

# BÖLN

Bundesprogramm Ökologischer Landbau  
und andere Formen nachhaltiger  
Landwirtschaft

## Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung der bodenbürtigen Erdbeerkrankheiten *Verticillium dahliae* und *Phytophthora cactorum* sowie des Erdbeerblütenstechers

Application of biocontrol agents to regulate diseases on strawberries

FKZ: 11NA012

**Projektnehmer:**

Julius Kühn-Institut (JKI)  
Institut für Biologischen Pflanzenschutz  
Heinrichstraße 243, 64287 Darmstadt  
Tel.: +49 6151 407-0  
Fax: +49 6151 407-290  
E-Mail: [bi@jki.bund.de](mailto:bi@jki.bund.de)  
Internet: [www.jki.bund.de](http://www.jki.bund.de)

**Autoren:**

Bisutti, Isabella Linda; Stephan, Dietrich

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen  
Institut für Biologischen Pflanzenschutz  
Heinrichstrasse 243  
64287 Darmstadt

„Einsatz mikrobiologischer Präparate zur  
Regulierung der bodenbürtigen  
Erdbeerkrankheiten *Verticillium dahliae* und  
*Phytophthora cactorum* sowie des  
Erdbeerblütenstechers“

Schlussbericht zum Forschungsprojekt Nr. 2811OE043  
Berichtszeitraum: 01.01.2012 - 31.03.2014

## Kurzfassung Deutsch

Die Erdbeere zählt zu den beliebtesten Obstarten in Deutschland. Allerdings wird eine Ausdehnung des Anbaus -insbesondere des Bio-Erdbeeranbaus - durch hohe Ertragsausfälle aufgrund von Krankheiten und Schädlingen begrenzt. Insbesondere die Krankheitserreger der Rhizomfäule bzw. der Lederbeerenfäule sowie der *Verticillium*-Welke stellen die wichtigsten bodenbürtigen Krankheitserreger der Erdbeere dar. Inwieweit antagonistische Mikroorganismen gegen diese Bodenpathogene angewendet werden können, wurde am JKI in Darmstadt untersucht.

Aufbauend auf Laborversuchen wurden *ad planta* Versuche mit dem Bakterium *Bacillus amyloliquifaciens* FZB42 (RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl.), dem Pilz *Trichoderma harzianum* T58 (Trichostar<sup>®</sup>) und dem insektenpathogenen Pilz *Metarhizium brunneum* Ma43 durchgeführt.

In Gewächshausversuchen wurde die Wirkung der Mikroorganismen sowie deren Mischung geprüft. In der unbehandelten Kontrolle starben nach künstlicher Infektion mit *P. cactorum* bis zu 44 % der Pflanzen ab. Überlebende Pflanzen zeigten deutlich geringeren Fruchtertrag und das Wurzelwachstum war reduziert. Bei den mit den Antagonisten behandelten Pflanzen konnte die Absterberate bis auf null Prozent reduziert und der Ertrag nach Anwendung pilzlicher Antagonisten leicht erhöht werden. Bei mit *V. dahliae* infizierten Pflanzen zeigten auch die bakteriellen Antagonisten sowie die Mischung einen positiven Einfluss auf den Fruchtertrag.

Um die Integration von Antagonisten in eine IPM-Strategie zu prüfen, wurde die Kompatibilität dieser mit chemischen Pflanzenschutzmitteln geprüft. Nur in wenigen Fällen konnte ein negativer Einfluss dieser chemischen Pflanzenschutzmittel auf die Vitalität der getesteten Mikroorganismen festgestellt werden.

In Freilandversuchen auf zwei Praxisbetrieben im Rhein-Main Gebiet wurden die Produkte RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl. und Trichostar<sup>®</sup> und deren Mischung getestet. Bei Betrieb 1 konnte durch Anwendung von RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl. in 2013 der Ertrag um fast 21% und bei Betrieb 2 durch Anwendung von Trichostar<sup>®</sup> um ca. 10% erhöht werden. In 2014 wurden diese Ertragssteigerungen nicht erreicht. Jedoch zeigten sich ähnliche Tendenzen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Mikroorganismen die Pflanzengesundheit fördern und somit auch eine ertragsstabilisierende bzw. -steigernde Wirkung erzielen.

Projektbearbeiterin: Isabella Linda Bisutti

Projektleiter: Dr. Dietrich Stephan

Tel. 06151-407238

E-mail: [Dietrich.Stephan@jki.bund.de](mailto:Dietrich.Stephan@jki.bund.de)

## Summary

Strawberries are one of the most popular fruits in Germany. However, an extension of the cultivation area, especially for organic strawberry production, is limited due to the high yield losses caused by diseases and pests. The aim of the project was to investigate the efficacy of microbiological preparations to control two strawberry diseases, namely crown and root rot or fruit leather rot (*Phytophthora cactorum*), *Verticillium*-wilt (*V. dahliae*) and pest insects.

Out of preliminary laboratory tests, the bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (product: RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl.), the fungus *Trichoderma harzianum* T58 (product: Trichostar<sup>®</sup>) and the insect-pathogenic fungus *Metarhizium brunneum* Ma43 were selected for further experiments.

The antagonists and their mixture were tested in the greenhouse and the field. In greenhouse trials, 44% of the plants died in the soil inoculated with *P. cactorum*. The remaining plants produced fewer yields and the root growth was highly reduced. When antagonists were applied, the number of dead plants was reduced to 0% and the yield was slightly increased. In the trials with *V. dahliae* inoculated soil, RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl. and the mixture treatment influenced positively the yield.

To proof an integration of antagonists in an IPM strategy their compatibility with chemical pesticides was tested. When mixed for at most four hours only few fungicides reduced germination of the antagonistic fungi. The germination of the bacterial antagonist was not influenced by any tested chemical pesticides.

The products RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl. and Trichostar<sup>®</sup> were tested on commercial strawberry fields of two farms in the Rhein-Main area, in which *Verticillium*-wilt was reported. On field D the fruit yield in 2013 was increased up to 21% when treated with RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl. On field G the maximum increase (about 10%) was achieved using Trichostar<sup>®</sup>. Although these increases were not confirmed in 2014, similar tendencies were recognized. On field D, with just one treatment of Trichostar<sup>®</sup> in 2013, the yield increase in 2013 and 2014 was 8 and 9%, respectively. On field G, RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl. was applied both years and the increase was about 6% each year.

Our results demonstrate that micro-organisms can promote health and can stabilize or increase yield of strawberries under field conditions.

Principle investigator: Isabella Linda Bisutti

Project responsible: Dr. Dietrich Stephan

Tel. 06151-407238

E-mail: [Dietrich.Stephan@jki.bund.de](mailto:Dietrich.Stephan@jki.bund.de)

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung.....	6
1.1.	Gegenstand des Vorhabens .....	7
1.2.	Ziele und Aufgabenstellung des Projektes.....	7
1.3.	Planung und Ablauf des Projektes .....	7
1.3.1.	Chronologischer Arbeitsplan .....	9
1.3.2.	Meilensteine.....	9
2.	Wissenschaftlicher und Technischer Stand an den angeknüpft wurde .....	10
3.	Material und Methoden .....	14
3.1.	Nachweis von Pathogenen und Antagonisten in Boden und Pflanze .....	15
3.2.	Einfluss der Antagonistenausbringung auf die Mikrosklerotienbildung von <i>Verticillium dahliae</i> .....	16
3.2.1.	Laborversuche .....	16
3.2.2.	Freilandversuche .....	16
3.3.	Kompatibilität mit Pflanzenschutzverfahren .....	17
3.4.	Optimierung der Applikation von Mikroorganismen .....	17
3.5.	Überprüfung der Wirksamkeit in Erdbeerkulturen.....	18
3.5.1.	Laborversuche mit Erdbeersämlingen .....	18
3.5.2.	Versuche mit getopften Erdbeerpflanzen unter kontrollierten Bedingungen.....	18
3.5.3.	Versuche auf dem JKI-Versuchsfeld .....	19
3.5.4.	Versuche auf Betrieben im Raum Darmstadt/Frankfurt.....	20
3.5.5.	Zusammenarbeit mit Verbundpartnern und anderen Versuchsanstellern .....	21
4.	Ausführliche Darstellung der Wichtigsten Ergebnisse.....	22
4.1.	Nachweis von Pathogenen und Antagonisten in Boden und Pflanze .....	22
4.2.	Einfluss der Antagonistenausbringung auf die Mikrosklerotienbildung von <i>Verticillium dahliae</i> .....	23
4.2.1.	Laborversuche .....	23
4.2.2.	Freilandversuche .....	24
4.3.	Kompatibilität mit Pflanzenschutzverfahren .....	25
4.4.	Optimierung der Applikation von Mikroorganismen .....	27
4.5.	Überprüfung der Wirksamkeit in Erdbeerkulturen.....	30
4.5.1.	Laborversuche mit Erdbeersämlingen .....	30
4.5.2.	Versuche mit getopften Erdbeerpflanzen unter kontrollierten Bedingungen.....	30
4.5.3.	Versuche auf dem JKI-Versuchsfeld .....	33
4.5.4.	Versuche auf Betrieben im Raum Darmstadt/Frankfurt.....	39
4.5.5.	Zusammenarbeit mit Verbundpartner und anderen Versuchsanstellern .....	42
5.	Diskussion der Ergebnisse.....	43
6.	Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	45

7.	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächliche erreichte Ziele .....	46
8.	Zusammenfassung.....	47
9.	Literaturverzeichnis .....	48
10.	Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektteilnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt .....	52
11.	Anhang I .....	54

## 1. Einführung

Ungefähr 2800 Betriebe bauen in Deutschland auf fast 20.000 Hektar Erdbeeren an. Diese Fläche entspricht ungefähr 10% der gärtnerischen Nutzfläche. Aber nur etwa 300 Betriebe produzieren auf weniger als 800 Hektar Bio-Erdbeeren, so dass diese eine vergleichsweise untergeordnete Rolle spielen. Die hohe Verbrauchernachfrage nach ökologisch produzierten Erdbeeren kann derzeit nur durch Importe gedeckt werden. Wegen der geringen Haltbarkeit der Früchte sind die Transporte mit besonders hohen Kosten und Umweltbelastungen allerdings wenig nachhaltig. Mehrere Forschungseinrichtungen initiierten in enger Zusammenarbeit mit Beratern und Betrieben Forschungsprojekte mit dem Ziel, biologische Verfahren für den ökologischen und integrierten Anbau bereitzustellen.

Mikrobiologische Präparate könnten ähnlich wie in anderen Kulturen geeignet sein, wichtige Krankheiten und Schadinsekten der Erdbeere an Wurzel, Blatt und Frucht erfolgreich zu regulieren. Daher ist die Erforschung und Entwicklung biologischer Verfahren zur Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen der Erdbeere ein wichtiger Beitrag zur Sicherung der regionalen, umweltfreundlichen und wirtschaftlich tragbaren Erdbeerproduktion.

Im Rahmen des zuvor vom Bundesprogramm zur Förderung des Ökologischen Landbaus und anderen Formen der nachhaltigen Landwirtschaft (BÖLN) geförderten Projektes „Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren Teilprojekt: Bodenbürtige Krankheitserreger“ (06OE155) wurden 98 Antagonisten gegen vier Pathogene (*Verticillium albo-atrum*, *V. dahliae*, *Phytophthora cactorum*, *P. fragariae* var. *fragariae*) *in vitro* getestet. Einige der getesteten Antagonisten wiesen gegen alle vier Pathogene eine Wirkung auf. Von diesen wurden 15 Antagonisten für *in vitro*-Kompatibilitätstests und anschließend drei Antagonisten für *ad planta*-Versuche ausgewählt.

Der Stamm *Trichoderma harzianum* T58 aus dem Produkt Trichostar® wurde gewählt, weil dieser in den Versuchen ein sehr gutes Ergebnis zeigte und als Produkt verfügbar ist. Bei *M. brunneum* Ma43 handelt es sich um einen insektenpathogenen Pilz, der u. U. gegen den Erdbeerblütenstecher eingesetzt werden kann und auch eine gute Wirkung gegen die vier Pflanzenkrankheiten hatte. *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 war von den vier getesteten Bakterien das aussichtsreichste Bakterium und ist als Produkt verfügbar.

### **1.1. Gegenstand des Vorhabens**

Im Projekt sollten mit diesen drei Antagonisten und deren Mischung *ad planta*-Versuche unter kontrollierten Bedingungen gegen *V. dahliae* und *P. cactorum* im Gewächshaus und im Freiland durchgeführt werden. Auch sollten die Verfahren auf Praxisbetrieben getestet werden. Und flankierende Laborversuche das Forschungsvorhaben entsprechend abrunden.

### **1.2. Ziele und Aufgabenstellung des Projektes**

Hauptziel des Projektes war die Entwicklung eines nachhaltigen Applikationssystems zur Regulierung eines Schaderregerkomplexes durch mikrobiologische Präparate im ökologischen aber auch integrierten Erdbeeranbau. Im Rahmen des hier beschriebenen Teilprojektes wurde sich auf die zwei bodenbürtigen Krankheitserreger *V. dahliae* und *P. cactorum* sowie begleitende Untersuchungen zum Einsatz insektenpathogener Pilze zur Bekämpfung von Schadinsekten beschränkt. Folgende Fragen sollten bearbeitet werden:

- Können bodenbürtige bzw. wurzelinfizierende Krankheitserreger der Erdbeere mit mikrobiologischen Präparaten (Pflanzenstärkungs- und Pflanzenschutzmittel) effektiv reguliert werden?
- Beeinflussen (positiv wie negativ) solche Präparate u. U. das Auftreten anderer Schaderreger?
- Gibt es Wechselwirkungen zwischen den nützlichen Mikroorganismen und können mikrobiologische Präparate so kombiniert werden, dass ein Schaderregerkomplex effektiv reguliert werden kann?
- Kann durch optimierte Applikationstechnik die Wirksamkeit der antagonistischen Mikroorganismen verbessert werden?
- Können Antagonisten in ein biologisches wie integriertes Erdbeeranbausystem integriert werden?

### **1.3. Planung und Ablauf des Projektes**

In den zuvor durchgeführten Versuchen unter kontrollierten Bedingungen konnten keine eindeutigen Krankheitssymptome an den als empfindlich beschriebenen Sorten beobachtet werden. Nur durch Aufschneiden der Erdbeerrhizome wurden schwache Symptome erfasst. Obwohl im Boden der Versuchsfläche hohe Konzentrationen an Mikrosklerotien (MS) nachgewiesen wurden, konnten nur leichte Symptome bonitiert werden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass mit der gängigen Nachweismethode der MS-Konzentration im



Boden nicht zwischen *V. dahliae* und *V. longisporum* unterschieden werden kann. Daher sollte des Projektes ein eindeutiger Nachweis auf Art-Ebene mittels PCR und spezifischer Primer für die Versuchsauswertung mit herangezogen werden. Versuche des vorangegangenen Projektes deuteten darauf hin, dass nach Behandlung mit einem Gemisch aus *B. subtilis*, *T. harzianum*, *T. atroviride* und *M. brunneum* die MS-Konzentration im Boden reduziert werden konnte. Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurden auf den zwei Betrieben über die gesamte Versuchsdauer regelmäßig Bodenproben gezogen und die Konzentration an MS von *V. dahliae* bestimmt.

Entsprechend des Projektantrages wurde Laborversuchen geprüft, inwieweit chemische Pflanzenschutzverfahren einen Einfluss auf potentielle Antagonisten haben können.

Die Ausbringung der Antagonisten insbesondere des nicht kommerziell verfügbaren Pilzes *M. brunneum* Ma43 sollte optimiert werden. Laut Projektantrag war geplant, sich auf die Sprühapplikation zu konzentrieren. Da aber *M. brunneum* Ma43 einen Einfluss auf die bodenbürtigen Pflanzenkrankheiten zeigte, sollten verbesserte Formulierungen für eine Bodenapplikation entwickelt werden.

Da die Versuche zur Wirksamkeit in Erdbeerkulturen im abgelaufenen Projekt noch nicht abgeschlossen werden konnten, wurden diese fortgeführt. Aufgrund der langen Inkubationszeit wurden neben der visuellen Befallsbonitur weitere sekundäre Infektionsmerkmale (Chlorophyllfluoreszenz, Enzymaktivität) bzw. ein quantitativer, molekularbiologischer Nachweis in die Versuchsauswertung mit einbezogen. Auch sollten Versuche an Erdbeersämlingen und getopften Erdbeerpflanzen sowie Versuche auf dem institutseigenen Versuchsfeld bzw. auf Praxisbetrieben durchgeführt werden.

