungen 12:46-47

**Heupel, M. 1992:** Biologische Bekämpfung bodenbürtiger Wurzelbranderreger der Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima* Doell) durch den Einsatz mikrobieller Antagonisten. Dissertation, Universität Göttingen.

**Hill, C. B. & Williams, P. H. 1988:** *Leptosphaeria maculans*, cause of blackleg of crucifers. In: Williams, P.H. & Ingram, D.S. (eds.): Adv. Plant. Pathol. 6: 169-174

**Hoffmann, G. M.; Nienhaus, F.; Schönbeck, F.; Weltzien, H. C. & Wilbert, H. 1985:** Lehrbuch der Phytomedizin. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

**Hökeberg, M., Gerhardson, B. & Johnsson, L. 1997:** Biological control of cereal seed-borne diseases by seed bacterization with greenhouse-selected bacteria. European J. Plant Pathology 103:25-33.

**Holtshulte, B. 1992:** Untersuchungen zur Biologie und Bedeutung von *Verticillium dahliae* Kleb. und *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. (Anamorph: *Phoma lingam* [Tode ex Fr.]) innerhalb des Erregerkomplexes der krankhaften Abreife von Raps. Dissertation, Universität Göttingen.



- Horing, H. 1986:** Krankhafte Abreife-Spätschäden durch *Phoma lingam* und/oder *Verticillium dahliae*, Raps, 4 Jg. 2: 83-85.
- Horiuchi, S.; Hagwara, H. & Takeuchi, S. 1990:** Host specificity of isolates of *Verticillium dahliae* towards cruciferous and solanaceous plants. In: Hornby, D. (ed.): Biological Control of Soil-borne Pathogens. C. A. B. International, Wallingford, Oxon, UK, 285-299.
- Howell, C. R. & Stipanovic, R. D. 1995:** Mechanisms in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*-induced cotton seedling disease by *Gliocladium virens*: antibiosis. *Phytopathology* 85: 469-472.
- Huber, J.; Bochow, H. & H. Jung 1987:** Selektion und biologische Herstellung von Kulturlösungen mikrobieller Antagonisten zur Unterdrückung phytopathogener Bodenpilze. *J. Bas. Microbiol.* 27, 497:503
- Huges, W. 1933:** A study of *Phoma lingam* (Tode) Desm., and of the "Dry Rot" it causes, particularly in swede turnips. *Scient. Proc., R.D.S., Vol. 20, No. 34.*
- Humpherson-Jones, F. M. & Burchill, R. T. 1982:** Chemical suppression of the sexual stage of *Leptosphaeria maculans* on oilseed rape and turnip seed crop straw. *Ann. Appl. Biol.* 100: 281-288.
- Issac, I. 1967:** Speciation in *Verticillium*. *Ann. Rev. Phytopath.* 5: 201-222.
- Jackson, M. A. & Schisler, D. A. 1995:** Liquid culture production of microsclerotia of *Colletotrichum truncatum* for use as bioherbicidal propagules. *Mycol. Res.* 99: 879-884.
- Johanson, K. B. 1994:** Dose-response relationships and inundative biological control. *Phytopath.* 84: 780-784.
- Jones, K. A., and Burges, H. D. 1998:** Technology of formulation and application. In: *Formulation of Microbial Biopesticides*, Beneficial Publishers, Dordrecht, 7-27.
- Jones, R. W. & Pettit, R. E. 1987:** Variation in sensitivity among anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* to the antibiotic gliotoxin. *Plant Dis.* 71: 34-36.
- Kalbe, C., Marten, P. & Berg, G. 1996:** Members of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape. *Microbiol. Res.* 151: 433-439.
- Kamensky, M., Ovndis, M., I. Chet, I. & L. Chernin, L. 2003:** Soil-borne strain IC 14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases. *Soil Biology & Biochemistry.* 35: 323-331.
- Kienath, A. P., Fravel, D. R. & Papavizas, G. C. 1991:** Potential of *Gliocladium roseum* for biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 81: 644-648
- Kharbanda, P. D. & Dahiya, J. S. 1990:** A metabolite of *Penicillium verrucosum* inhibitory to growth of *Leptosphaeria maculans* and *Rhizoctonia solani*. *Can. J. Plant Pathol.* 12: 335
- Kim, K. K.; Fravel, D. R. & Papavizas, G. C. 1988:** Identification of a metabolite produced

by *Talaromyces flavus* as glucose oxidase and its role in the biocontrol of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 78: 488-492.

