

Etablierung des entomophagen Pilzes *Metarhizium brunneum* in Zwischenfrüchten zur Stärkung der Kartoffel entlang der Fruchtfolge.

Hetjens B¹ und Wichern F¹

Keywords: Pflanzenwachstumsförderung, endophyte Pilze, *Metarhizium brunneum*, EEP, Rhizosphärenbesiedelung.

Abstract

Plant associated entomopathogenic soil fungi are a promising management tool in organic farming to improve plant performance, which requires establishment in the root zone. Therefore, the ability of *Metarhizium brunneum* CB15 to colonise the rhizosphere of main and several relevant cover crops in the potato (*Solanum tuberosum* L.) crop rotation was assessed in two consecutive greenhouse pot trials. To this aim two potato varieties and seven cover crop species were inoculated with either aeroconidia or formulated blastospores and harvested after seven (potatoes) and eight (cover crops) weeks of growth. Both types of inoculum were able to induce a colonisation of the rhizosphere in steamed arable soil, where a high degree of endophytic colonisation was found for some of the cover crop species, but not for potatoes. Nevertheless, growth of the aboveground biomass of *Solanum tuberosum* 'Innovator' was significantly enhanced by 20 %, but not for 'Bintje'. Plant growth promoting effects of *Metarhizium* in potatoes appear to be variety specific. The results of these experiments show that it might be possible to establish a reservoir of the entomopathogenic fungus in the rhizosphere to potentially protect the whole crop rotation from damages by pest insects.

Einleitung und Zielsetzung

Neben ihren entomopathogenen Eigenschaften besitzen Pilze der Gattung *Metarhizium* die Fähigkeit, die Rhizo-, aber auch die Endosphäre von Pflanzen zu besiedeln (Hu and Leger 2002; Sasan and Bidochka 2012). *Metarhizium*-Arten zeigen eine pflanzenstärkende Wirkung in diversen Nutzpflanzen (Stone and Bidochka 2020). Wachstumsfördernde Effekte werden in der Literatur häufig mit der endophytischen Besiedlung korreliert, selten aber mit der Besiedlung der Rhizosphäre, die allerdings Grundbedingung für eine endophytische Besiedlung ist (Liao et al. 2014; Barelli, Moreira, and Bidochka 2018). Unter Laborbedingungen konnte gezeigt werden, dass *M. brunneum* positiv auf die Entwicklung von Kartoffeln wirkt (Krell et al. 2018). Neben den wachstumsfördernden Effekten auf Pflanzen wird auch die Reduktion von Pathogenen, wie die Wirkung von *Metarhizium* gegen Drahtwürmer (Razinger, Schroers, and Urek 2018), pathogene Pilze wie *Fusarium spp.* (Sasan and Bidochka 2013), potentiell aber auch phytopathogene Nematoden (Kassam et al. 2022) in der Literatur beschrieben. Verschiedene *Metarhizium*-Arten wurden in der Rhizosphäre diverserer Pflanzenarten gefunden; es herrscht in der Literatur allerdings Uneinigkeit darüber, ob eine Besiedlung der Rhizosphäre wirtspflanzenpezifisch (Wyrebek et al. 2011) oder von anderen Faktoren abhängig ist (Nishi and Sato 2019). Eine endophytische Besiedlung hingegen scheint abhängig von der Kombination aus

¹ Hochschule Rhein-Waal, Kleve, Marie-Curie Straße 1, 47533, Kleve, Deutschland, bernd-theo.hetjens@hochschule-rhein-waal.de, www.hochschule-rhein-waal.de