Entsprechend des abgelaufenen Projektes sollte ein enger Austausch mit den Verbundprojektpartnern Hochschule Geisenheim und BIOLAND/Föko über Projekttreffen gewährleistet werden. Bei Bedarf sollten Versuchsflächen der Verbundpartner bezüglich *V. dahliae* und *P. cactorum*-Vorkommen ausgewertet werden. Entsprechend wurde die Hochschule Geisenheim in die Versuchsplanung mit einbezogen, so dass gegebenenfalls auch der Befall mit Blatt-/Fruchtpathogenen mit erhoben werden konnte.

### 1.3.1. Chronologischer Arbeitsplan

Arbeitsplan Jahr	2012				2013				2014	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Nachweis von Pathogen und Antagonist										
Einfluss der Antagonisten auf die MS Bildung Freilandversuche										
Kompatibilität mit Pflanzenschutzverfahren										
Optimierung der Applikation von Mikroorganismen										
Überprüfung der Wirksamkeit in Erdbeerkulturen										
Laborversuche mit Erdbeersämlingen										
Versuche unter kontrollierten Bedingungen										
Versuche auf dem JKI-Versuchsfeld										
Versuche auf Betrieben										
Zusammenarbeit										
Meilensteine			1				2			3,4

### 1.3.2. Meilensteine

- M1: Bewertung der Kombinierbarkeit von mikrobiologischen Präparaten mit chemischen Pflanzenschutzmitteln im Labor
- M2: Bewertung der Wirksamkeit und Kombinierbarkeit von mikrobiologischen Präparaten unter kontrollierten Bedingungen
- M3: Bewertung des Einsatzes mikrobiologischer Präparate im Freiland und Erstellung einer Applikationsstrategie für eine Anwendung in der Praxis
- M4: Bewertung der Integrierbarkeit mikrobiologischer Präparate im biologischen wie integrierten Erdbeeranbau

## 2. Wissenschaftlicher und Technischer Stand an den angeknüpft wurde

Erdbeeren stellen für den Verbraucher nach dem Apfel die beliebteste Frucht der Deutschen dar. Sie sind reich an Inhaltsstoffen aber auch leicht verderblich und anfällig für Krankheiten. Pilzliche Krankheitserreger kommen sowohl an Frucht, am Blatt wie an unterirdischen Pflanzenteilen vor. Mangels wirksamer Alternativen beschränkt sich die Regulierung von Schaderregern im ökologischen Erdbeeranbau vornehmlich auf pflanzenbauliche Maßnahmen und die Wahl weniger anfälliger Sorten. So wird z. B. versucht, über die Reduktion des organischen Düngereinsatzes oder veränderte Pflanzabstände die Anfälligkeit gegenüber pilzlichen Krankheitserregern zu reduzieren (Zimmer 2008). Grundsätzlich wäre auch der Einsatz von mikrobiologischen Präparaten (BCAs = biocontrol agents) bei Erdbeeren möglich. Zahlreiche kommerzielle und semi-kommerzielle BCAs sind für verschiedene Krankheiten und Schädlinge an Erdbeere verfügbar. In der Praxis wird jedoch eine geringe Akzeptanz der BCAs beobachtet. Einer umfassenden Studie zufolge (Moser et al. 2008) sind es vor allem drei Gründe, die dem Einsatz von BCAs aus der Sicht der Anbauer entgegenstehen: i. unzureichende Befallsreduzierung, ii. hohe Empfindlichkeit gegenüber Witterungsbedingungen und iii. zeitspezifische Applikation.

Da im vorgesehenen Teilprojekt die bodenbürtigen bzw. wurzelinfizierenden Krankheitserreger an Erdbeeren untersucht werden sollten, wird im Folgenden der Stand des Wissens für die biologische Bekämpfung dieser besonders wichtigen Erdbeerkrankheiten näher erläutert.

Die *Verticillium*-Welke (Erreger: *Verticillium albo-atrum* (Rke. et Berth.) und *V. dahliae* (Kleb.)) hat an wirtschaftlicher Bedeutung in den letzten Jahren gewonnen, weil qualitativ hochwertige und ertragsreiche Erdbeersorten stark anfällig sind (Dathe 1994). Die zwei Pilze unterscheiden sich geringfügig, so dass man sie öfter nur einer Art zuordnet. Beide Arten sind bei mehr als 200 verschiedenen dikotyledonen Pflanzen als Erreger bekannt (Fradin und Thomma 2006). *V. dahliae* produziert MS, die als Überdauerungsformen fungieren und für die Erstinfektion verantwortlich sind. Hinzu kommt, dass diese melanisierten Strukturen mehr als eine Dekade im Boden überleben können. Ihre Keimung und die folgende Wurzelinfektion wird von Wurzelexsudaten stimuliert (Debode et al. 2007).

Das typische Schadbild äußert sich durch Welken und Absterben der äußeren Blätter. Anfällige Sorten sterben ab, während weniger anfällige Sorten mit Ertragsreduktion reagieren (Dathe 1994).

Um die *Verticillium*-Welke regulieren zu können, muss auf ein integriertes Management mit resistenten/robusten Sorten und Anbaupraktiken zur Reduktion der Krankheit zurückgegriffen werden (Erdogan und Benlioglu 2010).

Zur Reduzierung der MS werden Solarisation, chemische Bodenfumigation oder Fruchtfolge praktiziert. Solarisation kann nur in Regionen mit geeigneten klimatischen Bedingungen angewendet werden (Fradin und Thomma 2006). Fruchtfolgen mit kurzer Rotation haben wegen der langen Persistenz der MS im Boden wenig Erfolg (Fradin und Thomma 2006). Die chemische Fumigation ist weder im biologischen noch im konventionellen Anbau möglich. Eine andere anbautechnische Methode, die im biologischen Anbau praktiziert werden könnte, wäre die Untermischung von „grüner Biomasse“, gefolgt von einer Solarisation. Das *Verticillium*-Inokulum konnte mit dieser Methode um 75% reduziert werden (Eikemo et al. 2003, Lamers et al. 2008). In Indien (Subbarao et al. 2007) erbrachte eine Rotation mit Broccoli und Rosenkohl positive Ergebnisse und in der Schweiz wurde durch Einarbeiten von braunen Senfpflanzen in den Boden das Sklerotienvorkommen um 25% reduziert (Michel et al. 2006). Neben der Suche nach geeigneten Sorten und anbautechnischen Maßnahmen stellt die mikrobiologische Bekämpfung der *Verticillium*-Welke mit antagonistischen Mikroorganismen eine Alternative dar (Berg et al. 2001, Berg et al. 2006). Hier kommen besonders pilzliche Antagonisten, Mykorrhiza-Pilzen und antagonistischen Rhizobakterien in Frage (Fradin und Thomma 2006). Als Mikroorganismen mit antagonistischem Potential wurden *B. subtilis*, *T. harzianum*, *Serratia plymuthica* (Kurze et al. 2001) und *Talaromyces flavus* (<http://www.dbu.de/PDF-Files/GGTSPU-styx2.bba.de-27850-1728022-DAT/A-05129.pdf>) identifiziert. Fluoreszierende Pseudomonaden hemmen nicht nur das Wachstum des Pilzes (Erdogan und Benlioglu 2010), sondern eignen sich auch als Antagonisten der MS (Debode et al. 2007). *T. flavus* reduzierte sowohl den Krankheitsbefall an Pflanzen als auch die Vitalität der MS (Marois et al. 1984).

Bei Verwendung resistenter Erdbeersorten-Genotypen muss bedacht werden, dass trotz Resistenz der Pilz ins Xylem eindringen kann. Das kann dazu führen, dass im Boden die Mikrosklerotienkonzentration sogar ansteigt und eine sukzessive Bepflanzung mit anfälligen Sorten nahezu unmöglich wird. Hinzu kommt, dass sich die Resistenz während der langen Vegetationsperiode oder unter verschiedenen Umweltbedingungen je nach Resistenzmechanismus unterschiedlich entfalten kann (Shaw et al. 2010).

Im April 2011 begann ein zweijähriges Projekt, in dem das ZALF gemeinsam mit Obstanbauern, Beratern und Pflanzenschutzmittelhersteller, Verfahren und Impfmethode mit apathogenen Subtypen von *Verticillium* spp. prüfen, ob Erdbeerpflanzen durch diese „Schutzbesiedlung“ vor den pathogenen Bodenpilzen geschützt werden können. Die Felderprobung wird auf Praxisbetrieben in Brandenburg getestet (Weitere Informationen: [www.zalf.de](http://www.zalf.de)).

Die Rhizomfäule (Erreger: *Phytophthora cactorum*) wurde in Deutschland zum ersten Mal 1952 beschrieben (Van Der Scheer 1971). Dieser Erreger ist inzwischen weit verbreitet und einer der

destruktivsten Erdbeer-Pathogene. Die Krankheit tritt sporadisch auf, aber dann ist der Ausfall beachtlich (Porras et al. 2007).

Hauptinfektionszeit sind die Monate Juli und August. Hohe Temperaturen und Probleme bei der Wasserversorgung fördern die Infektion. Die Schadsymptome zeigen sich vier Wochen nach der Pflanzung oder im Frühjahr nach der Blüte. Oberirdische Pflanzenteile welken, verbräunen und sterben anschließend ab. Im Rhizom sind braune oder rotbraune verfärbte faule Stellen sichtbar. Die Krankheitserreger verbleiben lange Zeit als Sporen (Diasporen/Oosporen und Chlamydosporen) im Boden, Staunässe und hohe Temperaturen begünstigen den Befall.

Als kulturtechnische Maßnahmen stehen die Verwendung von gesundem Pflanzengut, eine gute Bodendränage und Pflanzung auf Dämmen zur Verfügung. Die Verwendung von Bion und Chitosan 20 Tage vor der Inokulation des Pathogens, bewirkte eine signifikante Reduktion der Krankheit (Eikemo et al. 2003). Die Kombination von Solarisation und *Trichoderma*-Applikation reduzierte die *P. cactorum*-Population im Boden (Porras et al. 2007). Auch bei *P. cactorum* hat *S. plymuthica* eine Wirkung erzielt (Kurze et al. 2001).

Am Institut für Biologischen Pflanzenschutz des JKI in Darmstadt wurden im Rahmen des BLE-Projekts 02OE093 "Biologische Regulierung von bodenbürtigen *Phytophthora*-Krankheiten an Erdbeeren" gegen die zwei *Phytophthora*-Arten verschiedene Bakterien getestet: *Routella terrigena* (G-584), *B. amyloliquefaciens* (G-V1) und *Pseudomonas fluorescens* (2R1-7) erbrachten die besten Ergebnisse (Anandhakumar und Zeller 2008, Kurze et al. 2001).

Der Erdbeerblütenstecher *Anthonomus rubi* ist das bedeutendste Schadinsekt in Erdbeeren. Für den konventionellen Erdbeeranbau stehen eine Reihe chemischer Insektizide zur Verfügung (siehe BVL.de). Zur biologischen Bekämpfung des Erdbeerblütenstechers stehen derzeit keine entsprechenden Pflanzenschutzmittel zur Verfügung. Zwar wurden zur biologischen Bekämpfung verschiedener *Anthonomus*-Arten Parasitoide und Predatoren beschrieben, zur Bekämpfung mit den insektenpathogenen Pilzen *M. brunneum* und *Beauveria bassiana* wurden aber bisher nur Arbeiten für verwandte Arten, wie dem Baumwollkapselkäfers *A. grandis*, und dem gefurchten Dickmaulrüssler *Otiorhynchus sulcatus* an Erdbeere veröffentlicht (Cross et al. 2001, Moorhouse et al. 1992, Sabbahi et al. 2008, Sabbahi et al. 2009, Stol'nikova und Shamanskaya 2002). Da die beiden insektenpathogenen Arten *B. bassiana* und *M. brunneum* nicht artspezifisch wirken, ist es wahrscheinlich, dass diese auch gegen den Erdbeerblütenstecher eingesetzt werden können.

Für den insektenpathogenen Pilz *M. brunneum* Ma43 kommen derzeit Granulatformulierungen zum Einsatz, die wegen möglicher Konidienstäube kritisch bewertet werden. Granulate bieten allerdings den Vorteil, in den Boden eingearbeitet werden zu können. In den Boden eingebracht,

wächst der Pilz auf dem Granulat aus, sporuliert und die Pilzspore können empfindliche Insekten befallen. und anschließend im Boden auf dem Granulat auswachsen.

Eine Anwendungsstrategie für insektenpathogene Pilze besteht darin, diese Granulate in das Pflanzsubstrat oder bei der Pflanzung mit einzuarbeiten. Dies kann über herkömmliche Düngerstreuer z.B. der Firma Lehner geschehen.

### 3. Material und Methoden

#### Pflanzmaterial und verwendete Organismen

**Erdbeerpflanzen:** Für alle Versuche wurden Frigo-Pflanzen der cv. Honeoye der Firma KRAEGE Beerenpflanzen GmbH & Co. KG bezogen. Diese wurden bis zur Pflanzung bei 4 °C gelagert.

**RhizoVital® 42 fl.** (*Bacillus amyloliquefaciens* Stamm FZB42) wurde von der Firma Abitep GmbH für Versuchszwecke zur Verfügung gestellt und entsprechend der Produktinformationen verwendet (0,1% Suspension entsprechen nach Angaben des Herstellers  $2,5 \times 10^7$  Sporen pro mL Produkt).

**Trichostar®** (*Trichoderma harzianum* T58) wurde von der Firma Gerlach GmbH & Co. KG bezogen und entsprechend der Produktinformationen verwendet (1% Suspension entsprechen nach Angaben des Herstellers  $10^5$  Sporen/mL) und zur Aktivierung vier Stunde vor Ausbringung in warmen Wasser suspendiert.

**Metarhizium brunneum Ma43** wurde im Prophyta-Laborfeststoff-Fermenter auf einem 5:1 Reis-Hafer-Gemisch für 14 Tage bei 25 °C im Dunkeln fermentiert. Die Körner wurden mit einer Maschenweite von 150 µm gesiebt und als Konidienpulver im Kühlschrank bei 5 °C gelagert. Für die Versuche wurden diese mit Tween® 80 (0,1%) auf  $10^5$  keimende Sporen/mL eingestellt. Es wurde ein **Gemisch** aus den Antagonisten mit jeweils 100% der Aufwandmenge hergestellt.

**Phytophthora cactorum** Stamm A1 wurde aus einer kranken *Fragaria x ananassa* 1983 re-isoliert. Der Stamm wurde vom JKI-Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst zur Verfügung gestellt. Zur Produktion von Myzel wurden bewachsene Agarstücke abgewaschen und die Suspension in flüssigem V8 Medium bei 20 °C im Dunkel für 2 bis 4 Wochen fermentiert. Danach wurde die Myzelsuspension mit einem autoklavierten Vermiculit-Weizenkleie Gemisch (im Folgenden als Vermiculit bezeichnet) vermischt und bei 20 °C im Dunkeln für mindestens 6 Wochen inkubiert. Die Vermiculit/Pc Myzel Mischung wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

**Verticillium dahliae:** Vier Stämme (EP227, EP503, EP564 und EP650) mit unterschiedlich schädigender Wirkung (von stark bis mittel-schwach) wurden vom JKI-Institut für Züchtungsforschung an gartenbaulichen Kulturen u. Obst zur Verfügung gestellt. Zur Produktion von Myzel und MS wurden bewachsene Agarstücke in flüssigem CD-Medium bei 20 °C, 100 rpm im Dunkeln fermentiert. Nach 14 Tage wurden 20 mL dieser Vorkultur als Inokulum eines autoklavierten Quarzsand-Roggenmehl Gemisch (im Folgenden als Sand bezeichnet) verwendet. Nach Durchmischung des Sandes wurde dieser in 300-mL Kolben bei 20 °C im Dunkeln sechs

Wochen bebrütet. Danach wurde die Sand/MS Mischung luftgetrocknet, gesiebt (1 mm Maschenweite) und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

### **3.1. Nachweis von Pathogenen und Antagonisten in Boden und Pflanze**

#### **Molekularbiologische Nachweismethoden**

Um pilzliche DNA aus Reinkultur, Pflanzenmaterial oder Bodenproben zu extrahieren, wurden verschiedene Methoden (Doyle und Doyle 1987; Möller et al. 1992; Reineke et al. 1998; Edwards et al. 1991) verwendet. Als fertige Kits wurden DNeasy Plant Kit (Qiagen), Fast Prep + DNeasy Plant Kit (Qiagen), Bodenkit von MP und Fast Prep + Bodenkit von MP getestet. Inkubationszeiten und Zentrifugationsschritte wurden gegebenenfalls angepasst. Die Methode Fast Prep + DNeasy Plant Kit (Qiagen) wurde auch mit in V8 Flüssigmedium angezogenen *P. cactorum* getestet. Die benutzte PCR Protokolle sind im Anhang aufgeführt.