**Kleeberger, A.; Carstorp, A. H. J. & Klinmüller, W. 1983:** The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to gram-negative bacteria. *Arch. Microbiol.* 136:306-311.

**Kloepper, J. W.; Schroth, M. N. & Miller, T. D. 1980:** Effects of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70:1078-1082.

**Kloepper, J. W. 1991:** Development of in vivo assays for prescreening antagonists of *Rhizoctonia solani* on cotton. *Phytopathology* 81: 1006-1013

**Kloepper, J.W.; Lifhitz, R. & Zablutowicz, R. M. 1989:** Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Tibtech* 7: 39-44.

**Knappe, C. 1994:** Einsatz von *Xanthomonas maltophilia* zur biologischen Bekämpfung von *Verticillium dahliae* Kleb. und *Rhizoctonia solani* Kühn an Winterraps. Dissertation, Universität Rostock.

**Krüger, W. 1982:** Die Wurzelhals- und Stängelfäule des Rapses, verursacht durch *Phoma lingam* (stat. gen. *Leptosphaeria maculans*), eine schwer bekämpfbare Krankheit. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 89, 498-507.

**Krüger, W. 1986:** *Verticillium dahliae* Kleb., Auftreten und Beurteilung bei Raps in Schleswig-Holstein. *Raps* 4, 14-16.

**Kruse, T. 2003:** Epidemiologie, Bedeutung und integrierte Bekämpfungsmöglichkeiten von *Leptosphaeria maculans* (*Phoma lingam*) sowie weiterer pilzlicher Krankheitserreger im Schleswig-Holsteinischen Winterrapsanbau, Dissertation Universität Kiel

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

**Kutcher, H. R., Van Denberg, C.G.J. & Rimmer, S.R. 1993:** Variation in pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* on Brassica spp. based on cotyledon and stem reactions. *Can. J. Plant. Pathol.* 15: 253-258.

**Lambert, B.; Frederik, L.; Van Rooyen, L.; Grossele, F.; Papon, Y. & Swings, J. 1987:** Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Appl. Environment. Microbiol.* 53: 1866-1871.

**Larena, P.; Sabuquillo, P.; Melgarejo & De Cal. A. 2003:** Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field condition, *J. Phytopath.* 151: 507-512.

