

26th German Conference on weed Biology and Weed Control, March 11-13, 2014, Braunschweig, Germany

Nutzung von Rhizobakterien und Endophyten zur biologischen Bekämpfung von Unkräutern und Ungräsern

Use of rhizobacteria and endophytes for biological control of weeds

Friederike Trognitz*, Simon Dürr, Siegrid Widhalm, Abdul Samad, Günter Brader, Stéphane Compant und Angela Sessitsch

Austrian Institute of Technology, Department Health and Environment, Bioresources Unit,
Konrad Lorenz Str. 24, AT-3430 Tulln, Austria

*Korrespondierender Autor, friederike.trognitz@ait.ac.at



DOI 10.5073/jka.2014.443.065

Zusammenfassung

Unkräuter und Ungräser tragen weltweit zu hohen Ertragseinbußen bei. Schätzungen zufolge kann mit einem Ertragsverlust von bis zu 34 % gerechnet werden (OERKE, 2006). Die größten Ertragsverluste entstehen durch die Konkurrenz zwischen der Feldfrucht und den Unkräutern für Licht, Nährstoffe und Feuchtigkeit. Invasive Pflanzen tragen teilweise noch zu weiteren Problemen bei. So ist der Pollen der eingeschleppten *Ambrosia artemisiifolia* L., (Beifußblättriges Traubenkraut, Familie Asteraceae) ein starkes Allergen und verlängert die Saison für europäische Pollenallergiker bis in den Oktober.

Traubenkraut ist heute in Europa am häufigsten in Ungarn, Frankreich und Italien anzutreffen. In Österreich sind Populationen vom Osten ausgehend auf landwirtschaftlichen Flächen und an Straßenrändern zahlreich.

Möglichkeiten zur Eindämmung der Populationen existieren kaum. Eine Pflanze produziert bis zu 6000 Samen, die im Boden 40 Jahre überleben. Eine Kontrolle mit Herbiziden ist in Sonnenblumenfeldern aufgrund der biologischen Verwandtschaft beider Pflanzen nicht möglich. Alternativ wird eine Bekämpfung mit biologischen Mitteln angestrebt. Auf *Ambrosia artemisiifolia* spezialisierte herbivore Insekten wurden allerdings nicht gefunden. Die Nutzung von pflanzenassoziierten Rhizobakterien und Endophyten als bioaktive Herbizide wäre eine neue Alternative. Direkt aus *Ambrosia artemisiifolia* isolierte Bakterien haben erhöhte Chancen, selektiv auf diese Pflanze zu wirken, so dass sie auch im Anbau von eng verwandten Kulturen und im biologischen Landbau angewendet werden könnten.

Stichwörter: AMBEL, *Ambrosia artemisiifolia*, Bakterien, Bio-Herbizide, selektive Wirkung

Abstract

Weeds cause severe yield losses in agriculture, with a maximum estimate of 34% of yield loss worldwide due to competition between the crops and the weeds for nutrition, light and humidity (OERKE, 2006). Invasive plants contribute partially to other problems. The pollen of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia* L., for example, is five times more allergenic than grass pollen; already ten pollen grains per m³ air can trigger allergy in sensitized patients, including rhinitis, conjunctivitis and asthma. This neophyte from America has extended the season of allergy in European patients to October.

Common ragweed is currently most frequent in Hungary, France and Italy. In Austria, ragweed populations along roads have increased dramatically since 2000.

The effective means to control this weed of the Asteraceae family are limited; a single plant can produce up to 6000 seeds which stay in the soil for 40 years. Control using selective herbicides is not possible within stands of the Asteraceae member sunflower. Efforts to use herbivore insects as biological control agents also failed due to the unavailability of insects specializing on this ragweed. The use of plant-associated rhizobacteria and endophytes as bio-herbicides offers a novel alternative to conventional methods. By analogy to experiences from other plant-microbe systems, the chances to find microbes of the desired characteristics are highest when isolating and testing specimens directly from ragweed plants. These organisms often have an extremely narrow host range that permits their use for the control of among several even closely related plant species growing together in a field.