#### **β-Glucanase und Chlorophyll-Fluoreszenz Messung**

Erdbeerpflanzen wurden eine Woche nach Pflanzung infiziert:

- mit *V. dahliae*: die Pflanzen wurden herausgenommen, abgewaschen, abgeschnitten und in eine *V. dahliae* -Konidiensuspension für einen Tag getaucht. Nach Pflanzung fand eine wöchentliche Behandlung mit den Antagonisten statt. Die Töpfe wurden einmal wöchentlich in Wasser getaucht und anschließend einem Trockenstress ausgesetzt.
- mit *P. cactorum*: das Rhizom wurde seitlich angeschnitten, mit *P. cactorum* Myzel bewachsenem Agarstück in die Schnittwunde gelegt und zum Erreichen einer hohen Luftfeuchte für drei Tage in ein Zimmer-Gewächshaus inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen in das Institutsgewächshaus überführt und bei Bedarf bewässert. Nach zwei Wochen erfolgte eine zweite Inokulation durch Angießen mit einer Sporensuspension.

Die β-Glucanase Messung wurde 7 und 8 Wochen nach Versuchsbeginn, die Chlorophyll-Fluoreszenz Messung ab der 5. Woche an Blättern durchgeführt und das Auslegen auf Agar-Platten (siehe unten) erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten.

#### **Auslegen von Pflanzenteilen auf Agar-Platten**

Für die Reisolierung der Pilzpathogene wurden Pflanzen entnommen, gespült, Blätter und Wurzeln entfernt. Danach wurde eine Oberflächendesinfizierung mit NaOCl durchgeführt und diverse Kronen- und Rhizomstücke auf SNA und MSA (siehe Anlage) ausgelegt. Die Platten wurden anschließend bei 20 °C im Dunkeln für zwei Wochen inkubiert (Methode von Frau



Gossmann, persönliche Mitteilung). Für Paralleluntersuchungen wurden auch ganze Pflanzen an Frau Gossmann (Humboldt-Universität zu Berlin) geschickt.

### **Reisolierung der Antagonisten mittels Selektivmedien**

Die Selektivmedien für *Metarhizium* und *Trichoderma* wurden laut Rezept (siehe Anhang) vorbereitet. Um die Selektivität der Medien zu testen, wurden verschiedene Pilz- und Bakteriengattungen bzw. -arten auf den Agar-Platten ausgestrichen und das Wachstum bonitiert. Es wurden zwei Wiederholungen angesetzt.

## **3.2. Einfluss der Antagonistenausbringung auf die Mikrosklerotienbildung von *Verticillium dahliae***

### **3.2.1. Laborversuche**

Die Wachstumstests bei 7 °C wurden für *B. amyloliquifaciens* FZB42 in TSB und für *T. harzianum* T58 und *M. brunneum* Ma43 auf PDA und MPA durchgeführt. Für *B. amyloliquifaciens* FZB42 wurde die optische Dichte ermittelt, für die Pilze das Radialwachstum. *V. dahliae* MS wurden auf PEM gestreut und die Keimfähigkeit bei 7 °C bestimmt.

Der Einfluss auf die Bildung sekundärer MS wurde mit *T. harzianum* T58 in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Dazu wurden 990 µL *T. harzianum* T58 Sporensuspension (in 0,01% Tween® 80) mit 10 µL *V. dahliae* MS Suspension gemischt und bei 7 °C inkubiert. Nach 7 und 14 Tage wurden 50 µL auf PEM-Platten ausplattiert und bei 20 °C im Dunkeln zwei Wochen inkubiert. Anschließend wurden die MS mikroskopisch ausgewertet.

### **3.2.2. Freilandversuche**

Um den Einfluss der Antagonisten auf die MS-Entwicklung im Freiland zu verfolgen, wurden zu verschiedenen Terminen Bodenproben in den zwei Betrieben genommen. Hierfür wurden bei jeder Wiederholung vier Bohrproben zwischen Erdbeerpflanzen gezogen. Eine Mischprobe aus den vier Wiederholungen wurde mit Hilfe der Nasssiebmethode nach Neubauer und Heitmann (2011) analysiert.

### **3.3. Kompatibilität mit Pflanzenschutzverfahren**

Um die Kombinierbarkeit von mikrobiologischen Präparaten mit chemischen Pflanzenschutzmitteln zu prüfen, wurden chemische Pflanzenschutzmittel und mikrobiologische Präparate entsprechend der empfohlenen Aufwandmenge gemischt und anschließend bei Zimmertemperatur für vier Stunden inkubiert. Direkt nach Mischung als auch nach Inkubation wurde die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen geprüft. Die getesteten Pflanzenschutzmittel sind in Tabelle A2 im Anhang aufgeführt.

Als mikrobiologischer Präparate wurden RhizoVital® 42 fl. und Trichostar® getestet. Beide Präparate wurden in Leitungswasser suspendiert und mit dem chemischen Produkt in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration gemischt. Für RhizoVital® 42 fl. wurden die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) ermittelt. Dazu wurden die Proben verdünnt und auf TSA mithilfe eines Spiralplaters ausplattiert (drei Platten pro Probe in dreifacher Wiederholung). Nach ca. 24 Stunden Inkubation bei 25 °C wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien gezählt. Zur Bestimmung der Keimfähigkeit konnte für Trichostar® allerdings nicht die empfohlene Konzentration von 1% verwendet werden sondern wurde in einer 10%igen Verdünnung verwendet. Zum Anreichern der Sporenkonzentration wurde die Suspension vor dem Ausplattieren zentrifugiert. Anschließend wurde das Zentrifugat ausplattiert. Zusätzlich wurden *M. brunneum* Ma43 Sporen auf ihre Verträglichkeit mit Pflanzenschutzmitteln getestet. Dafür wurde der Pilz wie oben beschrieben kultiviert und eine Suspension von  $10^7$  Sporen/mL in 0,1% Tween® 80 hergestellt. Für beide Pilze (Trichostar® und *M. brunneum* Ma43) wurden 100 µL auf MPA+ Platten verteilt und die Keimfähigkeit ermittelt. Hierzu wurde nach 24 Stunden das Auskeimen der Sporen mit Lactophenolblau abgestoppt und die Keimfähigkeit von jeweils dreimal 100 Konidien unter dem Mikroskop bestimmt.

### **3.4. Optimierung der Applikation von Mikroorganismen**

Bei diesen Untersuchungen handelt es sich um erste Versuche zur Sprühapplikation mikrobiologischer Präparate. Neben *M. brunneum* Ma43 und *P. fluorescens* Pf153 wurde noch das *B. thuringiensis* Produkt XenTari® mit in die Untersuchungen aufgenommen, da hier bereits gewisse Erfahrungen bei der Versuchsauswertung vorlagen. Die Applikation der drei Mikroorganismen erfolgte mit der Anlage Spray Lab, Fa. Schachtner. Pro Mikroorganismus wurden drei Erdbeerpflanzen besprüht. Vor der Applikation wurden von jeder Pflanze eine Blatt- und eine Blütenprobe als Kontrolle genommen. Die Applikation erfolgte mit einer

Fahrgeschwindigkeit von 3,5 km/h, 3 bar Düsendruck und einer Aufwandmenge von 400 L/ha bei einer Spritzhöhe von 52 cm bezogen auf die Topfoberkante. Vor und unmittelbar nach Applikation sowie nach 1, 2, 4 und 7 Tagen Inkubation wurden Proben gezogen und die Anzahl KBE bestimmt. Um einen ersten Eindruck zu erhalten, ob die Mikroorganismen durch UV-Licht inaktiviert werden, sollten die Pflanzen tagsüber dem Sonnenlicht ausgesetzt werden. Wegen starkem Regen war dies nur am zweiten und vierten Tag möglich.

Ein weiteres Ziel zur Verbesserung der Applikation war die Entwicklung einer neuartigen Granulat-Formulierung von *M. brunneum* Ma43. Im Zuge dieses Verfahrens wurden mittels Wirbelschichttrocknung Mycelfragmente auf Hirsekörner gecoatet. Zudem wurden in der Wirbelschichttrocknung verschiedene Biomassekonzentrationen und der Einfluss von Schutzstoffen auf die Überlebensfähigkeit von *M. brunneum* Ma43 getestet.

Die Wirbelschichttrocknung wurde bei den gewählten Einstellungen mit einer Eingangstemperatur von 50 °C betrieben. Innerhalb dieses Prozesses wurde eine Myzelsuspension auf 100 g Hirse gecoatet.

### **3.5. Überprüfung der Wirksamkeit in Erdbeerkulturen**

#### **3.5.1. Laborversuche mit Erdbeersämlingen**

Erdbeersamen der cv. Rügen wurden auf feuchtes Handtuchpapier in einer Gerda Schale mit Wasser bei Raumtemperatur zum Keimen aufgestellt. Allerdings war die Keimrate der Sämlinge für die Versuchsauswertung zu gering, so dass keine weiteren Versuche mit Sämlingen durchgeführt werden konnten.

#### **3.5.2. Versuche mit getopften Erdbeerpflanzen unter kontrollierten Bedingungen**

Als Substrat wurde ein Gemisch aus 75% Null-Erde (Fruhstorfer Erde) und 25% Perlit (v/v) verwendet. Anschließend wurde das Substrat mit Sand/MS oder Vermiculit/Pc Myzel Mischung inokuliert und auf eine Endkonzentration im Substrat von 1,5% bzw. 5% gebracht. Danach wurde alles in einem Teigmischer (Stufe 8) für 15 Minuten gemischt. Pro Behandlung wurden 18 Frigo-Pflanzen die Wurzel auf 13 cm eingekürzt bis zum Herzen für 15 Minuten in 2 L der Behandlungssuspension getaucht. Töpfe wurden mit Substrat oder inokulierter Substrat auf ein Gewicht von 0,7 kg befüllt. Anschließend wurden die vorbehandelten Pflanzen eingesetzt. Bei Wdh. 1 wurde der gefüllte Topf mit der behandelten Pflanze gewogen. Für Wdh. 2 und 3 wurde anschließend jede Pflanze einzeln gewogen und dann in einen nummerierten Topf eingepflanzt.

Die Versuche wurden im Gewächshaus durchgeführt. Um Randeffekte zu vermeiden, wurde die Position der Töpfe über die Versuchsdauer geändert.

Die Nachbehandlung mit den Antagonisten folgte (siehe Tabelle 1), sobald 80% der Pflanzen mindestens ein BBCH 61 erreicht hatten. Dazu wurden 200 mL Antagonisten pro Pflanze eingesetzt. Nach zwei Wochen und anschließend alle vier Wochen wurde mit Naturbell Pflanzendünger (flüssig) von COMPO gedüngt. Pro Düngung wurden 2 L pro Euroschale (sechs Töpfe) ausgebracht. Bewässert wurde bei Bedarf und am Wochenende nach Wetterprognose. Starb eine Pflanze ab, wurde nachgepflanzt, wobei nachgepflanzte Pflanzen bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden.

Zur Kontrolle des Läusebefalls wurden bei Bedarf *Chrysoperla carnea*-Larven bzw. Spruzit (1%ig) angewendet.

Die Versuchspflanzen wurden dreimal wöchentlich auf lebend und tot visuell bonitiert. Tote Pflanzen wurden entnommen und anschließend das Pflanzengewicht aufgenommen und das Rhizom auf Schadsymptome hin untersucht.

Bei der Auswertung wurden der Ertrag und Wachstumsparameter erfasst. Die Ableger und die Pflanzen wurden geerntet, gewaschen, luftgetrocknet, gewogen und anschließend oberirdische Pflanzenteile für ca. 90 h unterirdische für ca. 115 h bei 60°C getrocknet.

**Tabelle 1:** Zeitlicher Versuchsablauf der mit getopften Erdbeerpflanzen unter kontrollierten Bedingungen

	<b>Wdh 1</b>	<b>Wdh 2</b>	<b>Wdh 3</b>
Pflanzung	18.04.	25.04.	02.05.
Nachbehandlung	17.05.	24.05.	31.05.
Düngung	31.05. - 28.06. 26.07. - 22.08.	07.06. - 05.07. 02.08. - 30.08.	14.06. - 12.07. 09.08. - 06.09.
Bonitur Ableger	25.09.	02.10.	09.10.
Bonitur Pflanzen	16.10.	23.10.	30.10.

### 3.5.3. Versuche auf dem JKI-Versuchsfeld

#### Versuch 2011-2012

Am 29.06 und 14.07.2011 wurden die Felder A und B bepflanzt (Stephan und Bisutti 2011), um im Folgejahr die weitere Entwicklung der Pflanzen zu beobachten. Mitte März 2012 wurde aufgrund massiver Frostschäden der Versuch beendet. Eine letzte Bonitur erfolgte am 22-23.03.2012. Die Pflanzen wurden in lebend oder tot eingeteilt und die Rhizome wurden durchgeschnitten um eventuellen Befall zu erfassen. Danach wurde das Versuchsfeld mit

Kompost aus der Kompostierungsanlage angereichert und es wurden zwei Parzellen für weitere Versuche angelegt.

### **Versuch 2012-2013**

Die Neupflanzung von Frigo-Pflanzen war ursprünglich für Mitte/Ende Mai vorgesehen. Leider war in dieser Zeit das Feld so verunkrautet, dass die Pflanzung auf August verschoben werden musste. Die Vorbereitung der Antagonisten und Pathogene erfolgte entsprechend Kapitel 3). Vor Pflanzung wurden die Wurzeln der Pflanzen auf ca. 13 cm gekürzt und anschließend für 15 Minuten in die Antagonistensuspension getaucht.

Um eine *Verticillium*-Welke hervorzurufen, wurden für eine künstliche Pathogeninokulation ca. 2 g Sand/MS Mischung (produziert von drei *V. dahliae* Isolaten) in jedes Pflanzloch gegeben. Für die Inokulation mit *P. cactorum* wurden ca. 4 g einer Vermiculit/Pc Myzel Mischung verwendet. Für jede Behandlung wurden je drei Reihen in vier Wiederholungen gepflanzt. Die äußeren Reihen wurden entweder mit *V. dahliae* oder mit *P. cactorum* künstlich inokuliert. Die mittlere Reihe wurde nicht künstlich mit Pathogen infiziert. Jede Reihe wurde mit 25 Pflanzen (25 cm Pflanzabstand) und einem Reihenabstand von ca. 45 cm gepflanzt. Zur Unkrautregulierung wurde zwischen den Antagonisten-Varianten ein 50 cm breites Bändchengewebe gelegt. Bei trockener Witterung wurde bewässert. Am 13.09.2012 wurde eine Düngung durchgeführt. Am 25.05.2013 wurden die Pflanzen, die abgestorben waren, durch neue Frigo-Pflanzen ersetzt. Diese wurden nach Behandlung in die Pflanzlöcher der abgestorbenen Pflanzen gepflanzt. Die Pflanzung folgte dem Schema im Anhang Abbildung A1 und Abbildung A2.

Lufttemperatur sowie die Regenmengen wurden aufgezeichnet (Abbildung A4). Außerdem sollte die Bodentemperatur in 10 und 20 cm Tiefe gemessen werden. Da allerdings das Fühlerkabel regelmäßig von Tieren angenagt wurden, liegen über die Bodentemperaturen keine Messdaten vor. Ertrags- und visuelle Bonitur (Vitalität und Anzeichen von Symptomen) erfolgte an verschiedenen Terminen.

#### **3.5.4. Versuche auf Betrieben im Raum Darmstadt/Frankfurt**

Informationen über die Versuchsfelder der zwei Betriebe sind in Tabelle A3 im Anhang angegeben. Bei der Versuchsparzelle des Betriebes D handelt sich um ein Feld auf einer windigen Anhöhe. Die Versuchsparzelle grenzte an konventionell bewirtschaftete Erdbeerflächen an. Allerdings war die Parzelle trotz regelmäßigem Jäten stark verunkrautet. Die Kulturführung der Versuchsparzelle entsprach der Kulturführung der konventionell bewirtschafteten Nachbarfläche.

Bei Betrieb G wurde das Feld in ein Erdbeerbefeld integriert und wurde ebenfalls vom Landwirt entsprechend der konventionellen Fläche bewirtschaftet. Die Pflanzung folgte dem Schema des Betriebes (siehe Abbildung A3). Pro Variante wurden 25 Pflanzen in vier Wiederholungen gepflanzt.

Für beide Versuchsflächen wurde die Bodentemperatur in 10 und 20 cm Tiefe erfasst. Die Wetterdaten wurden von nahe liegenden Wetterstationen bezogen.

Bei der Auswertung wurden der Ertrag und visuelle Bonitur (Vitalität und Anzeichen von Symptomen) an verschiedene Termine durchgeführt.