**Leben, S. D.; Wadi, J. A. & Easton, G. D. 1987:** Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 77: 1592-1595.

**Leeman, M., Van Pelt, J. A., Hendriks, M. J., Scheffer, R. J., Bakker, P. A. H. M. &**

- Schippers, B. 1995:** Biocontrol of *Fusarium* wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* strain WCS374. *Phytopathology* 85: 1301-1305.
- Lemanceau, P. & Alabouvette, C. 1991:** Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. *Crop Prot.* 10: 279-286.
- Lewis, J. A. 1991:** Formulation and delivery systems of biocontrol agents with emphasis on fungi. In: *The Rhizosphere and Plant Growth*. D. L. Keister and P. B. Cregan, (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 279-287.
- Lewis, J. A. & Lumsden, R. D. 2001:** Biocontrol of damping-off of greenhouse crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma spp.* *Crop Protection* 20: 49-56.
- Liljeroth, E., Burgers, S. L. G. E. & Van Veen, J. A. 1991:** Changes in bacterial populations along roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Biol. Fert. Soils* 10: 276-280.
- Lindenberg, H. 2001:** Fungizideinsatz in Winterraps. 19: 64-69.
- Loeffler, W., Tschen, J. S.- M., Vanittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T. -F. & Wu, T.-G. 1986:** Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3, a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* 115: 204-213.
- Lottmann, J., Heuer, H., Smalla, K. & G. Berg. 1999:** Influence of transgenic T4-lysozyme-producing plants on beneficial plant associated bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29: 365-377.
- Lumsden, R. D., Lewis, J. A. & Fravel, D. R. 1995:** Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. In: *Biorational Pest Control Agents Formulation and Delivery*. F. R. Hall and J. W. Barry (eds.) American Chemical Society, Washington, DC, 166-182.
- Lynch, J. M. (ed.) 1990:** *The Rhizosphere*. Wiley-Interscience Publication, Chichester. 458 S.
- Mao, W., Lewis, J. A., Hebbar, P. K. & Lumsden, R. D. 1997:** Seed treatment with a fungal or a bacterial antagonist for reducing corn damping-off caused by species of *Pythium* and *Fusarium*. *Plant Dis.* 81: 450-454.
- Marois, J. J., Johnson, S. A., Dunn, M. T. & Papavizas, G. C. 1982:** Biological control of eggplant in the field. *Plant Disease* 66: 1166-1168.
- Mc Intyre, J. L. & Press, L. S. 1991:** Formulation, delivery systems and marketing of biocontrol agents and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). In: D. L. Kleister and P. B. Cregan (eds.). *The Rhizosphere and Plant Growth*. 289-295.
- McGee, D. C. & Emmett, R. W. 1977:** Blackleg (*Leptosphaeria maculans* (desm.)) Cs. et de Nort. Of rapeseed in Victoria: Crop losses and factors which affect disease severity. *Austr. J. Agric. Res.* 28: 47-51.
- McGee, D. C. & Petrie, G. A. 1979:** Seasonal patterns of ascospore discharge by *Leptosphaeria maculans* in relation to blackleg of oilseed rape. *Phytopathology* 69: 586-589

- Merriman, P. R., Price, R. D., Kollmorgen, J. F., Piggott, T. & Ridge, E. H. 1974:** Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Austr. J. Agric. Res.* 25: 219-226
- Milus, E. A. & Rothrock, C. S. 1993:** Rhizosphere colonization of wheat by selected soil bacteria over diverse environments. *Can. J. Microbiol.* 39: 335-341.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Ophir, Y. & Beer, S. V. 1996:** Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environmental conditions. *Phytopathology* 86: 856-863.
- Muhammad, A. & Frankenberger, W. T. 1991:** Microbial production of plant hormones. In: Keister, D. L.; Cergan, P. B. (eds.), *The Rhizosphere and Plant Growth*, Kluwer Academic Publishers, 327-334.
- Müller, E. & Tomasevic, G. S. 1957:** Kulturversuche mit einigen Arten der Gattung *Leptosphaeria* Ces. et de Not. *Phytopath. Z.* 29 : 297-294
- Müller, H. 2006:** Novel concepts in biological plant protection on the basis of the biological control agent *Serratia plymuthica* HRO-C48. Dissertation, Universität Rostock.
- Naseby, D. C.; Pascual, J. A. & Lynch, J. M. 2000:** Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *J. Appl. Microbiol.* 88: 161-169.
- Ndimande, B. 1976:** Studies on *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. and dry rot on oilseed rape, *Brassica napus* (L.) var. *oleifera* Metzger. Thesis Agric. College of Sweden, Uppsala, Sweden.
- Neill, J. C. 1929:** Dry-rot of swedes. Some field observations and experiments on control. *J. Agric.* 39: 86-93.
- Noga, G. A. Stindt & Lenz 1990:** Auswirkungen von Tensidbehandlungen auf die Anfälligkeit von *Phaseolus vulgaris* L. und *Brassica oleracea* var. *gongylodes* L. gegenüber *Botrytis cinerea*. *Gartenbauwissenschaft* 55: 97-103.
- Papavizas, G. C. & Lewis, J. A. 1989:** Effect of *Gliocladium* and *Trichoderma* on damping-off and blight of snapbean caused by *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse. *Plant Pathol.* 38: 277-286.
- Parke, J. L., Rand, R. E., Joy, A. E. & King, E. B. 1991:** Biological control of *Pythium* damping-off and *Aphanomyces* root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P. fluorescens* to seed. *Plant Dis.* 75: 987-992.
- Paul, V. H. & Günzelmann, A. 1989:** Fußkrankheiten und Fruchtfolgekrankheiten-Ein Problem für den Anbau von Körnerapps, Raps, 7. Jg. 1: 24-27.
- Paul, V. H. 1990:** Der Lebenszyklus von *Verticillium dahliae* Kleb., dem Erreger der *Verticillium*-Stengelfäule des Rapses. *Raps*, 8: 196-199.
- Paul, V., Gerdiken, K. J. & Günzelmann, A. 1991:** Neue Erkenntnisse über die Reaktion

von 00- Sorten und die Wirkung von Fungiziden auf die Wurzelhals- und Stengelfäule des Winterrapses. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 43: 82-92

**Petrie, G. A. 1978:** Occurrence of a highly virulent strain of blackleg (*Leptosphaeria maculans*) on rape in Saskatchewan (1975-77). Can. Plant. Dis. Survey 58: 21-25.