Keywords: AMBEL, *Ambrosia artemisiifolia*, Bacteria, bio-herbicide, common ragweed, selective function

Einleitung

Ragweed ist eines von 20 europäischen Unkräutern, das für eine klassische biologische Bekämpfung ausgewählt wurde (SHEPPARD *et al.*, 2005). Die klassische biologische Kontrolle beruht

auf der Selektion und der Ausbringung eines Mittels, das nach der Ausbringung lebensfähig bleibt, sich etabliert und dadurch zu einer langanhaltenden Bekämpfung des Unkrautes beiträgt (BOYETCHKO, 1997). Mehrere Experimente mit Insekten, Pilzen und Bakterien zur Bekämpfung von *Ambrosia artemisiifolia* wurden weltweit durchgeführt (GERBER *et al.*, 2011). Jedoch sind fast alle natürlichen Feinde von *A. artemisiifolia* in Europa nicht nur auf diese Art spezialisiert, und pilzliche Pathogene, die das Wachstum dieses Traubenkrauts eindämmen, sind oft für eine Massenproduktion nicht geeignet (GERBER *et al.*, 2011).

Studien zur Nutzung von Bakterien für die biologische Bekämpfung von Beikräutern und -gräsern begannen um 1990. Der Boden beherbergt eine Vielzahl von Mikroorganismen, die die Rhizosphäre, die Wurzelrinde und andere Pflanzenteile besiedeln können (KLOEPFER *et al.*, 1992).

Diese pflanzen-assoziierten Bakterien leben in einer engen Gemeinschaft mit der Pflanze, und diese Interaktion kann neutral, positiv oder schädlich sein. Die Nutzung von Bakterien zur biologischen Unkrautbekämpfung belastet die Umwelt weniger als konventionelle Herbizide und verringert das Risiko von Pestizidrückständen in Lebensmitteln. Aufgrund der Gesundheitsgefährdung werden in den nächsten Jahren einige Herbizide vom Markt genommen, und somit bieten Bio-Herbizide eine gute Alternative vor allem dort, wo chemische Herbizide verboten sind.

In einigen Studien wurde gezeigt, dass pflanzen-assoziierte Bakterien einen negativen Effekt auf das Pflanzenwachstum von spezifischen Pflanzen haben (eine Übersicht geben KREMER und KENNEDY, 1996). Unter diesen Bakterien befinden sich Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Citrobacter* und *Achromobacter* (KREMER *et al.*, 1990). Metabolite wie Auxin und Blausäure werden durch Bakterien produziert und können in hoher Konzentration schädlich für die Pflanze sein. Verschiedene Pseudomonaden zeigten eine Herbizidwirkung in vitro und im Gewächshaus. Der *P.-fluorescens*-Stamm D7 wirkte sich zum Beispiel negativ auf das Wachstum der Dach-Trespe (*Bromus tectorum*), *P.-fluorescens*-LS102 und -LS174 auf das Wachstum der Esels-Wolfmilch (*Euphorbia esula*) und *P.-fluorescens*-BRG100 auf das Wachstum der Grünen Borstenhirse (*Setaria viridis*) aus (CALDWELL *et al.*, 2012). Die Herbizidwirkung von *P.-fluorescens*-BRG100 gegen die Grüne Borstenhirse wird durch sekundäre Metaboliten wie Pseudophomine A und C und andere zyklische Lipopeptide verursacht (PEDRAS *et al.*, 2003). *P.-fluorescens*-WH6 wiederum produziert einen Metabolit, der das Wachstum nach der Keimung hemmt (BANOWETZ *et al.*, 2008). Wirtsspezifische Tests mit unterschiedlichen Stämmen gegen die *Bromus tectorum* haben gezeigt, dass die Effekte der Rhizobakterien und deren Sekundärmetaboliten wirtsspezifisch sind. Tests an Nicht-Wirtspflanzen wie Winter- und Sommerweizen hatten dagegen keinen oder einen sehr geringen schädigenden Effekt, und in manchen Fällen wurde sogar eine Wachstumsförderung der Nicht-Wirte gefunden (Zusammenfassung bei BOYETCHKO, 1997).