### **3.5.5. Zusammenarbeit mit Verbundpartnern und anderen Versuchsanstellern**

Über jährliche Projekttreffen wurde ein Austausch zwischen den Verbundpartnern gepflegt. So konnten Erfahrungen der einzelnen Projektpartner in die Versuchsplanung mit einfließen. Darüber hinaus wurden zu den Projekttreffen Experten bzw. Gäste eingeladen, so dass bestimmte Fragestellungen und Erfahrungen, die nicht über das Projekt abgedeckt werden konnten, in die Projektplanung und –ausführung mit einfließen konnten. Auch fand ein reger Austausch mit örtlichen Einrichtungen wie dem Arbeitskreis Erdbeeranbau beim LLH Griesheim statt. In Zusammenarbeit mit der Hochschule Geisenheim wurde zu Projektende eine Abschlussveranstaltung „Ökologischer Erdbeeranbau“ durchgeführt, die sich an Multiplikatoren wie Berater und Versuchsansteller im ökologischen und konventionellen/integrierten Erdbeeranbau richtete.

## **4. Ausführliche Darstellung der Wichtigsten Ergebnisse**

### **4.1. Nachweis von Pathogenen und Antagonisten in Boden und Pflanze**

#### **Molekularbiologische Nachweismethoden**

Aus Bodenproben und von Reinkulturen auf Agarplatten wurde *V. dahliae* erfolgreich reisoliert. Allerdings konnte mit den verwendeten Extraktionsverfahren nicht verlässlich Pilzmaterial im Pflanzengewebe nachgewiesen werden.

Für *P. catorum* wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt, um die beste Annealing-Temperatur zu ermitteln. Bei alle getesteten Temperaturen konnten Banden bei ca. 180 bp erkannt werden.

#### **β-Glucanase Messung**

Wurde die Glucanaseaktivität nach 7 und 8 Wochen bestimmt, konnten keine messbaren Unterschiede zwischen inokulierten und nicht inokulierten Pflanzen nachgewiesen werden.

#### **Chlorophyll-Fluoreszenz Messung**

Auch bei der Chlorophyll-Fluoreszenz-Messung unterschieden sich die Y-Werte, die eine Auskunft auf eine Stressreaktion der Pflanze geben, nicht. Ein Infektionsverlauf konnte über diese Messungen nicht nachgewiesen werden.

#### **Auslegen von Pflanzenteilen auf Agar-Platten**

Die Auswertung erfolgte mit der Hilfe von Frau Gossmann an der Humboldt-Universität zu Berlin. Es konnten verschiedene Pilze sowie diverse Bakterieninfektionen beschrieben werden. Am häufigsten wurden *Penicillium*, *Cladosporium*, *Gliocladium* aber auch *Fusarium*, *Trichoderma* und *Verticillium* nachgewiesen. Leider wurden nur wenige Oomyceten der Gattung *Phytium* gefunden. Die Methode erwies sich als sehr zeitintensiv und destruktiv.

#### **Reisolierung der Antagonisten mittels Selektivmedien**

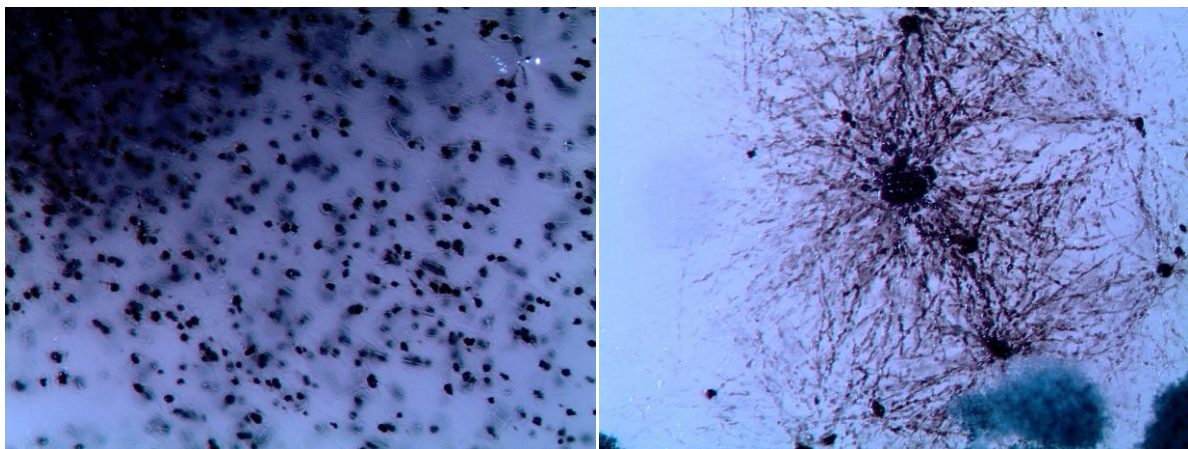
Nach zwei Wiederholungen konnte rein visuell kein Unterschied zwischen *Metarhizium* und *Trichoderma* auf dem jeweils anderem Selektivmedium festgestellt werden. Deshalb konnten diese Medien nicht für Versuche zur Reisolierung herangezogen werden.

Trotz der vielschichtigen Versuche, die Pathogene bzw. die Antagonisten zu reisolieren bzw. den Krankheitsverlauf auch über indirekte Messmethoden nachzuweisen, gelang es nicht reproduzierbare bzw. verlässliche Nachweismethoden zu etablieren.

## 4.2. Einfluss der Antagonistenausbringung auf die Mikrosklerotienbildung von *Verticillium dahliae*

### 4.2.1. Laborversuche

Wachstumstest bei 7 °C ergaben, dass *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *M. brunneum* Ma43 bei diesen niedrigen Temperaturen nicht wachsen. *T. harzianum* T58 dagegen zeigte nach zwei Wochen geringes Myzelwachstum. *V. dahliae* MS keimten bei 7 °C nach fast drei Wochen. Wurde *B. amyloliquefaciens* FZB42, *M. brunneum* Ma43 und *V. dahliae* anschließend bei 20-25 °C bebrütet, wuchsen diese aus.



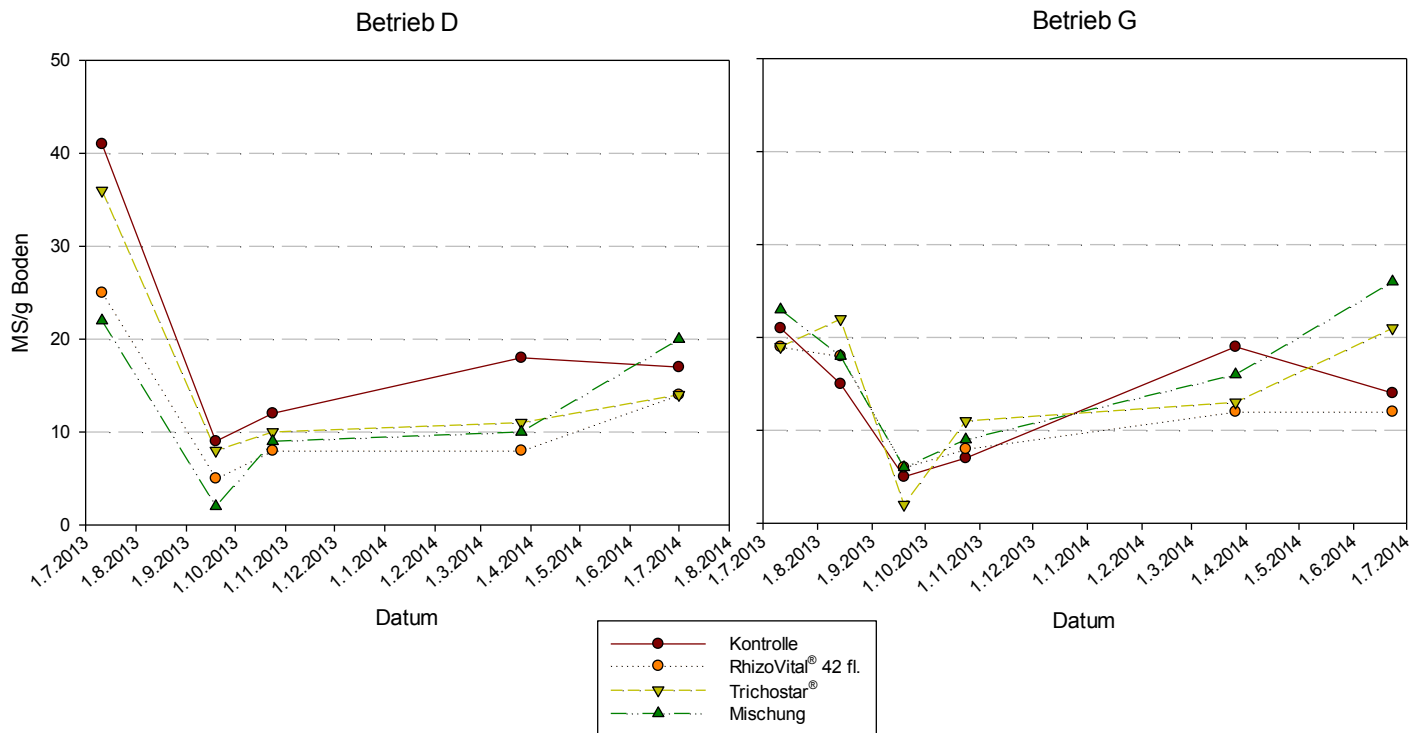
**Abbildung 1:** Sekundärmikrosklerotienbildung von *V. dahliae* auf PEM Agarplatten. Links Kontrolle und rechts nach einer Woche Inkubation mit  $10^3$  Sporen/mL *T. harzianum* T58 (gleiche Vergrößerung)

Aufgrund des geringen Wachstums von *B. amyloliquefaciens* FZB42 und *M. brunneum* Ma43 bei 7 °C kann davon ausgegangen werden, dass ein Ausbringen dieser Antagonisten im Herbst nur geringen Einfluss auf die MS-Bildung zu erwarten lässt. Bei *T. harzianum* T58 könnte dies aber günstiger bewertet werden. Weitere Kombinations-Laborversuche ergaben, dass *T. harzianum* T58 das Auskeimen der MS zwar nicht verhindern konnte, wohl aber die Anzahl sekundär gebildeter MS verringert war. Auch waren die Sekundär-MS nicht so kompakt (Abbildung 1). Zusätzlich zeigte sich, dass höhere Aufwandmengen an *T. harzianum* T58 tendenziell eine schlechtere Wirkung aufweisen. Für *Trichoderma harzianum* wurde immer wieder beobachtet, dass bei hohen Aufwandmengen eine schlechtere Wirkung beobachtet wurde und dies u.U. auf eine gewisse Keimhemmung zurückzuführen ist.



#### 4.2.2. Freilandversuche

Auf beiden landwirtschaftlichen Betrieben, bei denen Freilandversuche durchgeführt wurden, sollte auch die MS-Konzentration auf den Versuchsflächen über die Versuchszeit bonitiert werden. Die letzte Bonitur erfolgte nach Projektende im Juli 2014.



**Abbildung 2:** Einfluss der Anwendung verschiedener Antagonisten auf die MS-Konzentration von *V. dahliae* im Boden auf den Versuchsflächen der Betriebe D und G

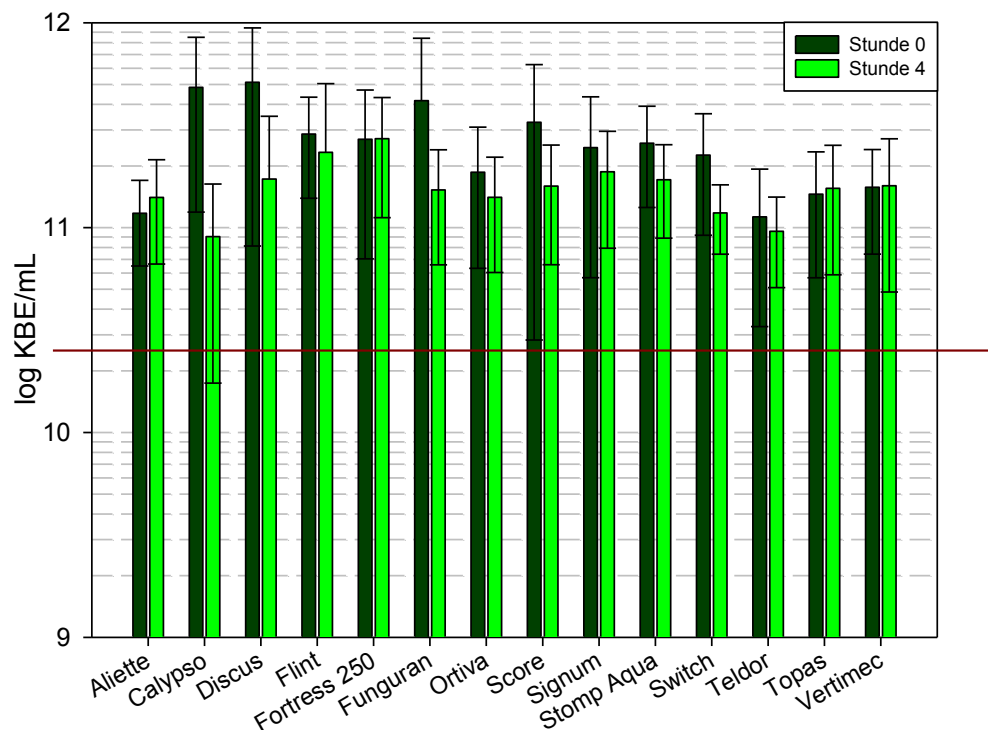
Auf dem Betrieb D (Abbildung 2 links) lag die MS-Dichte bei Pflanzung in 2012 bei 7,2 MS/g Boden auf dem gesamten Feld (Mischprobe). Im Folgejahr konnten deutliche Unterschiede zwischen den Varianten mit höchster Konzentration von 41 MS/g Boden (unbehandelte Kontrolle) und 22 MS/g Boden in der Mischung beobachtet werden. Über die Wintermonate stabilisierte sich der Wert, der tendenziell im Sommer wieder anstieg. Aufgrund der starken Verunkrautung in 2014 wurde hier keine Frühjahrsbehandlung mit den Antagonisten durchgeführt. Zu Versuchsende (Juli 2014) konnte die geringere MS-Konzentration nach Behandlung mit von RhizoVital® 42 fl. und Trichostar® bestätigt werden.

Wie auf dem Betrieb D nahm auch auf der Versuchsfläche des Betriebes G (Abbildung 2 rechts) die MS-Konzentration zwischen 76% in der Kontrolle und 89% in der Trichostar®-Behandlung über den Sommer 2013 ab. Die niedrigsten MS-Dichten wurden im September 2013 ermittelt. Über den Herbst/Winter nahm die MS-Konzentration unabhängig von den Behandlungen von 5

auf 19 MS/g Boden (Kontrolle) bzw. 6 auf 12 MS/g Boden (RhizoVital® 42 fl.) leicht zu, wobei auch hier auf den mit RhizoVital® 42 fl. und Trichostar® behandelten Flächen die niedrigsten MS-Konzentrationen ermittelt wurden. Die MS-Dichte stieg anders als in der Trichostar®- und Mischungsvariante in der RhizoVital®42 fl.- Behandlung nicht weiter an.

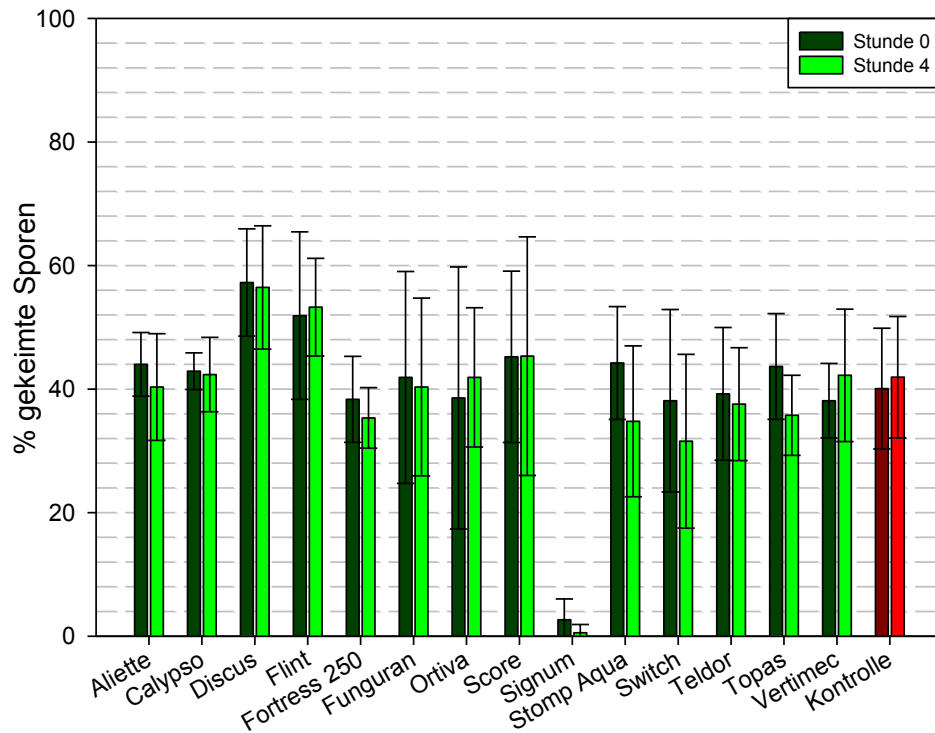
### 4.3. Kompatibilität mit Pflanzenschutzverfahren

Die getesteten Pflanzenschutzmittel zeigten keinen negativen Einfluss auf die Lebendzellzahl von RhizoVital® 42 fl. auch nach Suspendierung für vier Stunden im Pflanzenschutzmittel (Abbildung 3).