**Petrie, G. A. 1979:** Prevalence of a highly virulent strain of *Leptosphaeria maculans* (blackleg) in seed samples of rape and turnip rape produced on Western Canada in 1976 and 1977. Can. J. Plant Sci. 59: 899-901.

**Petrie, G. A. 1982:** Blackleg of rapeseed (canola) caused by *Leptosphaeria maculans*: interactions of virulent strains and implications for biological control. Can. J. Plant Pathol. 4: 309 (Abstr.).

**Petrie, G. A. 1995:** Effect of chemicals on ascospore production by *Leptosphaeria maculans* on blackleg-infected canola stubble in Saskatchewan. Can. Plant Dis. Surv. 75: 45-50

**Pflanzenschutzgesetz-PfSchG[15. 09.1986]:** Gesetz zum Schutz der Kulturpflanzen. Erster Abschnitt, Allgemeine Bestimmungen, § 1, Zweck.

**Philipp, W. -D., 1988:** Biologische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.

**Powell, K. A. 1993:** The commercial exploitation of microorganisms in agriculture. In: Exploitation of Microorganisms. Jones, D. G. (ed.) Chapman & Hall, London, 441-459.

**Rawlinson, C.J., Muthyalu, G. & Caley, G.R. 1984:** Fungicide effects on light leaf spot canker, crop growth and yield of winter oilseed rape. J. agric. Sci. Camb. 103: 613-628.

**Reyes, A. A.; Dirks, V. A. 1985:** Suppression of *Fusarium* and *Pythium* pea root rot by antagonistic microorganisms. Phytopathology 66: 23-29.

**Richter, I. 2001:** Entwicklung und Bewertung verschiedener Formulierungen von Rhizobakterien für den biologischen Pflanzenschutz. Diplomarbeit, Universität Rostock.

**Sasse, A. 1997:** Untersuchungen zur biologischen Bekämpfung des Rapswelkeerreger (*Verticillium dahliae* Kleb.) durch den Einsatz mikrobieller Antagonisten. Dissertation Univ. Göttingen. 133 pp

**Scher, F. M.; Ziegler, J. S. & Klopfer, J. W. 1984:** A method for assessing the root colonizing capacity of bacteria on maize. Can. J. of Microbiol. 30: 151-157.

**Schlegel, H. G. 1985:** Allgemeine Mikrobiologie. Georg-Thieme- Verlag, Stuttgart.

**Schnathorst, W. C. 1981:** Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: Mace, M. E.; Bell, A.A.; Beckman, C.H. (eds.) Fungal Wilt Diseases of Plants. Academic Press, New York, S. 81-111.

**Scholte, K. S. & Jacob, J. J. 1989:** Synergistic interactions between *Rhizoctonia solani* Kühn, *Verticillium dahliae* Kleb., *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus neglectus* (Rensch) Chitwood & Oteifa, in potato. Potato Research 32: 387-396.