Unter den Pflanzen-assoziierten Mikroorganismen werden Endophyten oft übersehen. Als Endophyten werden Bakterien definiert, die in der Pflanze zeitweise oder während der gesamten Entwicklungsdauer leben und dabei keine sichtbaren Symptome an der Pflanze hervorrufen (WILSON, 1995).

Material und Methoden

Zur Isolierung der Rhizobakterien wurden 5 g Boden aus dem Bereich um die Wurzeln in 10 ml steriler 0,85%ige NaCl-Lösung geschüttet und homogenisiert. Danach wurden 100 µl der Lösung auf R2A-Medium (Difco, Detroit, MI) in Dreifachwiederholung plattiert.

Zur Isolierung von Endophyten wurden Wurzeln und Stängel oberflächensterilisiert. Dazu wurden 5 g Wurzeln bzw. 100 mg bis 1 g Stängel mit 70 %igem Ethanol 5 min lang behandelt. Es folgte eine Behandlung des Pflanzenmaterials mit 2,5 %igem Natriumhypochlorit für 5 min. Die Proben wurden danach dreimal mit sterilem Wasser gewaschen. Als nächster Schritt wurde das Pflanzenmaterial in 10 ml steriler 0,85 %iger NaCl-Lösung zerkleinert und gemischt. Der Pflanzensaft wurde in 1:10-Schritten bis zu 1/10⁹ verdünnt und 100 µl jeder Verdünnung wurden

auf R2A-Medium ausplattiert. Zur Kontrolle der Oberflächensterilisierung wurden 100 µl des letzten Waschwassers ebenfalls auf R2A-Medium plattiert.

Die Platten wurden bei 28 °C für 2 bis 5 Tage inkubiert, und danach wurden die Bakterien vereinzelt.

Ergebnisse

Zur Isolierung der Bakterien wurden verschiedene Standorte gewählt, um ein breites Bodenspektrum abzudecken. Zwei Proben stammten von Standorten ohne landwirtschaftliche Nutzung, darunter eine Probe aus dem Naturschutzgebiet Neusiedler See. Dieser Standort zeichnet sich durch seine sandigen, salzhaltigen und trockenen Böden aus. Der zweite Standort war ein aufgelassenes Feld inmitten von Weingärten in Niederösterreich. Des Weiteren wurden zwei Proben von Straßenrändern und eine Probe aus einer feuchten Wiese zwischen Straßenrand und Feld genommen. Ob es wirtsspezifische oder bodenspezifische Bakteriengemeinschaften gibt, werden die weiteren Analysen zeigen. Dafür wird das partielle 16S-rRNA-Gen sequenziert. Abbildung 1 zeigt eine R2A-Mediumplatte mit unterschiedlichen Bakterienisolaten der Rhizosphäre. Es wurden insgesamt je Standort bis zu 400 Bakterien isoliert.

Um die Bakterien auf eine eventuelle Herbizidwirkung zu testen, werden Verfahren benötigt, um möglichst schnell und effektiv eine große Anzahl von Bakterien zu untersuchen. Es wurde ein Test für die Detektion von Cyanwasserstoff (HCN) etabliert, der auf der Methode von FEIGL und ANGER (1966) beruht. Durch diese Methode können gleichzeitig bis zu 96 Bakterien getestet werden (Abb. 2). Wird HCN von den Bakterien gebildet, färbt sich das Feigl-Anger-Papier blau. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde das Gen mittels PCR teilweise isoliert und sequenziert. In allen Fällen wurde das Vorhandensein des HCN-Clusters bestätigt. In einem Vorversuch wurden jeweils 125 Bakterien der Wurzeln und der Rhizosphäre von *Lepidium draba* sowie je 125 Bakterien vom gleichen Standort aus Wurzeln und der Rhizosphäre von Weinrebe auf HCN-Produktion getestet. Die Tabelle 1 zeigt den Anteil von HCN-positiven Bakterien in den einzelnen Pflanzenabschnitten und deren Anteil an der Gesamtanzahl isolierter Bakterien. Die Bakterien werden durch die Sequenzierung des 16S-rRNA-Gens charakterisiert. Obwohl beide Pflanzen am selben Standort standen, im Durchschnitt 20 cm voneinander entfernt, wurden bei der einjährigen Pflanze mehr HCN-produzierende Bakterien gefunden als im Wein. Ob die HCN-produzierenden Stämme eine Herbizidwirkung gegen *Lepidium draba* zeigen, wird in einem weiteren Schritt an den Pflanzen untersucht. Es werden entweder Samen mit den jeweiligen Stämmen inokuliert oder Jungpflanzen mit der Bakterienlösung besprüht. Die Wirkung der Bakterien wird im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen evaluiert.