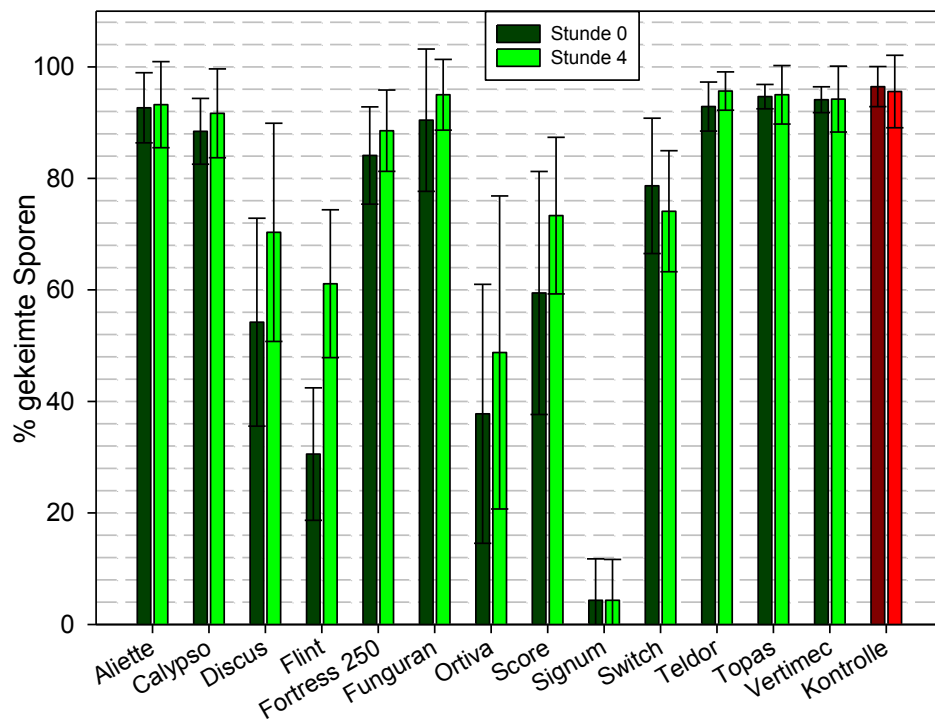


**Abbildung 3:** Einfluss chemischer Pflanzenschutzmittel auf die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) von RhizoVital® 42 fl. direkt nach Mischung bzw. nach vier Stunden Inkubation (in Braun die vom Produzent angegebene Mindestmenge von 25 Mrd/Sporen pro g Produkt)

Für Trichostar® konnte eine Hemmung nur durch das Fungizid Signum® beobachtet werden (Abbildung 4). Allerdings streute bei Trichostar® die Keimrate aller Varianten stark. Auch lag die Keimfähigkeit in der Kontrolle mit ca. 40% relativ niedrig. Darüber wurde die vertreibende Firma in Kenntnis gesetzt. Eine eindeutige Reduktion der Keimfähigkeit nach vier Stunden Inkubation konnte nicht festgestellt werden.



**Abbildung 4:** Einfluss chemischer Pflanzenschutzmittel auf die Anzahl gekeimter Sporen von Trichostar® direkt nach Mischung (dunkel) bzw. nach vier Stunden (hell) Inkubation



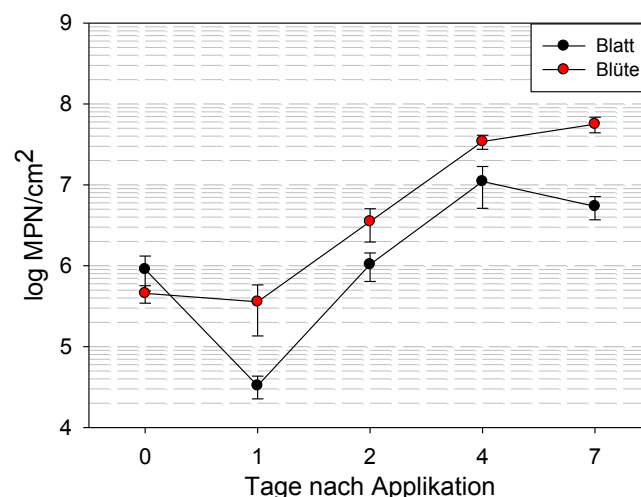
**Abbildung 5:** Einfluss chemischer Pflanzenschutzmittel auf die Anzahl gekeimter Sporen von *M. brunneum* Ma43 direkt nach Mischung (dunkel) bzw. nach vier Stunden (hell) Inkubation

Auch für *M. brunneum* Ma43 (Abbildung 5) konnte eine eindeutige Hemmung durch das Fungizid Signum® beobachtet werden. Eine gewisse Reduktion der Keimfähigkeit wurde durch Flint®, Ortiva®, Discus® und Score® hervorgerufen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass mikrobiologischen Produkte mit gängigen chemischen Pflanzenschutzmitteln (Ausnahme Signum®/antagonistische Pilze) kombiniert werden können, ohne dass deren Vitalität beeinträchtigt wird. Dies muss im Einzelfall allerdings geprüft werden.

#### 4.4. Optimierung der Applikation von Mikroorganismen

Für die Versuche mit Xentari® wiesen vor Applikation sowohl die Blätter als auch Blüten mit unter 0,1 KBE/cm<sup>2</sup> eine sehr geringe Zahl an Sporenbildnern auf. Direkt nach der Applikation wurden die höchsten Werte von 1,3x10<sup>5</sup> (Blatt) und 1,8x10<sup>5</sup> KBE/cm<sup>2</sup> (Blüte) erreicht. Die folgenden Proben wiesen Konzentrationen im 10<sup>4</sup>-Bereich auf. Für *P. fluorescens* Pf153 konnten vor der Applikation sowohl bei den Blattproben 88 MPN/cm<sup>2</sup> und bei den Blüten 10<sup>3</sup> MPN/cm<sup>2</sup> ermittelt werden. Direkt nach der Applikation wurden Proben mit 9x10<sup>5</sup> MPN/cm<sup>2</sup> (Blätter) bzw. 5x10<sup>5</sup> MPN/cm<sup>2</sup> (Blüten) genommen. Am darauf folgenden Tag fielen die Werte ab. Überraschender Weise nahm anschließend trotz UV-Exposition die Zellzahl zu (Abbildung 6/Abbildung 6). Die Auswertung der Proben nach Behandlung mit *M. brunneum* Ma43 konnte aufgrund einer Kontamination nicht ausgewertet werden.

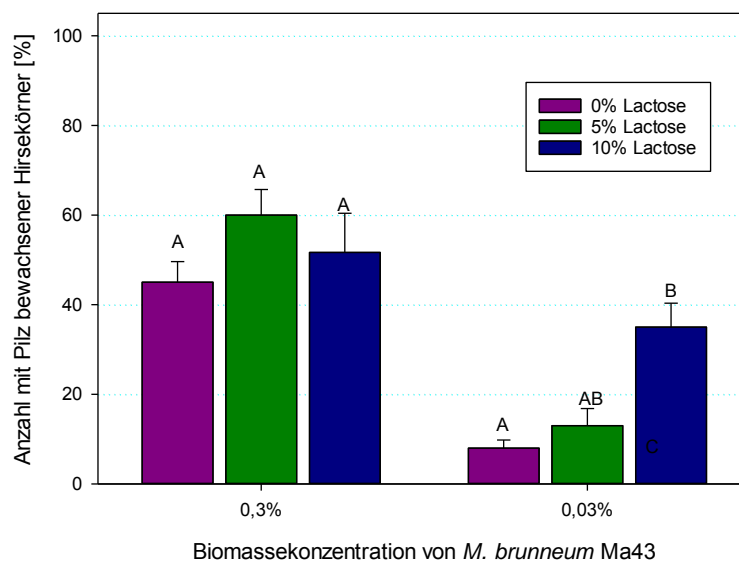


**Abbildung 6:** Most probable number (MPN) pro cm<sup>2</sup> von *P. fluorescens* Pf153 nach Applikation auf Blatt und Blüte und einwöchiger Inkubation mit UV-Exposition am 2 und 4 Tag

Die Versuche machen deutlich, dass sowohl Sporenbildner wie auch Nicht-Sporenbildner gut auf Blatt und Blüte/Frucht nachgewiesen werden können. Somit kann das Verfahren für weitere Optimierungsversuche verwendet werden. Diese nicht wiederholten Versuche lassen allerdings

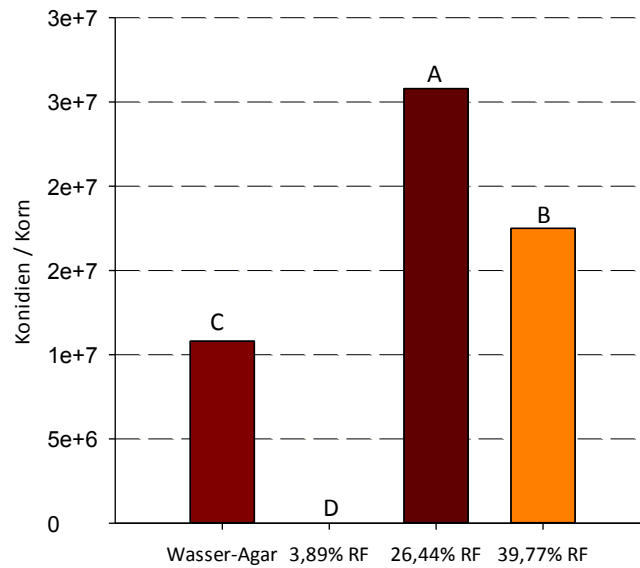
nicht den eindeutigen Schluss zu, dass die Mikroorganismenkonzentration *a priori* nach Applikation und UV-Exposition stetig abnimmt. Dies galt für Versuche mit Xentari®, nicht aber für *P. fluorescens* Pf153. Weiterführenden Versuchen müssen die Ergebnisse noch bestätigen.

Pilzmycel des *M. brunneum* Ma43 kann einfach im Flüssigfermenter produziert werden. Um ein lagerstabiles Produkt zu erhalten muss dieses getrocknet werden. Dies kann technisch einfach im Wirbelbettverfahren unter Verwendung eines warmen Luftstroms geschehen. In den eigenen Versuchen wurden Mycelfragmente auf eine Matrix (hier Hirse) gesprüht und im Luftstrom getrocknet. Allerdings ist Mycel temperaturempfindlich und bereits bei 50 °C für 6 Minuten konnte eine Schädigung des Mycels beobachtet werden. Um trotz Temperaturempfindlichkeit des Mycels eine ausreichend hohe Lebensfähigkeit auf der Hirse zu erzielen, wurde das Verfahren weiter optimiert. So konnte durch Veränderung der Mycelkonzentration und der Zugabe von Lactose als Schutzstoff das Auswachsen auf der Hirse erhöht werden (Abbildung 7). Durch weitere Optimierungsschritte konnte ein Mycelwachstum auf nahezu allen Hirsekörnern erreicht werden.



**Abbildung 7:** Mittelwert [%] und Standardabweichung wirbelschichtgetrockneter Hirsekörner unter Verwendung verschiedener Biomasse- und Lactosekonzentrationen (n=180). Bei unterschiedlichen Buchstaben unterscheidet sich der Median einer Konzentration signifikant (Wilcoxon,  $p < 0.05$ ).

Wurden die im Wirbelschichttrockner gecoateten Hirsekörner anschließend in Böden mit unterschiedlicher Bodenfeuchte ausgebracht, zeigte sich, dass die Sporulation sehr stark von der Bodenfeuchte beeinflusst wurde (Abbildung 8).



**Abbildung 8:** Einfluss der Bodenfeuchte auf die Sporulation von mit *M. brunneum* Ma 43 gecoateten Hirsekörnern. Bei unterschiedlichen Buchstaben unterscheidet sich der Median signifikant (Wilcoxon,  $p < 0.05$ ). RF=Relative Feuchte

Da in 2014 der *M. brunneum* Ma43 noch keine Zulassung hatte, konnte das Pilzgranulat nicht in die Erdbeerversuche integriert werden. Allerdings konnten weiterführende Versuche der Versuchsstation Dethlingen zeigen, dass das Ausbringen der Granulate mit herkömmlichen Düngerstreuern ohne Probleme bei der Kartoffelablage (Abbildung 9) realisierbar war. Eine Ausbringung zur Pflanzbeetbereitung bzw. bei Pflanzung der Erdbeerpflanzen erscheint möglich.



**Abbildung 9:** Ausbringung von mit *M. brunneum* Ma43 gecoateten Hirsekörnern im Kartoffelanbau. (Bilder von R. Peters, Versuchsstation Dethlingen)

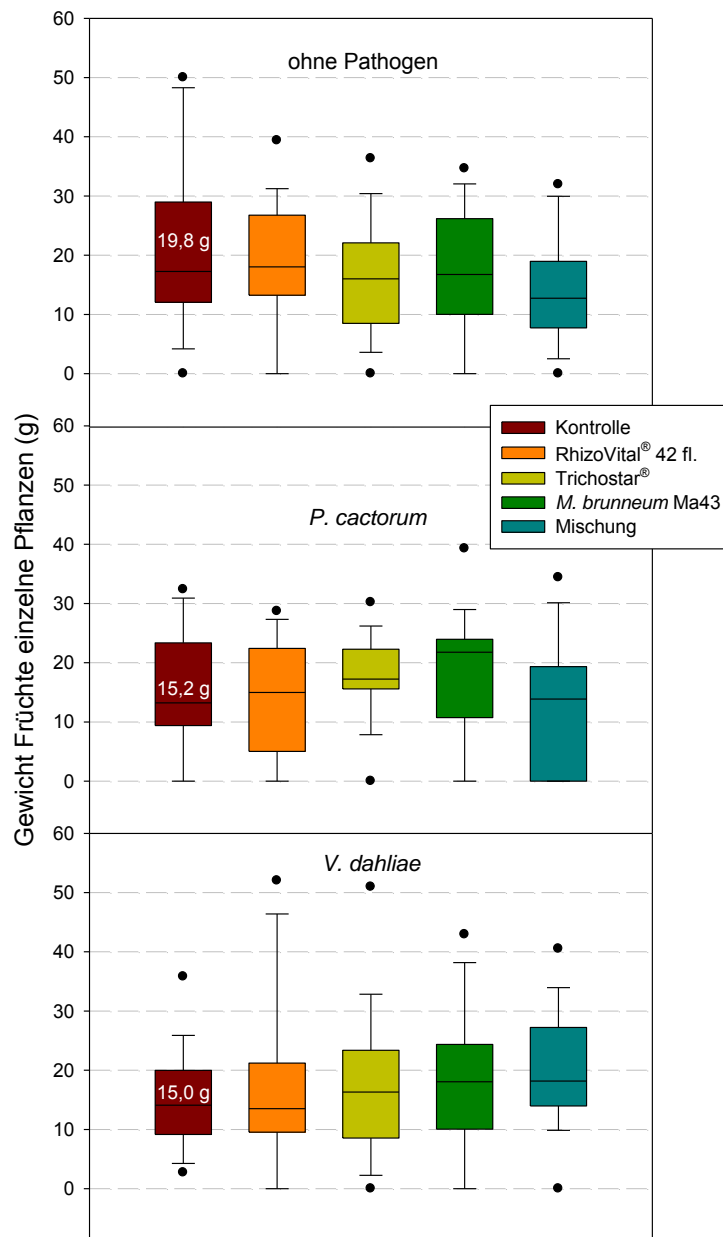
## 4.5. Überprüfung der Wirksamkeit in Erdbeerkulturen

### 4.5.1. Laborversuche mit Erdbeersämlingen

Nachdem mehrere Chargen von Erdbeersamen nur geringe Auskeimraten hatten, wurde dieser Versuchsansatz abgebrochen, da nicht mit verlässlichen Ergebnissen zu rechnen war.