- Schramm, H. 1989:** Zur Epidemiologie von *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et de Not. (Imperfektstadium *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm.), dem Erreger der Wurzelhals- und Stengelfäule an Winterraps als Grundlage eines integrierten Pflanzenschutzes. Dissertation. TU München-Weihenstephan.
- Schreiber, L. R. & Green, R. J. 1963:** Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* inhibited by soil fungistatic principle. *Phytopathology* 53: 260-264.
- Schreiber, L. R.; Gregory, G. F.; Krause, C. R. & J. M. Ichida 1988:** Production, partial purification, and antimicrobial activity of novel antibiotic produced by *Bacillus subtilis* isolated from *Ulmus americana*. *Can. J. Bot.* 66: 2338-2346.
- Schuster, W. Scheibert-Böhm, F. & Schlösser, E. 1980:** Untersuchungen zum Befall durch *Phoma lingam* (Tode ex. Fr.) Desm. bei Winterraps. *Z. Acker- und Pflanzenbau* 149: 433-446.
- Shah-Smith, D. A. & Bruns, R. G. 1996:** Biological control of damping-off of sugar beet by *Pseudomonas putida* to seed pellets. *Plant Pathology*. 45:572-582.
- Shiomi, Y., M. Nishiyama, M., T. Onizuka, T. & Marumoto, T. 1999:** Comparison of bacterial community structures in the rhizoplane of tomato plants grown in soils suppressive and conducive towards bacterial wilt. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3996-4001
- Sikora, R. A., Bodenstein, F. & Nicolay, R. 1990:** Einfluss der Behandlung von Rübensaatgut mit Rhizosphärebakterien auf den Befall durch Pilze der Gattung *Pythium*. I: Antagonistische Wirkung verschiedener Bakterienisolate gegenüber *Pythium spp.* *J. Phytopathol.* 129: 111-120.
- Sivan, A. & Chet, I. 1992:** Microbial control of plant diseases. In: *Environmental Microbiology*. Mitchell, R. (ed.) Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 335-354.
- Smith, H. C. 1956:** *Leptosphaeria napi*, the perithecial form of *Phoma lingam* causing dry-rot disease of Brassica. *New. Zeal. Sci. Rev.* 14: 116-117.
- Smith, H. C. & Sutton, B. C. 1964:** *Leptosphaeria maculans* the ascogenous state of *Phoma lingam*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 47: 159-165.
- Stanley, R., Brown, M., Poole, N. Rogerson, M., Sigeo, D. C., Knight, C., Ivuin, C. C., Epton, H.A.S. & Leifert, C. 1994:** Biocontrol of postharvest fungal diseases on dutch white cabbage by *Pseudomonas* and *Serratia* antagonists in storage trials. *Plant Pathol.* 43: 605-611.
- Suslow, T. V. & Schroth, M. N. 1981:** Bacterial culture preservation in frozen and dry-film methylcellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 872-877
- Suslow, T. V. & Schroth, M. N. 1982:** Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. *Phytopathology* 72: 111-115.
- Taylor, A. G. & Harman, G. E. 1990:** Concepts and technologies of selected seed

treatments. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 321-329.

**Thürwächter, F. 1995:** Zum Auftreten und zur Bedeutung verschiedener Rapskrankheiten in Norddeutschland und zur Wirtschaftlichkeit von Fungizidmaßnahmen in Winterraps (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). *Gesunde Pflanzen*, 47: 217-221.

**Tilcher, R 1996:** Untersuchungen zur Biologischen Bekämpfung des Falschen Mehltaus der Weinrebe (*Plasmopara viticola* (Berk.& Curt.) Berl.& de Toni) durch bakterielle Antagonisten. Dissertation, Universität Göttingen.

**Tjamos, E. C., Rowe, R.C., Heale, J. B. & Fravel, D. R. 2000:** *Advances in Verticillium Research and Disease Management*. APS Press, St. Paul, Minn.

**Vogt, W. & Buchenauer, H. 1997:** Enhancement of biological control by combination of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* strains and resistance inducers against damping off and powdery mildew in cucumber. *J. Plant Diseases Protection* 104: 272-280.

**Volke, B. 1999:** *Leptosphaeria maculans*, der Erreger der Wurzelhals- und Stengelfäule an Raps: Verbreitung verschiedener Pathogenitätsgruppen in Europa, Quantifizierung des Befalls und Schadwirkung im Freiland. Dissertation, Universität Göttingen.

**Wadi, J. A. & Eston, G. D. 1985:** Control of *Verticillium dahliae* by coating potato seed pieces with antagonistic bacteria. In: Parker, C. A.; Rovira, A. D.; Moore, K. J. und Wong, P. T. W. (eds.): *Ecology and Management of Soil-borne Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society, St. Paul, 134-136.

**Weber, E. & Blfholder, H. 1990:** Erläuterungen zu den BBCH-Dezimal-Codes für die Entwicklungsstadien von Mais, Raps, Faba-Bohne, Sonnenblume und Erbse - mit Abbildungen. *Gesunde Pflanzen*, 42: 308-321.