Wirtspflanze und Pilzart, wenn nicht sogar Pilzisolat zu sein. Zur Erhöhung der Wirksamkeit des endophytischen Pilzes in der Kartoffel wurde postuliert, dass eine Besiedlung der Rhizosphäre der Zwischenfrucht vor der Kartoffel als Habitat für eine Vermehrung, zumindest aber den Erhalt der Population von *M. brunneum* sorgt. So könnte eine ausreichend hohe Konzentration des Pilzes für die Bekämpfung der Schnellkäferlarven, die als Schadinsekt in der Kartoffel auftreten, bereits zur Zwischenfrucht im Spätsommer/Herbst erreicht werden. Die Rhizosphäre kann potentiell als Reservoir für *Metarhizium* dienen und so einen Übertrag des Pilzes von der Zwischen- auf die Hauptfrucht induzieren (Hu and Leger 2002). Dazu wurde in den hier präsentierten Gewächshausversuchen untersucht, ob a) eine Artspezifität der rhizosphärischen bzw. endophytischen Besiedlung durch das Isolat *Metarhizium brunneum* CB15 (MbCB15) in verschiedenen, für die Kartoffelfruchtfolge relevanten Zwischenfrüchten zu finden ist. Zusätzlich wurde erhoben, ob in der Rhizosphäre der Zwischenfrucht eine Anzahl kolonienbildender Einheiten (cfu) erreicht wird, die für Drahtwürmer potentiell letal sein könnte. In einem zweiten Experiment wurde b) untersucht, ob sich in der Rhizo- und Endosphäre der Hauptfrucht nach Inokulation mit einer neuen Formulierung von Blastosporen in gedämpftem Ackerboden MbCB15 nachweisen lässt. Zusätzlich wurde erhoben, ob sich eine Besiedlung auf die gebildete Biomasse bzw. den Chlorophyllgehalt der Pflanzen auswirkt.

Methoden

Im Gewächshaus der Hochschule Rhein-Waal, Kleve, wurden sieben ausgewählte Zwischenfrüchte (siehe Tabelle 1), angezogen. Die 1l-Pflanztöpfe wurden mit 850 g (Trockenmasse) eines gedämpften sandigen Lehm Bodens (Dämpfschubkarre BEGA, Dämpfzeit/-temperatur ca. 120 min/ 80 °C, Abkühlen für 24 h) gefüllt und rückverdichtet. Vor Aussaat wurde der Boden auf 60% Wasserhaltekapazität (WHK) aufgegossen (gravimetrisch bestimmt). Es wurden fünf oberflächensterilisierte Samen pro Topf gesät und nach einer Woche auf einen Keimling pro Topf ausgedünnt. Nach acht Wochen Wuchsphase wurde der Versuch beendet. Der gleiche Versuchsansatz wurde für den Kartoffelversuch gewählt, allerdings hier in 3,5l-Töpfen und mit Saatkartoffeln (*Solanum tuberosum* L. 'Innovator' und 'Bintje') pro Topf. Nach sieben Wochen (kurz nach der Vollblüte) wurde der Versuch beendet. Die Zwischenfrüchte wurden mit einer sterilen Aerokonidiensuspension von *Metarhizium brunneum* CB15 (MbCB15) inokuliert (eine Woche nach Keimung; 7,14 ml bei $1,16 \cdot 10^8$ /ml), während die Kartoffeln bei Aussaat mit einer Suspension formulierter Blastosporen (5,5 ml bei $4,9 \cdot 10^7$ /ml) beschichtet wurden (Dietsch et al. 2021). Proben des umgebenden Bodens ohne Wurzeln („bulk soil“) bzw. der Rhizosphäre wurden im Verhältnis 1:10 (m/v) mit steriler Tween 80-Lösung (0,05 % v/v) behandelt (Bruck 2005). Die Suspension wurde in einer Verdünnungsreihe (1:1, 1:3, 1:9, 1:27, 1:81) auf 0,6 g/L OA-CTAB mit 0,5 g/L Chloramphenicol ausplattiert (Posadas et al. 2012). Zur Erfassung der endophytischen Besiedlung wurden oberflächensterilisierte Wurzelstücke auf Strasser-Medium ausplattiert (Strasser, Forer, and Schinner 1996). Nach 10 Tagen wurden die Anzahl cfu der Verdünnungsreihen, nach 21 Tagen die der Wurzelproben ausgezählt.