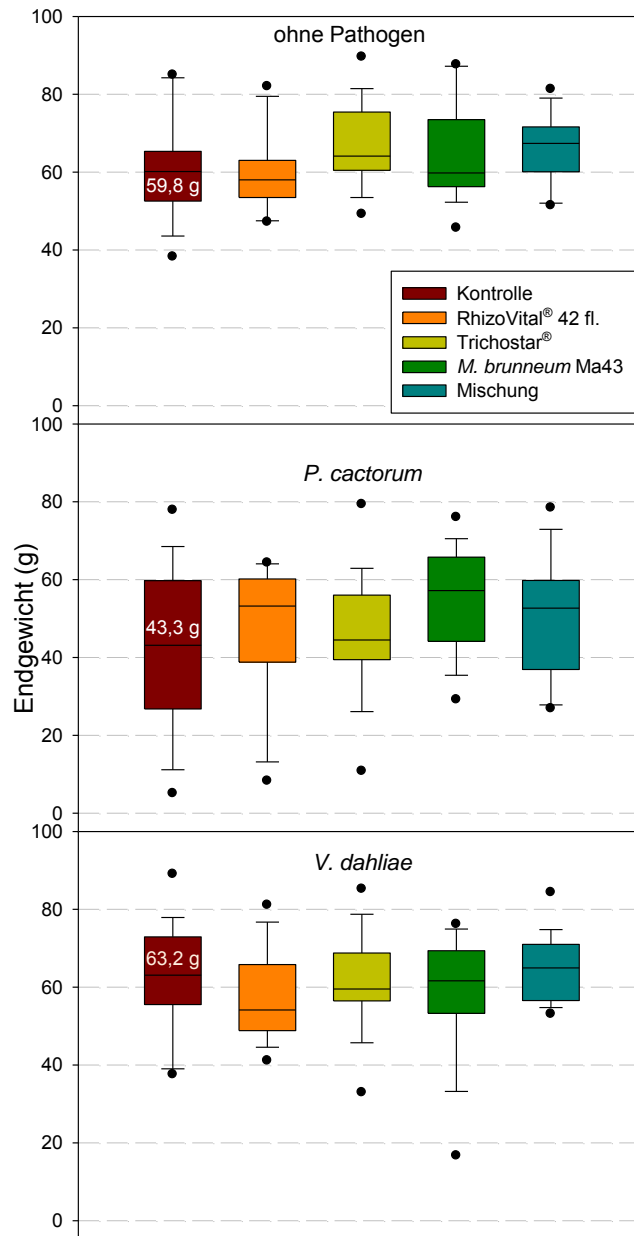
### 4.5.2. Versuche mit getopften Erdbeerpflanzen unter kontrollierten Bedingungen

Abbildung 10 verdeutlicht, dass in den Gewächshausversuchen durch eine künstliche Inokulation mit den Pathogenen das Fruchtgewicht der einzelnen Pflanzen um ca. 4,6 g reduziert wurde.



**Abbildung 10:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf das Fruchtgewicht je Pflanze (n=18); oben: ohne Pathogen, Mitte: Inokulation mit *P. cactorum*, unten: Inokulation mit *V. dahliae*

Jedoch konnte kein Einfluss auf die Anzahl der gebildeten Früchte festgestellt werden. Das Endgewicht der einzelnen Pflanzen (Abbildung 11) war bei Inokulation mit *P. cactorum* deutlich reduziert und auch die Anzahl abgestorbener Pflanzen war mit 44% sehr hoch. Dies konnte allerdings bei den mit *V. dahliae* inokulierten Böden nicht beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich (Tabelle 2) vor allem bei *P. cactorum*, dass die Wurzellänge und die Wurzel Trockenmasse



**Abbildung 11:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf das Pflanzengewicht mit Ableger am Ende des Versuches bzw. am Tag, an der die Pflanze abgestorben war (n=18)

reduziert war. Auf das Blattwachstum und die Anzahl Ausläufer konnte kein negativer Einfluss beobachtet werden. Bei künstlicher Inokulation mit *V. dahliae* konnte tendenziell kein negativer Effekt auf das Pflanzenwachstum festgestellt werden. In diesen Gewächshausversuchen erbrachte RhizoVital® 42 fl. keinen deutlicher Effekt. Trichostar® zeigte keinen positiven Effekt auf



das Fruchtgewicht und einen Effekt auf das Endgewicht der einzelnen Pflanzen sowie der gebildeten Ableger, der Wurzellänge. Nach Inokulation mit *P. cactorum*, konnte ein leicht negativer Effekt von Trichostar® auf die Bildung oberirdischer Pflanzenteile beobachtet werden. Für *M. brunneum* Ma43 konnten keine klaren Einflüsse auf das Pflanzenwachstum beobachtet werden. Allerdings starben bei *P. cactorum* nach Behandlung mit *M. brunneum* Ma43 keine Pflanzen ab, hingegen starben nach Anwendung der Mischung und Trichostar® 11%, von RhizoVital® 42 fl. 28% und in der unbehandelten Kontrolle 44% nach künstlicher Inokulation mit *P. cactorum* ab.

**Tabelle 2:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf verschiedene Wachstumsparameter für die Variante ohne Pathogen (n=18), mit *P.cactorum* (n=lebenden Pflanzen am Boniturtag) und *V. dahliae* Inokulation (n=18)

Behandlung	Anzahl grüne Blätter	Trockenmasse Blätter (g)	Wurzel Länge (cm)	Trockenmasse Wurzeln (g)	Ausläufer	Pflanzen pro Ausläufer
<b>Ohne künstliche Inokulation</b>						
Kontrolle	15,2 (± 3,6)	6,0 (± 1,4)	<b>27,8 (± 6,2)</b>	<b>1,2 (± 0,6)</b>	<b>2,1</b>	3,1
RhizoVital® 42 fl.	15,0 (± 3,2)	<b>6,2 (± 1,2)</b>	28,3 (± 3,9)	<b>1,2 (± 0,4)</b>	2,4	<b>2,8</b>
Trichostar®	<b>15,4 (± 3,9)</b>	6,1 (± 1,3)	<b>31,3 (± 5,8)</b>	<b>1,8 (± 0,7)</b>	2,4	<b>3,2</b>
<i>M. brunneum</i> Ma43	<b>14,6 (± 4,9)</b>	<b>5,8 (± 2,0)</b>	30,6 (± 6,2)	<b>1,8 (± 0,7)</b>	2,3	<b>3,2</b>
Mischung	<b>14,6 (± 3,1)</b>	<b>5,8 (± 1,0)</b>	29,9 (± 5,8)	1,5 (± 0,7)	<b>2,5</b>	2,9
<b><i>P. cactorum</i></b>						
Kontrolle	13,5 (± 6,0)	<b>5,2 (± 1,4)</b>	<b>17,6 (± 2,8)</b>	0,6 (± 0,3)	<b>3,1</b>	<b>2,5</b>
RhizoVital® 42 fl.	12,9 (± 3,8)	4,8 (± 1,4)	18,6 (± 3,0)	0,6 (± 0,4)	2,5	2,7
Trichostar®	<b>10,5 (± 3,4)</b>	<b>3,5 (± 1,8)</b>	18,5 (± 2,3)	<b>0,4 (± 0,2)</b>	2,4	<b>2,9</b>
<i>M. brunneum</i> Ma43	11,8 (± 4,1)	5,0 (± 1,8)	<b>21,9 (± 4,3)</b>	0,7 (± 0,4)	<b>2,1</b>	<b>2,5</b>
Mischung	<b>13,6 (± 3,9)</b>	4,9 (± 1,6)	19,4 (± 3,9)	<b>0,8 (± 0,5)</b>	2,4	2,6
<b><i>V. dahliae</i></b>						
Kontrolle	<b>14,1 (± 4,2)</b>	<b>5,6 (± 1,5)</b>	26,3 (± 5,4)	1,5 (± 0,5)	2,4	<b>3,3</b>
RhizoVital® 42 fl.	15,1 (± 5,7)	<b>5,6 (± 1,2)</b>	<b>26,7 (± 5,2)</b>	1,4 (± 0,6)	<b>2,0</b>	2,9
Trichostar®	14,6 (± 4,1)	5,9 (± 1,5)	25,8 (± 5,7)	1,3 (± 0,7)	<b>2,7</b>	<b>2,6</b>
<i>M. brunneum</i> Ma43	14,8 (± 3,2)	5,9 (± 1,3)	<b>24,0 (± 5,8)</b>	<b>1,2 (± 0,6)</b>	2,4	2,9
Mischung	<b>16,7 (± 2,3)</b>	<b>6,3 (± 1,0)</b>	24,7 (± 6,2)	<b>1,7 (± 0,4)</b>	<b>2,7</b>	2,9

### 4.5.3. Versuche auf dem JKI-Versuchsfeld

#### Versuch 2011-2012

Vermutlich aufgrund des Kalten Winters 2011-2012 starben teilweise bis zu 100% der Pflanzen einzelner Parzellen ab (siehe Tabelle A4).

Um mögliche Frostschäden zu erfassen, wurden die Rhizome der abgestorbenen und stichprobenartig noch lebender Pflanzen aufgeschnitten. Es zeigte sich, dass auch lebende Pflanzen deutliche Frostschäden am Rhizom aufwiesen. Aus diesem Grund wurde der Versuch abgebrochen und das Feld neu bepflanzt.

#### Versuch 2012-2013

Am 12.09.2012 wurde die Anzahl angewachsener Pflanzen bonitiert. Über alle Varianten hinweg waren 15 bis 44% der Pflanzen nicht angewachsen, was möglicher Weise auf die lange Lagerzeit der Frigo-Pflanzen zurückgeführt werden kann. Im Mai des folgenden Jahres wurde nochmals bonitiert (Tabelle 3), um ggf. tote bzw. frostgeschädigte Pflanzen zu ersetzen. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, waren in manchen Varianten nur noch 40% der Pflanzen am Leben, wobei die Werte nach Inokulation mit *P. cactorum* ca. 15% niedriger lagen. Im Unterschied zu den Gewächshausversuchen konnte in den Freilandversuchen durch keine der Behandlungen die Anzahl der lebenden Pflanzen erhöht werden.

**Tabelle 3:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf den prozentualen Anteil lebender Pflanzen in Mai 2013 (n=100)

Behandlung	o.k.l*	<i>P. cactorum</i>	<i>V. dahliae</i>		Gesamt
Kontrolle	79(±13)	49(±23)	66(±12)		65(±15)
RhizoVital® 42 fl.	63(±14)	40(±10)	52(±15)		52(±12)
Trichostar®	71(±20)	46(± 7)	65(± 9)		61(±13)
<i>M. brunneum</i> Ma43	58(±13)	40(±13)	74(±12)		57(±16)
Mischung	68(±20)	53(±17)	67(±13)		63(± 8)
<b>Gesamt</b>	68(± 7)	46(± 6)	64(± 7)		59(±12)

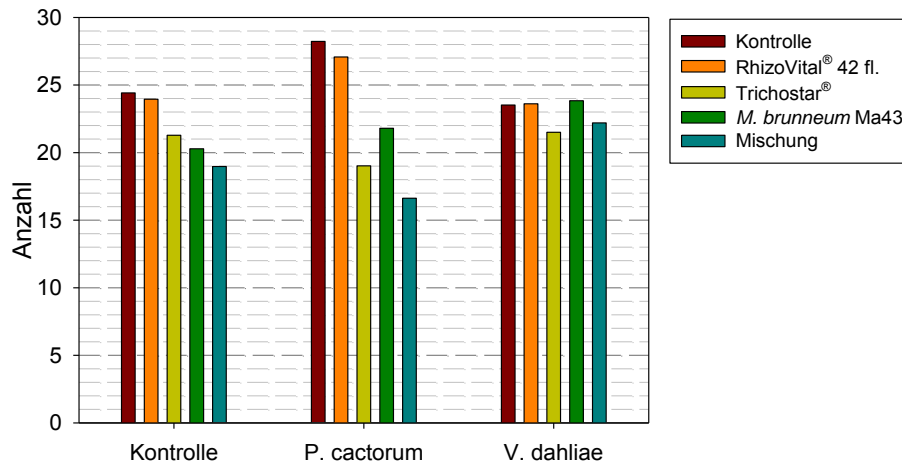
\* o.k.l.= ohne künstliche Inokulation

Wurde der Ertrag getrennt nach den Pflanzzeitpunkten erfasst, so konnte bei den in 2012 gepflanzten Erdbeeren (Tabelle 4 links) ohne künstliche Inokulation durch Behandlung mit Antagonisten keine Ertragssteigerung beobachtet werden. Auch konnte der niedrigere Ertrag nach Inokulation mit *P. cactorum* durch keine Behandlung kompensiert werden. Die Anzahl Jungpflanzen wurde durch die Behandlung teils negativ beeinflusst. Durch die Anwendung des

Gemisches wurde die Jungpflanzenbildung um 41% reduziert (Abbildung 12). Bei *V. dahliae* konnten ebenfalls keine positiven Effekte der Behandlungen auf den Ertrag beobachtet werden. Vermutlich aufgrund der kurzen Kultivierungszeit hatten bei den 2013 nachgepflanzten Erdbeeren (Tabelle 4 rechts) die Pathogene keinen negativen Einfluss. Allerdings konnte vor allem für RhizoVital® 42 fl. in der Kontrolle (28,6%) und *P. cactorum* Behandlung (11,7%) ein positiver Ertragseinfluss beobachtet werden. Das Gemisch zeigte bei allen einen leichten Ertragsanstieg (ohne künstliche Inokulation: 18,9%, *P. cactorum*, 10,6%, *V. dahliae* 9,8%).

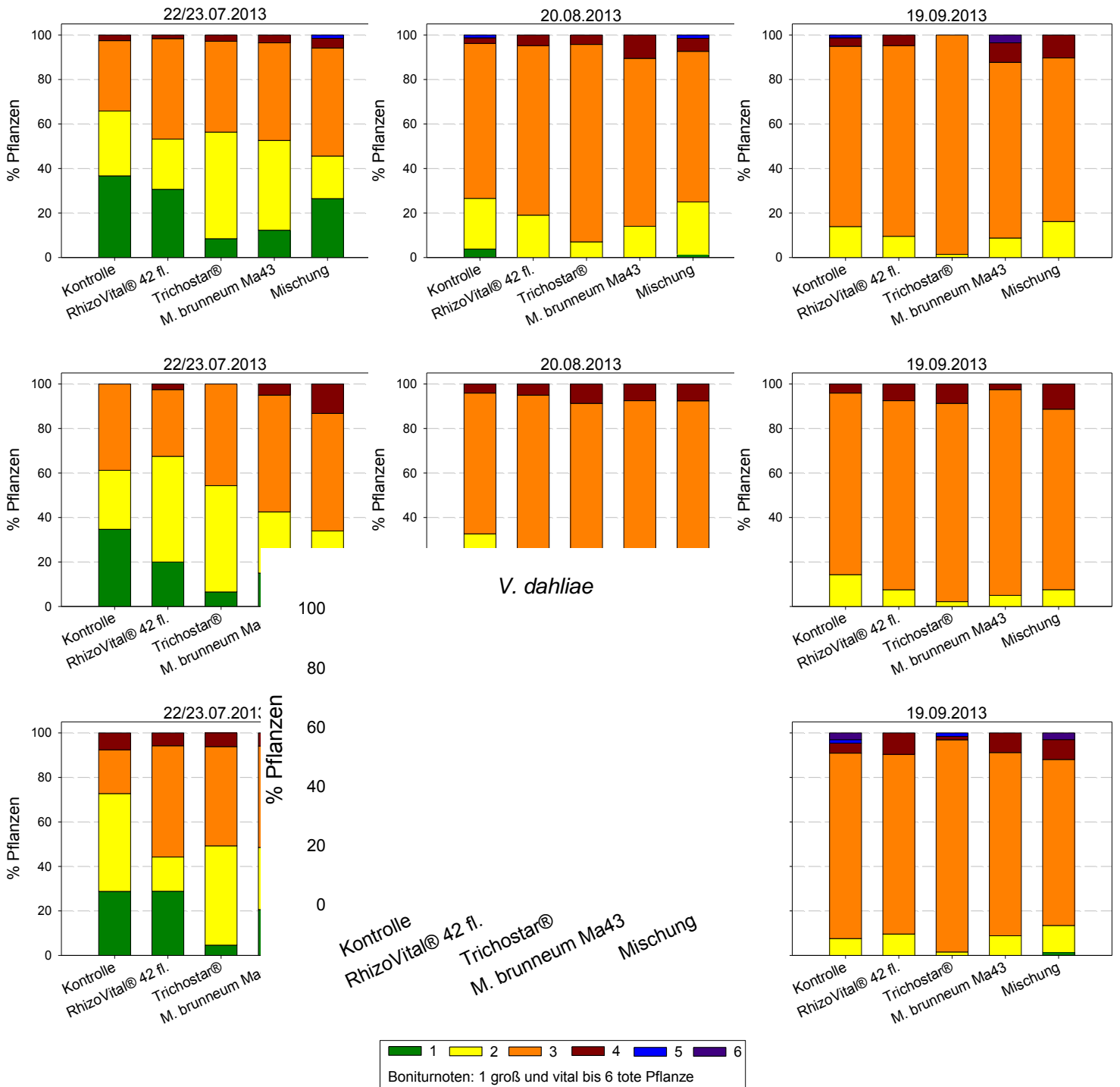
**Tabelle 4:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf den Erdbeerertrag sowie die Anzahl lebender Pflanzen und Pflanzen mit Krankheitssymptomen nach der Ernte (Juli 2013). Links gepflanzt in 2012, rechts Neupflanzung in 2013