**Weller, D. M. & Cook, R. J. 1983:** Suppression of take-all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73: 463-469.

**Weller, D. M. 1988:** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 379-407.

**Whipps, J. M. 1997:** Ecological considerations involved in commercial development of biological control agents for soil-borne diseases. In: Van Elsas, J.D., Trevors, J. T. and Wellington, E. M. H. (eds.) *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hongkong, 525-545.

**Wilhelm, S. 1955:** Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* 45:180-181.

**Williams, P. H. 1990:** Biologische Bekämpfung von *Microdochium nivale* (Fries.) comb. nov. (Syn. *Gerlachia nivalis* (Ces. ex Sacc.) W. Gams & E. Müller) durch mikrobieller Antagonisten. Dissertation, Universität Göttingen.

**Williams, P. H. 1992:** Biology of *Leptosphaeria maculans*. *Can. J. Plant Pathol.* 14: 30-35

**Wilson, D. O., Jr. & Mohan, S. K. 1992:** Effect of seed moisturization and fungicide

treatment on final stand of low vigor Shrunken-2 sweet corn inbreds. J. Prod. Agric. 5:510-512.

**Wilson, D. O., Jr., Mohan, S. K., Knott, E. A. & Shafii, B.** 1993: Evaluation of fungicide seed treatments for Shrunken-2 "Supersweet" sweet corn. Plant Dis. 77:348-351.

**Winkelmann, G., Allagaier, H., Lupp, R. & G. Jung** 1983: Iturin A<sub>L</sub>- a new long chain iturin possessing an unusual high content of C<sub>16</sub>-b-amino acids. J. Antibiot. 36:1451-1457.

**Wittmann, G.** 1971: Boden und *Verticillium*-Welke des Hopfens. Bayer. Landw. JB. 48:206-236.

**Wong, P. T. W & Baker, R.** 1984: Suppression of wheat take-all and *Ophiobolus* patch by fluorescent pseudomonads from a *Fusarium*-suppressive soil. Soil Biol. Biochem. 16: 397-403.

**Wood, P. & Barbetti, M. J.** 1977: A study on the inoculation of rape seedlings with ascospores and pycnidiospores of the blackleg disease causal agent *Leptosphaeria maculans*. J. Aust. Inst. Agric.Sci. 43: 79-80.

**Wöppel, H. J.** 1995: Ist der Einsatz von Fungiziden im Raps noch wirtschaftlich, Raps 13: 62-63.

**Zachow, C.** 2003: Diversität Pflanzen-assoziiertes Pilz und deren Implikationen für die biologische Kontrolle. Diplomarbeit, Universität Rostock.

**Zeise, K.** 1990: Erste Untersuchungen zu einer durch *Verticillium dahliae* kleb. verursachten Fruchtfolgekrankheit an Winterraps (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger). Dissertation, Universität Rostock.

**Zeise, K.** 1992: Screening for resistance to *Verticillium dahliae* Kleb. on oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzger) under greenhouse conditions. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 44: 125-128