Ergebnisse und Diskussion

Bei allen Zwischenfrüchten konnte eine Besiedlung der Rhizosphäre durch MbCB15 nachgewiesen werden. Während die cfu-Bestimmung in den bulk soil-Proben im Mittel bei $4,5 \cdot 10^5$ ohne signifikante Unterschiede lag, variierte die Anzahl kolonienbildender Einheiten in der Rhizosphäre artenabhängig stark (siehe Tabelle 1). Die höchste Anzahl cfu konnten bei *R. sativus* und *L. multiflorum* festgestellt werden, die beide im Mittel im

Bereich von 10^6 lagen. Die als für Drahtwürmer letal beschriebene Konidienkonzentration pro g Boden wird artabhängig mit 10^6 - 10^8 angegeben (pers. Kommunikation mit Biocare). Unsere Ergebnisse zeigen damit für einige Drahtwurmartens cfu im Bereich der letalen Dosis.

Tabelle 1: Anzahl der cfu ($\times 10^5$) in der Rhizosphäre der untersuchten Zwischenfrüchte (Feldsaaten Freudenberger) bezogen auf 1 g Boden (Trockenmasse), Anteil der nachgewiesenen endophytischen Besiedlung in %; absteigend nach cfu sortiert.

Zwischenfrucht	n	min	max	Ø + SE	SD	Besiedlung %
<i>R. sativus</i>	5	3,33	26,51	13,48 ± 4,26	9,53	60
<i>L. multiflorum</i>	5	3,21	15,65	10,00 ± 2,36	5,27	80
<i>V. sativa</i>	5	2,30	16,27	7,60 ± 2,75	6,15	0
<i>L. angustifolius</i>	2	1,88	11,48	6,68 ± 4,80	6,78	0
<i>P. tanacetifolia</i>	5	2,67	9,85	5,48 ± 1,19	2,67	40
<i>A. strigosa</i>	3	3,12	4,24	3,7 ± 0,32	0,56	0
<i>S. alba</i>	5	0,34	4,29	1,71 ± 0,75	1,67	80

Im bulk soil sowie der Rhizosphäre beider Kartoffelsorten konnte MbCB15 wiedergefunden werden, eine endophytische Besiedlung konnte mit der angewandten Methodik nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 2). Trotz des fehlenden Nachweises der endophytischen Besiedlung konnte ein wachstumsfördernder Effekt von MbCB15 bei 'Innovator' in gedämpftem Ackerboden nachgewiesen werden. Ein Einfluss auf den Chlorophyllgehalt der Blätter konnte nicht festgestellt werden.

Tabelle 2: Ergebnisse des Versuchs Kartoffel x MbCB15. Oberirdische Biomasse (trocken) in g, Anzahl cfu/g Trockengewicht Boden, cfu $\times 10^5$. Signifikant mit P > 0,05 mit * gekennzeichnet.

Kartoffelsorte	n	Ø OBM, trocken/g Kontrolle ±SD	Ø OBM, trocken/g Behandelt ±SD	Besiedlung Rhizosphäre	Endophytische Besiedlung %
Bintje	10	10,26 ± 1,37	9,78 ± 1,61	positiv	0
Innovator	8	16,04 ± 2,16*	20,16 ± 2,46*	positiv	0