Behandlung	2012				2013		
	Ertrag (kg)	Anzahl lebende Pflanzen	Anzahl Pflanzen mit Krankheits-Symptome		Ertrag (kg)	Anzahl lebende Pflanzen	Anzahl Pflanzen mit Krankheits-Symptome
<b>Ohne künstliche Inokulation</b>							
Kontrolle	2,30	79	3		0,50	21	0
RhizoVital® 42 fl.	1,46	63	3		1,07	35	0
Trichostar®	2,12	71	2		0,67	28	0
<i>M. brunneum</i> Ma43	1,28	57	3		1,12	43	0
Mischung	1,83	68	3		0,85	30	0
<b><i>P. cactorum</i></b>							
Kontrolle	0,93	49	2		1,32	50	0
RhizoVital® 42 fl.	0,60	40	2		1,65	56	0
Trichostar®	0,86	46	3		1,30	51	1
<i>M. brunneum</i> Ma43	0,40	40	0		1,62	59	0
Mischung	0,77	53	2		1,37	47	1
<b><i>V. dahliae</i></b>							
Kontrolle	1,60	66	6		0,84	34	0
RhizoVital® 42 fl.	0,74	52	2		1,21	48	2
Trichostar®	1,25	65	7		0,83	34	0
<i>M. brunneum</i> Ma43	1,52	68	1		0,85	32	0
Mischung	1,48	67	3		0,89	33	0

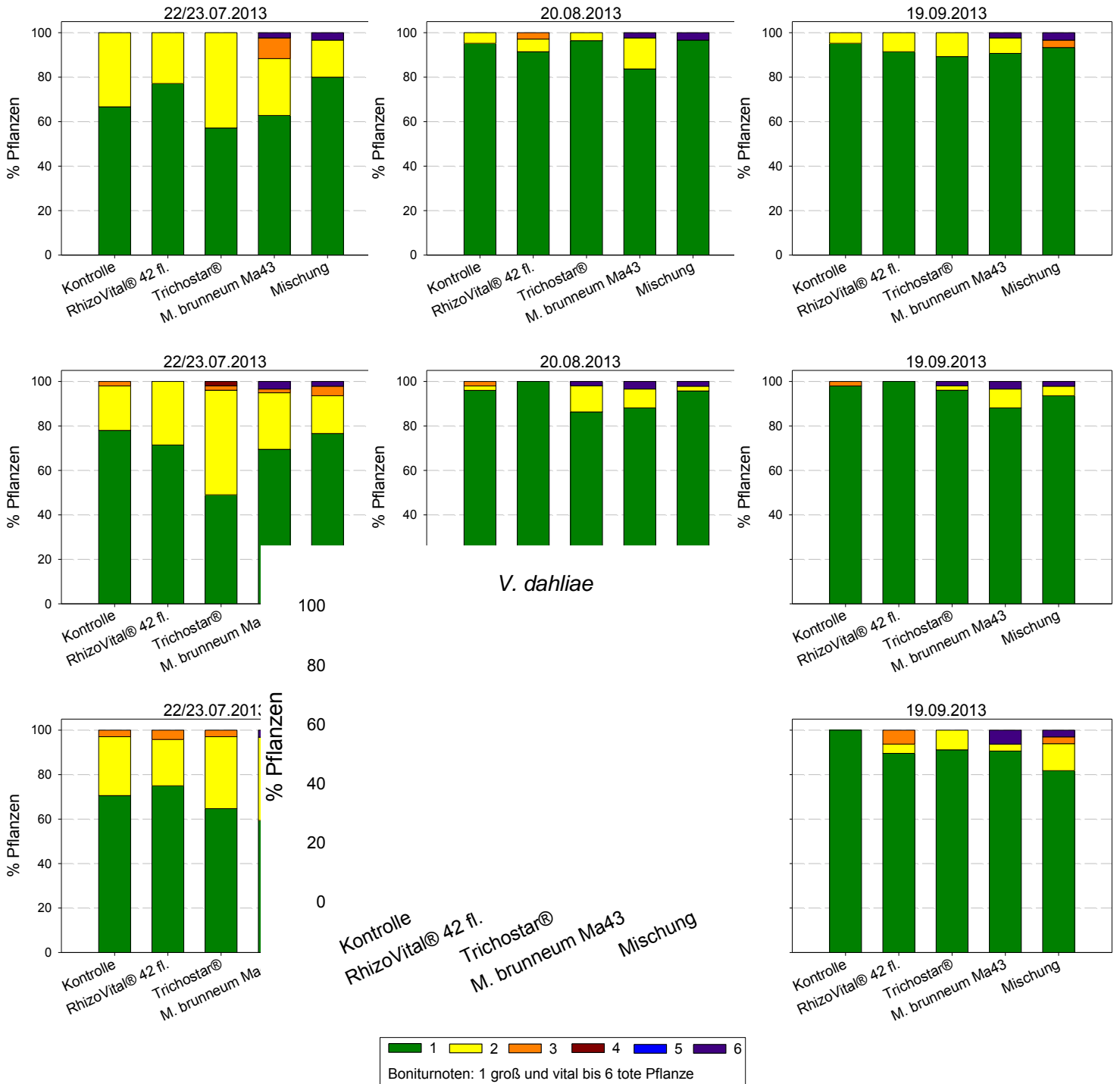


**Abbildung 12:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf die Jungpflanzenbildung pro 2012 gepflanzter Erdbeerpflanzen

Aus Abbildung 13 und Abbildung 14 ist zu entnehmen, dass die Pflanzengesundheit der in 2012 gepflanzten Erdbeeren über die Zeit hinweg schlechter wird. Auch konnten keine positiven Effekte der Behandlungen beobachtet werden. Tendenziell rief Trichostar® sogar eher einen negativen Effekt hervor. In 2013 nachgepflanzte Erdbeeren wurden über den Beobachtungszeitraum sehr gut bewertet, aber auch hier konnte kein positiver Einfluss der Behandlungen beobachtet werden.



**Abbildung 13:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf die Pflanzenvitalität (Boniturnoten 1-6), der in 2012 gepflanzten Erdbeeren an verschiedenen Boniturterminen (oben ohne künstliche Inokulation, Mitte mit *P. cactorum* und unten mit *V. dahliae* künstlich inokuliert)



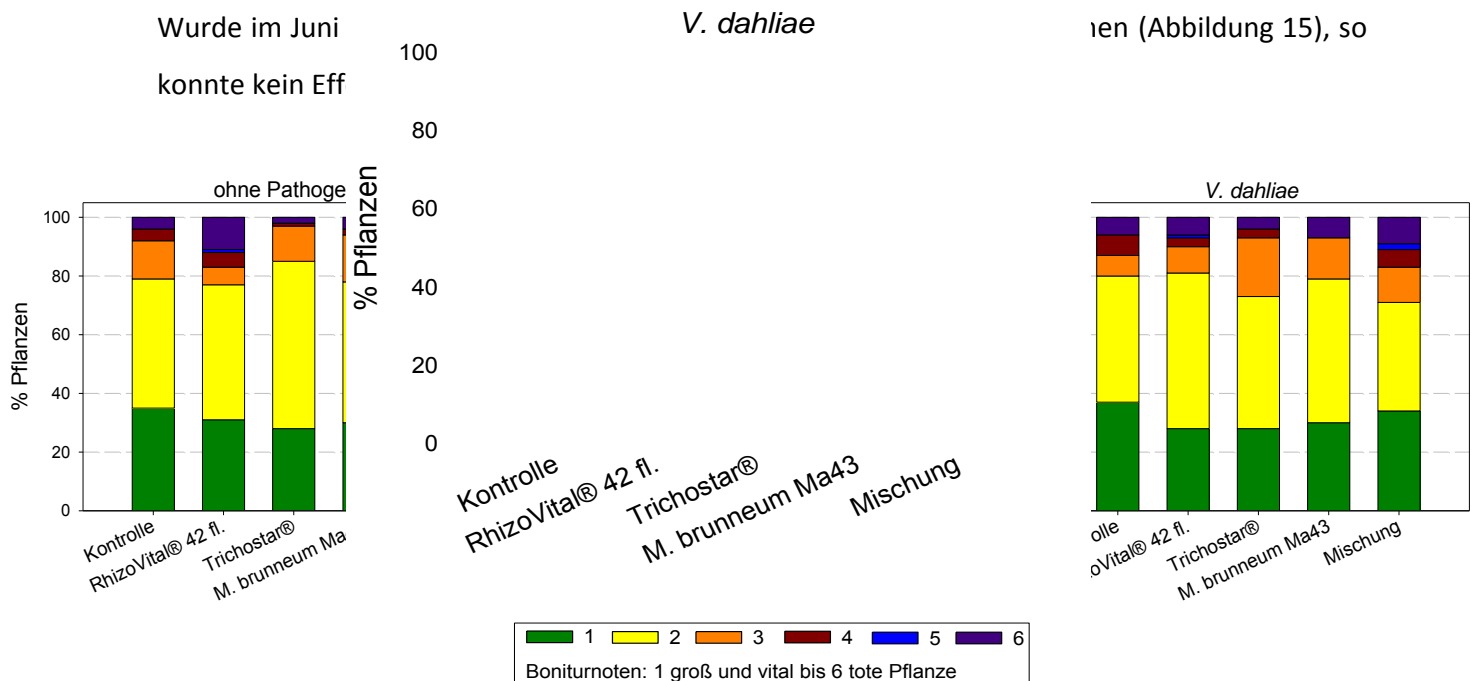
**Abbildung 14:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf die Pflanzenvitalität (Boniturnoten 1-6), der in 2013 gepflanzten Erdbeeren an verschiedenen Boniturterminen (oben ohne künstliche Inokulation, Mitte mit *P. cactorum* und unten mit *V. dahliae* künstlich inokuliert)

Im Juni 2014 wurde eine weitere Ertragsbonitur vorgenommen, bei der allerdings nicht der Pflanztermin mit berücksichtigt wurde. Keine der Behandlungen erbrachte eine Erhöhung des Ertrages. Wurde die Anzahl Pflanzen mit Krankheitssymptomen erfasst, so lag der Wert bei den

mit dem insektenpathogenen Pilz *M. brunneum* Ma43 behandelten Varianten mit nur 5 Pflanzen deutlich am niedrigsten (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf den Erdbeerertrag sowie die Anzahl lebender Pflanzen und Pflanzen mit Krankheitssymptomen nach der Ernte (Juni 2014)

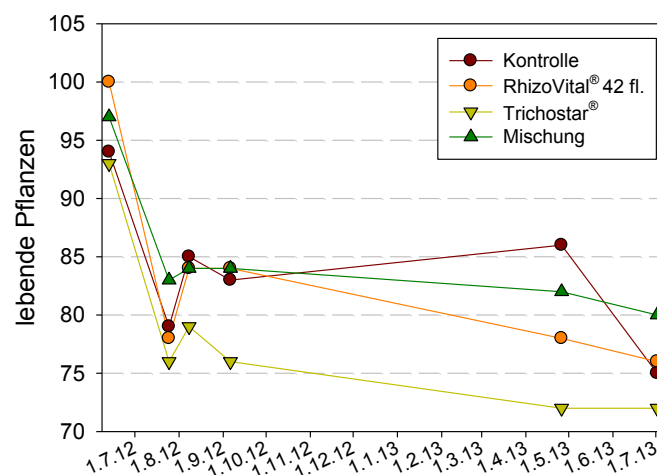
Behandlung	Ertrag (kg)	Anzahl lebende Pflanzen nach der Ernte	Anzahl Pflanzen mit Krankheitssymptome	MW Ertrag pro Pflanze (g)	MW Ertrag pro m (kg)
<b>Ohne künstliche Inokulation</b>					
Kontrolle	32,40	96	14	338	1,350
RhizoVital® 42 fl.	28,06	89	9	315	1,169
Trichostar®	29,59	98	13	302	1,233
<i>M. brunneum</i> Ma43	28,00	96	5	292	1,167
Mischung	29,78	94	12	317	1,241
<b><i>P. cactorum</i></b>					
Kontrolle	26,18	97	15	270	1,091
RhizoVital® 42 fl.	23,95	88	10	272	0,998
Trichostar®	24,70	93	9	266	1,029
<i>M. brunneum</i> Ma43	24,08	92	5	262	1,003
Mischung	26,67	95	11	281	1,111
<b><i>V. dahliae</i></b>					
Kontrolle	33,61	94	15	358	1,400
RhizoVital® 42 fl.	28,65	94	20	305	1,194
Trichostar®	28,26	96	21	294	1,178
<i>M. brunneum</i> Ma43	27,86	93	4	300	1,161
Mischung	31,05	91	14	341	1,294



**Abbildung 15:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf die Pflanzenvitalität (Boniturnoten 1-6) im Juni 2014

#### 4.5.4. Versuche auf Betrieben im Raum Darmstadt/Frankfurt

Auf zwei Betrieben im Raum Darmstadt/Frankfurt wurden Versuche zur Wirkung verschiedener Antagonisten angelegt. Beim Betrieb D starben nach Pflanzung bis zu 25% der Pflanzen ab, wobei sich im geringen Umfang Pflanzen aus den scheinbar toten Mutterpflanzen entwickeln konnten (Abbildung 16). Da in Gewächshausversuchen die Anzahl von Ablegern durch die Behandlung mit Antagonisten positiv beeinflusst wurde, wurde diese auf dem Betrieb D auch erfasst. Unterschiede zwischen den Behandlungen konnten allerdings in 2012 nicht beobachtet werden.



**Abbildung 16:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf die Anzahl lebender Pflanzen ab einem Monat nach Pflanzung auf Betrieb D

Wurde der Ertrag bonitiert (Tabelle 6), zeigte sich in 2013 bei allen drei Behandlungen eine Ertragssteigerung, die sich bei RhizoVital® 42 fl. auf einen Mehrertrag von 20% belief. Obwohl in 2014 keine weitere Behandlung mit Antagonisten durchgeführt wurde, konnte in 2014 bei den RhizoVital® 42 fl.- und Trichostar®-Behandlungen ein leichter Mehrertrag festgestellt werden.