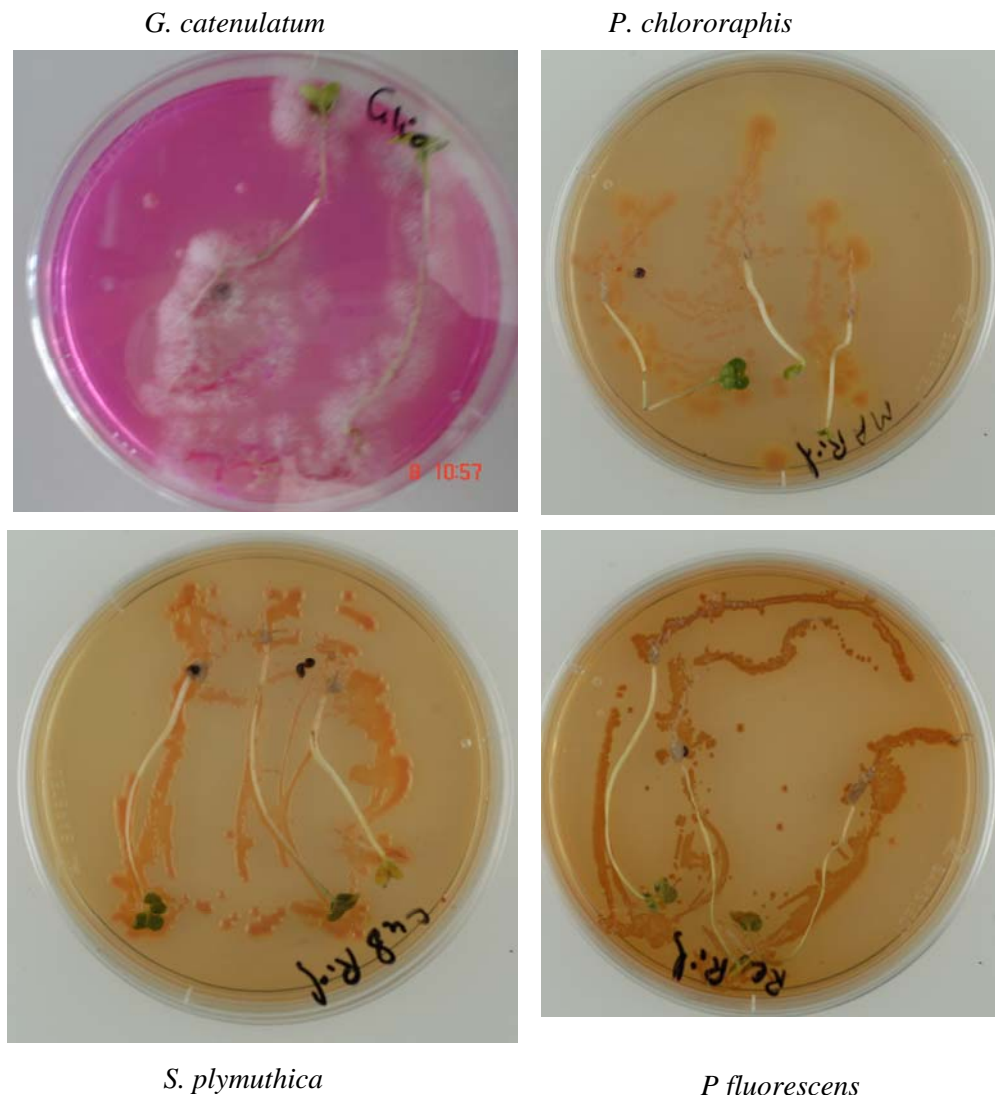
**Zeise, K.** 1995: Untersuchungen zur Virulenz von *Verticillium dahliae*-Isolaten unterschiedlicher Herkunft an *Brassica napus* L. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 47: 69-71.

**Zeise, K.** 1997: Studies on the susceptibility to *Verticillium dahliae* Kleb. var. *longisporum* Stark of six related *Brassica* species. Z. PflKrankh. PflSchutz 104: 501-505.