Schlussfolgerungen

Eine Besiedlung der Rhizosphäre relevanter Zwischenfrüchte und der folgenden Kartoffeln konnte in gedämpftem Boden (und damit verminderter Konkurrenzflora) nachgewiesen werden. Die Verifizierung der Beobachtungen unter Feldbedingungen soll in einem laufenden Freilandexperiment erfolgen. Eine Inokulation von gedämpftem Boden mittels der schneller zu produzierenden Blastosporen bietet einen potentiell einfachen Zugang zu Inokulum des MbCB15. Es ist möglich, dass die Konzentration der Kondien von MbCB15 in der Rhizosphäre ausreichend hoch ist, um Drahtwürmer an einem zweiten Punkt der Fruchtfolge zu bekämpfen. Wachstumsfördernde Effekte von MbCB15 auf Kartoffeln scheinen auch von der Sorte der Wirtspflanze abhängig zu sein. Im durchgeführten Experiment wurde ein funktionierendes System aus Innovator

und MbCB15 gefunden, das für weitere Experimente als Referenz dienen kann, um weitere Einflussfaktoren zu eruieren.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Katharina Coorts, Adryana-Gloriani Landum und Büge Sunar für die Hilfe in Gewächshaus und Labor. Des Weiteren bedanke ich mich bei Feldsaaten Freudenberger das überlassene Saatgut sowie bei Robin Dietsch für das Zusenden des *Metarhizium*-Stammes.

Literatur

- Barelli L, Moreira C C & Bidochka M J (2018) 'Initial stages of endophytic colonization by *Metarhizium* involves rhizoplane colonization', *Microbiology*, 164: 1531-40.
- Bruck D (2005) 'Ecology of *Metarhizium anisopliae* in soilless potting media and the rhizosphere: Implications for pest management', *Biological Control*, 32: 155-63.
- Dietsch R, Jakobs-Schönwandt D, Grünberger A & Patel A (2021) 'Desiccation-tolerant fungal blastospores: From production to application', *Current Research in Biotechnology*, 3: 323-39.
- Hu G & St. Leger R J (2002) 'Field Studies Using a Recombinant Mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) Reveal that It Is Rhizosphere Competent', *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 6383-87.
- Kassam R, Yadav J, Jaiswal N, Chatterjee M, Hada A, Chawla G, Kamil D & Rao U (2022) 'Identification and potential utility of *Metarhizium anisopliae* (ITCC9014) for the management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*', *Indian Phytopathology*: 1-7.
- Krell V, Unger S, Jakobs-Schoenwandt D & Patel A V (2018) 'Endophytic *Metarhizium brunneum* mitigates nutrient deficits in potato and improves plant productivity and vitality', *Fungal Ecology*, 34: 43-49.
- Liao X., O'Brien T R, Fang W & St. Leger R J (2014) 'The plant beneficial effects of *Metarhizium* species correlate with their association with roots', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 7089-96.
- Nishi O & Sato H (2019) 'Isolation of *Metarhizium spp.* from rhizosphere soils of wild plants reflects fungal diversity in soil but not plant specificity', *Mycology*, 10: 22-31.
- Posadas J B, Comerio R M, Mini J I, Nussenbaum A L & Lecuona R E (2012) 'A novel dodine-free selective medium based on the use of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) to isolate *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* sensu lato and *Paecilomyces lilacinus* from soil', *Mycologia*, 104: 974-80.
- Razinger J, Schroers HJ & Urek G (2018) 'Virulence of *Metarhizium brunneum* to field collected *Agrotis spp.* wireworms', *Journal of Agricultural Science and Technology*, 20: 309-20.
- Sasan R K & Bidochka M J (2012) 'The insect-pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* (Clavicipitaceae) is also an endophyte that stimulates plant root development', *American Journal of Botany*, 99: 101-07.
- . 2013. 'Antagonism of the endophytic insect pathogenic fungus *Metarhizium robertsii* against the bean plant pathogen *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*', *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35: 288-93.
- Stone L B L & Bidochka M J (2020) 'The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104: 9935-45.
- Strasser H, Forer A & Schinner F (1996) 'Development of media for the selective isolation and maintenance of virulence of *Beauveria brongniartii*'.
- Wyrebek M, Huber C, Sasan R K & Bidochka M J (2011) 'Three sympatrically occurring species of *Metarhizium* show plant rhizosphere specificity', *Microbiology*, 157: 2904-11.