Des Weiteren werden die Bakterien auf das Vorhandensein mögliche phytotoxische Metabolite wie Auxin und Coranatine getestet. Um die Herbizidwirkung festzustellen, werden Pflanzentests an Wirten und an Nicht-Wirten in vitro, im Gewächshaus und im Feld durchgeführt.

Tab. 1 Anzahl der Cyanwasserstoff produzierenden Bakterien in *Lepidium draba* und *Vitis vinifera* am selben Standort.

Tab. 1 Number of hydrogen cyanide producing bacteria of *Lepidium draba* and *Vitis vinifera* from the same site.

Pflanze	Pflanzenteil	Bakterienisolate getestet	Anzahl HCN-positive Bakterien	Anteil der HCN-positiven Bakterien in %
<i>Lepidium draba</i>	Rhizosphäre	125	20	16
	Wurzeln	125	9	7
<i>Vitis vinifera</i>	Rhizosphäre	125	3	2
	Wurzeln	125	5	4

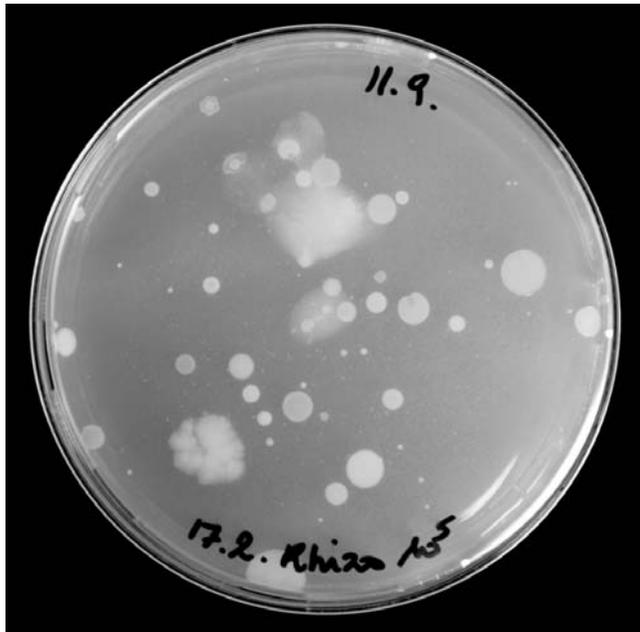


Abb. 1 Bakterien isoliert aus der Rhizosphäre von *Ambrosia artemisiifolia* auf R2A-Platten.

Fig. 1 Bacteria isolated from the ragweed rhizosphere on R2A plates.

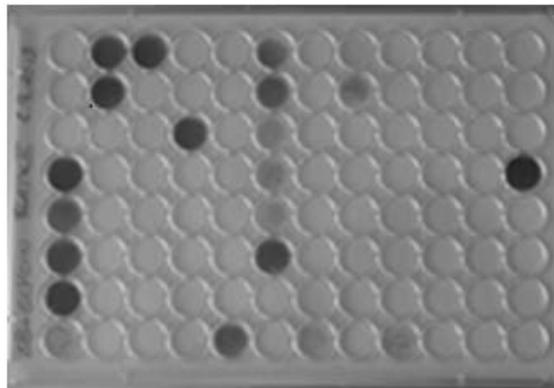


Abb. 2 Test der Bakterien auf Cyanwasserstoffproduktion in 96-iger Platten mit der adaptierten Methode nach FEIGL und ANGER (1966), die Blaufärbung auf dem Filterpapier zeigt die Produktion von Cyanwasserstoff.