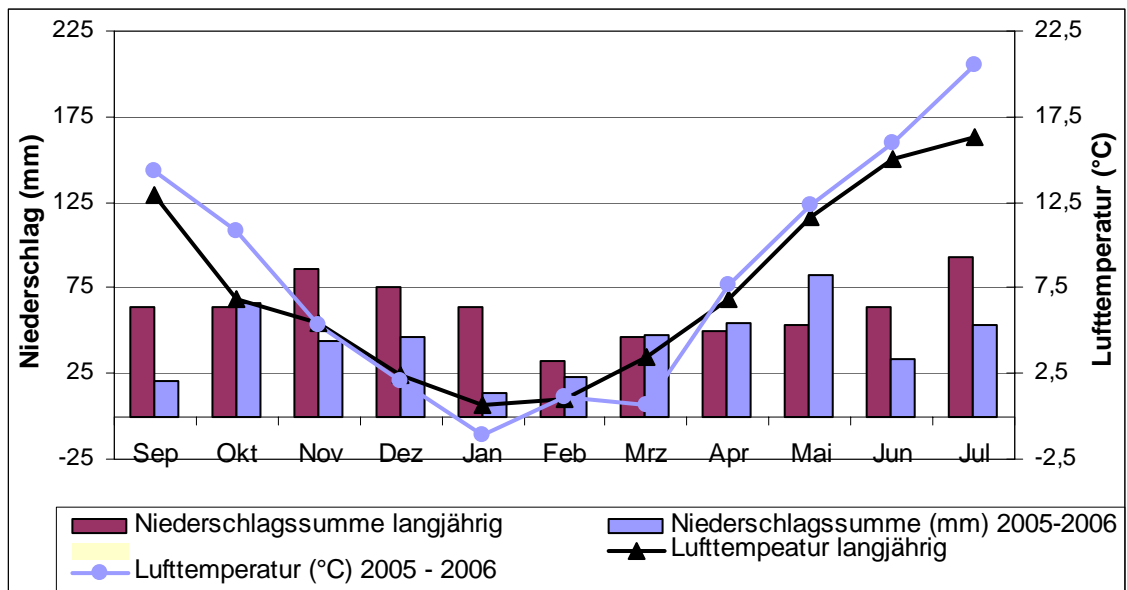
**Zhao, Q.** 2001: Untersuchungen zum Infektionsmodus, immunologischen Nachweis und zur biologischen Bekämpfung von *Leptosphaeria maculans*(Desm) Ces. & de Not., dem Erreger der Wurzelhals- und Stängelfäule an Winterraps. Dissertation Universität Göttingen.



8 Anhang



**Abb. 1:** Besiedlung der Rapskeimlinge durch Antagonisten.



**Abb. 2:** Durchschnittstemperaturen (°C) und Niederschlagssummen (mm) der Versuchsmonate des Versuchsjahres 2005/2006 sowie langjährige Mittelwerte des Standortes Hohenschulen

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Omar  
Vorname Hammoudi  
geboren: 07.01.1970, Lattakia, Syrien  
Staatangehörigkeit: Syrer

### Schulausbildung

1977 – 1983 Grundschole Lattakia, Syrien  
1983 - 1988 Gymnasium im Lattakia, Syrien Abschluss: Abitur

### Hochschulausbildung

1989 - 1994 Studium der Agrarwissenschaften an der Universität Tishreen im Lattakia, Syrien. Abschluss: Bacalorius (agr. Ing.)  
1994 – 1995 Studium der Pflanzenschutz an der Universität Tishreen, Abschluss: Diplom, Thema: Study of some nurseries phytopathology in Lattakia.  
1996 – 1999 Studium der Pflanzenschutz an der Universität Tishreen, Abschluss: Magister (M. sc. agr.) Thema: Ecological Study of Olive *Psylla* and its biological control by parasitic and predatory insects.  
Seit 01.09.2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Phytopathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Stipendium Hochschulwesen in Syrien. Anfertigung einer Dissertation, Thema: Einfluss mikrobieller Antagonisten auf den Befall mit *Phoma lingam* und *Verticillium dahliae* var. *longisporum* an Raps (*Brassica napus* L. var. *napus*)

### Berufstätigkeit

1995 – 19.08.2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Agrarwissenschaftlichen Zentrum, Abteilung Pflanzenschutz, Lattakia, Syrien

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf-Udo Ehlers für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und das stetige Interesse, die weit über den Rahmen dieser Doktorarbeit hinausgehende Betreuung, der in jeder Hinsicht gewährten Unterstützung und die vielen nicht nur fachlichen Diskussion, Anregungen und Gespräche während der gesamten Zeit meines Promotionsstudiums und nicht zuletzt für das Korrekturlesen der Arbeit.

Bei Herrn Dr. Arne Peters (e-nema GmbH) und Dr. Olaf Strauch (Instituts für Phytopathologie) möchte ich mich für die vielen Diskussionen bedanken.

Frau Helga Ladehoff und Michael Wingen danke ich für die vielfältige technische Unterstützung in den Labor- und Feldversuchen.

Ich bedanke mich bei Frau Rose (Pflanzenschutzamt-Kiel) für die Unterstützung in dem Gewächshausversuchsplatz.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Phytopathologie bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft, insbesondere bei Hagen Bremer für den regen Gedankenaustausch bei Feldversuch und für seine Unterstützung und natürlich bei Miriam Döring und Nicola Benecke.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht hat.