Fig. 2 Screening of bacteria for hydrogen cyanide production in 96 well plates with the adapted method from FEIGL und ANGER (1966), the blue color of the filter paper shows the production of hydrogen cyanide.

Diskussion

Das Ziel der Studie ist es, pflanzenassoziierte Bakterien zu finden, die eine Herbizidwirkung auf ausgewählte Beikräuter zeigen. Da die Bakterien aus der Wirtspflanze isoliert werden, erhoffen wir uns eine selektive Wirkung der Bakterien auf die Pflanze. Studien von KREMER *et al.* (1996) haben gezeigt, dass diese Strategie Bio-Herbizide hervorbringen kann, die den Vorteil haben, gezielt zu wirken und im Boden wieder abgebaut werden können. Die Studien haben auch gezeigt, dass

solche Bakterien keinen Effekt oder aber sogar einen positiven Effekt auf Nichtwirtspflanzen haben. Um ein breites Wirkungsspektrum abzudecken, werden mehrere mögliche Wirkungsmechanismen untersucht. Bakterien mit unterschiedlichen Mechanismen können eventuell gemeinsam ausgebracht werden, um so eine schnelle Herbizidresistenzentwicklung zu vermeiden. Erste Resultate werden im Poster aufgezeigt.

Danksagung

Die Arbeiten werden im Rahmen des NÖ Forschungs- und Bildungsges.m.b.H. (NFB) LS12-006 durchgeführt.

Literatur

- BANOWETZ, G. M., M. D. AZEVEDO, D. J. ARMSTRONG, A. B. HALGREN und D. I. MILLS, 2008: Germination-Arrest Factor (GAF): Biological properties of a novel, naturally-occurring herbicide produced by selected isolates of rhizosphere bacteria. *Biological Control* **46**, 380-390.
- BOYETCHKO, S. M., 1997: Principles of biological weed control with microorganisms. *HortScience* **32**, 201-205.
- CALDWELL, C. J., R. K. HYNES, S. M. BOYETCHKO und D. R. KORBER, 2012: Colonization and bioherbicidal activity on green foxtail by *Pseudomonas fluorescens* BRG100 in a pesta formulation. *Canadian Journal of Microbiology* **58**, 1-9.
- FEIGL, F. und V. ANGER, 1966: Replacement of benzidine by copper ethylacetoacetate and tetra base as spot-test reagent for hydrogen cyanide and cyanogen. *Analyst (Lond.)* **91**, 282-284.
- GASSON, M. J. 1980: Indicator technique for antimetabolic toxin production by phytopathogenic species of *Pseudomonas*. *Applied and Environmental Microbiology* **39**, 25-29.
- GERBER, E., U. SCHAFFNER, A. GASSMANN, H. L. HINZ, M. SEIER und H. MÜLLET-SCHÄRER, 2011: Prospects for biological control of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe: learning from the past. *Weed Research* **51**, 559-573.
- KLOEPPER, J. W., B. SCHIPPERS und P. A. H. M. Bakker, 1992: Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathology* **82**, 726-727.
- KREMER, R. J., M. F. T. BEGONIA, L. STANLEY und E. Z. LANHAM, 1990: Characterization of rhizobacteria associated with weed seedlings. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 1649-1655.
- KREMER, R.J. und, A. C. KENNEDY, 1996: Rhizobacteria as biocontrol agents of weeds. *Weed Technology* **10**, 601-609.
- OERKE, E.C., 2006: Crop losses to pests. *J. Agr. Sci.* **144**, 31-43.
- PEDRAS, M. S. C., N. ISMAIL, J. W. QUAIL und S. M. BOYETCHKO, 2003: Structure, chemistry, and biological activity of pseudophomins A and B, new cyclic lipodepsipeptides isolated from the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry* **62**, 1105-1114.
- SHEPPARD, A.W., R. H. SHAW und R. SFORZA, 2006: Top 20 environmental weeds for classical biological control in Europe: a review of opportunities, regulations and other barriers to adoption. *Weed Research* **46**, 93-117.
- WILSON, D., 1995: Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**, 274-276.