**Tabelle 6:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf den Erdbeerertrag sowie die Anzahl lebender sowie Pflanzen mit Krankheitssymptomen auf Betrieb D in 2013 (oben) und 2014 (unten)

Behandlung	Ertrag (kg)	Anzahl lebende Pflanzen nach der Ernte	Anzahl Pflanzen mit Krankheitssymptome	MW Ertrag pro Pflanze (g)	MW Ertrag pro m (kg)
Kontrolle	17,14	75	3	229	0,714
RhizoVital® 42 fl.	20,79	76	2	274	0,866
Trichostar®	18,50	72	1	257	0,771
Mischung	19,60	80	2	245	0,817

Behandlung	Ertrag (kg)	MW Ertrag pro m (kg)
Kontrolle	21,85	0,910
RhizoVital® 42 fl.	22,45	0,935
Trichostar®	23,85	0,994
Mischung	21,19	0,883

Ertrag pro m (25 Pflanzen alle 25 cm=6 m pro Wdh; 24 m pro Behandlung)

**Tabelle 7:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf den Erdbeerertrag sowie die Anzahl lebender sowie Pflanzen mit Krankheitssymptomen auf Betrieb G in 2013 (oben) und 2014 (unten) nach Antagonisten-Anwendung

Behandlung	Ertrag (kg)	Anzahl lebende Pflanzen nach der Ernte	Anzahl Pflanzen mit Krankheitssymptome	MW Ertrag pro Pflanze (g)	MW Ertrag pro m (kg)
Kontrolle	36,88	99	3	373	1,537
RhizoVital® 42 fl.	38,93	100	2	389	1,622
Trichostar®	40,46	98	4	413	1,686
Mischung	36,42	100	2	364	1,517

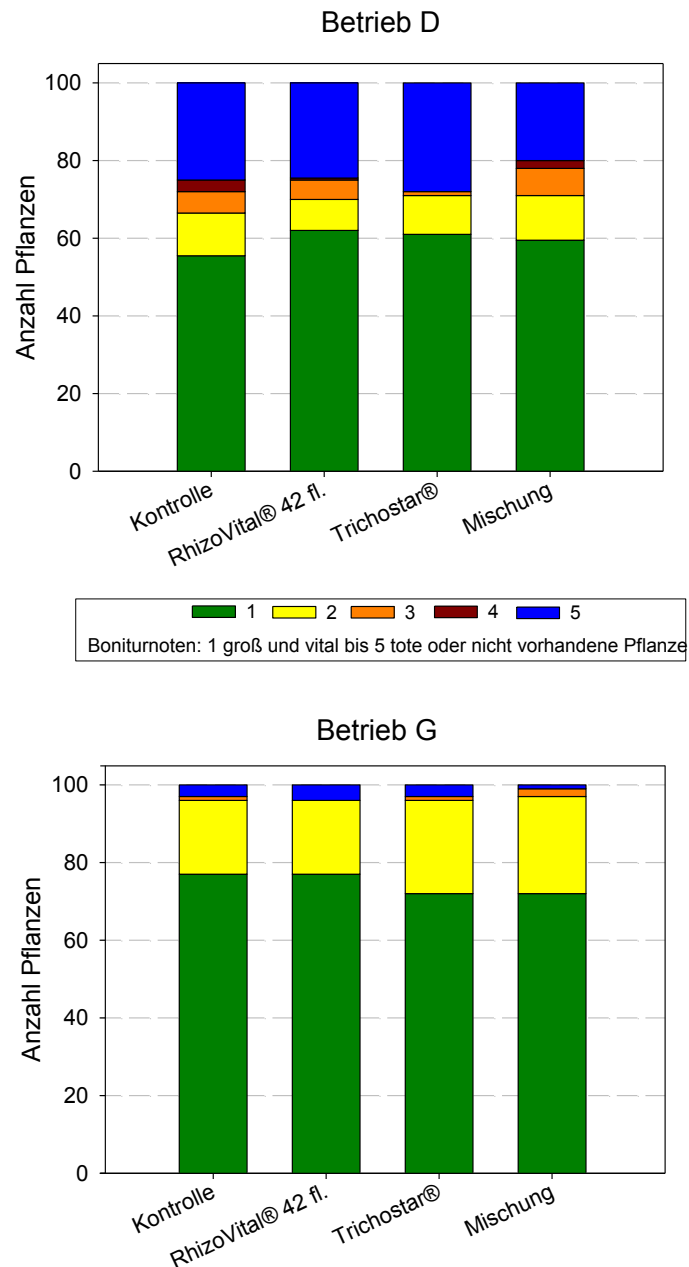
Behandlung	Ertrag (kg)	Anzahl lebende Pflanzen nach der Ernte	Anzahl Pflanzen mit Krankheitssymptome	MW Ertrag pro Pflanze (g)	MW Ertrag pro m (kg)
Kontrolle	78,63	97	9	811	3,276
RhizoVital® 42 fl.	83,73	97	3	863	3,489
Trichostar®	73,94	98	11	754	3,081
Mischung	80,72	95	8	850	3,363

Ertrag pro m (25 Pflanzen alle 25 cm=6 m pro Wdh; 24 m pro Behandlung)

Beim Betrieb G (Tabelle 7) starb nach Pflanzung nur eine Pflanze sechs Wochen nach Behandlung ab. Auf diesem Betrieb wird im Gegensatz zum Betrieb D künstlich bewässert. Die Erträge beim Betrieb lagen im Vergleich zum Betrieb D höher. Auch hier konnte durch Anwendung von Trichostar und RhizoVital® 42 fl. der Ertrag steigern, wobei auf diesem Betrieb die höchste Ertragssteigerung von 10,7% nach Anwendung von Trichostar® erzielt werden konnte. Die Mischung erbrachte im Gegensatz zum Betrieb D auf dem Betrieb G keine Ertragssteigerung. In

2014 konnten Mehrerträge nur nach Anwendung von RhizoVital® 42 fl. und leichte Mehrerträge durch die Mischung erzielt werden.

Wurde die Pflanzengesundheit (Abbildung 17) nach Versuchsende in 2013 bonitiert, so konnte bei beiden Betrieben kein eindeutiger Einfluss der Behandlungen auf die Pflanzengesundheit festgestellt werden.



**Abbildung 17:** Einfluss der Anwendung antagonistischer Mikroorganismen auf die Pflanzenvitalität (Boniturnoten 1-6) nach Beendigung der Erntesaison 2013 (n=100).

#### **4.5.5. Zusammenarbeit mit Verbundpartner und anderen Versuchsanstellern**

Die Zusammenarbeit innerhalb des Projektverbundes „Ökologischer Erdbeeranbau“ der **Forschungsanstalt Geisenheim/Hochschule Geisenheim University** (Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren – Teilprojekt Graufäule und Echter Mehltau, Förderkennzeichen 28060E354), der **Bioland Beratung** (Stärkung der Ertragsicherheit und Rentabilität im biologischen Erdbeeranbau durch effektivere Unkrautkontrolle sowie Regulierung des Erdbeerblütenstechers und verschiedene Wurzelfäulen, Förderkennzeichen 11NA011), der **Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen – Köln-Auweiler** (Verbesserung der Produktionssicherheit und Verlängerung des Angebotszeitraumes durch Anbau von Öko-Erdbeeren im Folientunnel, Förderkennzeichen 06OE262) und des **Julius Kühn-Instituts Darmstadt** (Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung der bodenbürtigen Erdbeerkrankheiten *Verticillium dahliae* und *Phytophthora cactorum* sowie des Erdbeerblütenstechers, Förderkennzeichen 2811OE043) wurde unter Einbeziehung des BÖLN durch gemeinsame Projekttreffen unterstützt. Zu diesen Projekttreffen wurden externe MitarbeiterInnen des JKI in Dresden Pillnitz (Resistenzzüchtung an Erdbeere), der Fachhochschule Osnabrück (*Verticillium* im Erdbeeranbau) und des ZALF in Müncheberg (Anwendung apathogener *Verticillium*-Stämme) eingeladen und ein Wissensaustausch gefördert. Neben Feldbesichtigungen wurde zum Ende des Projektes eine zweitägige Abschlussveranstaltung an der Hochschule Geisenheim ausgerichtet, um Projektergebnisse einem breiteren Forum vorzustellen.

Im Rahmen der Diagnose von Erdbeerkrankheiten wurde mit der Berliner Humboldt-Universität zusammengearbeitet und mit den Herstellern der getesteten Produkte fand ein reger Informationsaustausch statt. Auch wurde sich mit dem örtlichen Anbauverband (LLH Griesheim) sowie landwirtschaftlichen Betrieben ausgetauscht und kooperiert. Neben der Vorstellung von Forschungsergebnissen auf zahlreichen Fachtagungen (siehe Kapitel 10) wurde das Forschungsprojekt auch auf der BIOFACH 2014 vorgestellt und einer breiten Öffentlichkeit präsentiert.

## 5. Diskussion der Ergebnisse

Innerhalb der zweijährigen Projektlaufzeit konnte kein spezifisches Nachweisverfahren für die zwei bodenbürtigen Pathogene *V. dahliae* und *P. cactorum* etabliert werden. Anhand der Erfassung unspezifischer Parameter *ad planta* ( $\beta$ -Glucanase, Chlorophyll-Fluoreszenz-Messung) konnte ein Infektionsverlauf ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Diese Verfahren sind für Infektionen mit dem Falschen Gurkenmehltau (*Pseudoperonospora cubensis*) an Gurke etabliert, können somit aber nicht direkt auf das hier untersuchte Pathosystem übertragen werden.

In der Literatur beschriebene Selektivmedien für *Trichoderma* (Elad et al. 1981) und *Metarhizium* (Strasser, pers. Mitteilung) erwiesen sich nur bedingt geeignet, da auf diesen Medien diese zwei Pilzgattungen nicht voneinander getrennt werden konnten.

Wurden in Gewächshausversuchen verschiedene Wachstumsparameter (Biomasseanstieg, Anzahl Blätter, Wurzellänge etc.) bzw. Ertragsparameter (Fruchtgewicht pro Pflanze) erfasst, konnten gewisse Effekte der Pathogene auf das Pflanzenwachstum beobachtet werden. Die Pathogenität der *V. dahliae*-Isolate, die als hoch bezeichnet wurden, zeigten nach Inokulation mit MS keine hohe Pathogenität. Zwar besteht die Möglichkeit, hohe Infektionen mit *V. dahliae* über künstliche Wunden und Konidien zu erzeugen (Kuchta et al. 2008). Da dies aber nicht den natürlichen Bedingungen entsprach, und der Einfluss der künstlichen Wunden auf die Wirkung der Antagonisten schwer zu bewerten wäre, wurde auf solche Infektionsversuche in diesem Projekt verzichtet. Aufgrund der Komplexität der Versuchsdurchführung wurde bei den Versuchen der Einfluss von verschiedenen Stressoren (Nährstoffversorgung, Temperatur, Bodenfeuchte) auf den Krankheitsverlauf nicht in die Versuchsplanung mit einbezogen. Durch die Einbeziehung dieser hätte gegebenenfalls ein deutlicherer Pathogenbefall nachgewiesen werden können.

In den eigenen Versuchen wurde sich auf die künstliche Inokulation des Bodens mit dem Pathogen sowie auf die Erfassung von Wachstumsparametern, Fruchtertrag und Boniturnoten und der Anzahl toter Pflanzen sowie die Erfassung von typischen Symptomen beschränkt. Wurden diese Parameter erfasst, konnte in den Gewächshaus- und Freilandversuchen keine eindeutige Wirkung der Antagonisten festgestellt werden. Die Ergebnisse schließen allerdings nicht aus, dass Pilze, die zur Kontrolle von Schadinsekten eingesetzt werden, nicht auch eine Wirkung auf Pflanzenkrankheiten bzw. unmittelbar auf das Pflanzenwachstum haben. So konnte im vorangegangenen Projekt (Stephan und Bisutti 2011) eine klare Wirkung von *M. brunneum* Ma43 auf die vier untersuchten Pathogene *in vitro* nachgewiesen werden. Auch zeigte dieser Pilz teils eine Erhöhung bestimmter Wachstumsparameter bzw. eine Reduktion der Anzahl kranker

Pflanzen mit Krankheitssymptomen. Im Bioland-Projekt konnte ebenfalls eine ertragssteigernde Wirkung von *M. brunneum* nachgewiesen werden (Bisutti et al. 2013). Inzwischen belegen auch andere Arbeiten, dass z. B. Antagonisten wie z.B. *Pseudomonas fluorescens* Stamm CHA0, die gegen Pflanzenkrankheiten eingesetzt werden, auch eine Wirkung auf Schadinsekten haben können (Ruffner et al. 2013). Diese und die eigenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die Bewertung von Mikroorganismen nicht nur auf einen Zielorganismus sondern auf einen Schaderregerkomplex bezogen werden sollten.

Gerade für den Erreger der *Verticillium*-Welke wird empfohlen, die MS-Anzahl pro Feld untersuchen zu lassen. Die eigenen Untersuchungen verdeutlichen, dass starke jahreszeitliche Schwankungen vorliegen, und die MS-Konzentration im Herbst am niedrigsten liegt. Aufgrund des nesterartigen Auftretens der *Verticillium*-Welke stellen die erhobenen Daten gewisse Tendenzen dar. Gerade das Produkt RhizoVital® 42 fl. könnte einen Einfluss auf die MS-Konzentration im Boden haben. Da derzeit nur über Solarisation und teils durch Zwischenfruchtanbau eine Reduktion der MS-Konzentration im Boden erreicht werden konnte, wäre die Verbesserung der Mikroorganismenaktivität des Bodens durch gezielte Anwendung von z. B. RhizoVital® 42 fl. ein praktikables und einfaches Verfahren. Dieses müsste aber durch weitere Versuche abgesichert werden.

Gerade in den zwei Versuchen auf den landwirtschaftlichen Betrieben konnte gezeigt werden, dass Mikroorganismen ertragssteigernd wirken können. Auch der Ausfall an Pflanzen konnte in einem Betrieb reduziert werden. Ob allerdings eine Ertragssteigerung von 6 bis 20% aus ökonomischer Sicht einen Einsatz der mikrobiologischen Produkte rechtfertigen kann, muss betriebswirtschaftlich bewertet werden. Da der Krankheitsverlauf der zwei Pathogene sehr stark witterungsabhängig ist, müssten weitere Versuche zur Absicherung der Ergebnisse durchgeführt werden.

## 6. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Nachdem sich das vorangegangene Projekt ausschließlich auf den biologischen Erdbeeranbau konzentrierte, werden die Erfolgsaussichten unter Einbeziehung des integrierten Erdbeeranbau deutlich günstiger gesehen. Aufgrund der Biologie (lange Persistenz der Mikrosklerotien von *V. dahliae* im Boden), der wirtschaftlichen Bedeutung gerade von *V. dahliae* (weites Wirtsspektrum) und der nur sehr begrenzt zur Verfügung stehenden Verfahren zur Regulierung bodenbürtiger Krankheitserreger werden mittel- bis langfristig die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten für die Erdbeeranbauer aber auch für den Produzenten biologischer Pflanzenschutzmittel gerade unter den politischen Rahmenbedingungen (Richtlinie 2009/128/EG) als positiv angesehen.

Da insbesondere bodenbürtige Krankheiten auch im integrierten Anbau schwierig zu bekämpfen sind und hier keine praktikablen alternativen Verfahren zur Verfügung stehen, ist ein Einsatz mikrobiologischer Produkte vergleichsweise einfach, wenn auch derzeit noch kostenintensiv. Im Unterglasanbau von Tomaten- und Paprika werden in der überwiegenden Zahl der Betriebe *Trichoderma*-Produkte eingesetzt, um die Pflanzen zu stärken bzw. vorbeugend zu behandeln. Könnte in weiteren praxisnahen Versuchen die positive Wirkung der getesteten Produkte bestätigt und statistisch abgesichert werden, wäre eine Integrierung dieser Produkte einfach umsetzbar, zumal entsprechend der eigenen Ergebnisse eine Kompatibilität mit den meisten im Erdbeeranbau verwendeten chemischen Pflanzenschutzmittel gewährleistet ist. Zu Projektbeginn war der insektenpathogene Pilz *M. brunneum* (Stamm Ma43=F52) in Deutschland nicht zugelassen und somit wurde dieser auch nicht auf den Betrieben getestet. Inzwischen liegt in Deutschland eine Zulassung auch für den Erdbeeranbau vor, so dass dieser insektenpathogene Pilz ab nächster Saison eingesetzt werden kann. Bei Bodenanwendung dieses Pilzes gegen Rüsselkäfer sollte in Zukunft auch der Einfluss auf Phytopathogene aber auch auf Mikrosklerotienkonzentrationen von *V. dahliae* im Boden mit berücksichtigt werden. In Zusammenarbeit mit dem oben genannten Biolandprojekt (FKZ: 06OE148) konnten Bisutti et al. (2013) eine ertragssteigernde Wirkung von *M. brunneum* Ma43 nachweisen, ohne den Befall des Erdbeerblütenstechers signifikant zu reduzieren.

Das Institut für Biologischen Pflanzenschutz ist das einzige Fachinstitut in Deutschland, in dem das gesamte Spektrum des biologischen und biotechnologischen Pflanzenschutzes bearbeitet wird. Damit nimmt es eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und Bewertung von Pflanzenschutzverfahren ein, die auf der Nutzung natürlicher Antagonisten von Pflanzenkrankheiten und Schädlingen basieren. Es ist somit im Interesse des Instituts,

erfolgsversprechende Ergebnisse über Folgeprojekte fortzuführen. Aufgrund der örtlichen Lage des Instituts kann über die Projektlaufzeit hinaus eine enge Zusammenarbeit mit dem örtlichen Pflanzenschutzdienst, den Erdbeeranbauern in der Region, mit der Forschungsanstalt Geisenheim als auch mit BIOLAND/Föko eine wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit gewährleistet werden.

## **7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächliche erreichte Ziele**

Das **Gesamtziel** des beantragten Projektes war die Erarbeitung von Konzepten zur Regulierung von Schaderregern, um die Rahmenbedingungen für eine weitere Stärkung und Ausdehnung des ökologischen Erdbeeranbaus dauerhaft zu verbessern. Aufgrund der Richtlinie 2009/128/EG und dem daraus resultierenden Nationalen Aktionsplan sollte sich darauf konzentriert werden, biologische Methoden zu entwickeln bzw. zu optimieren.

Basierend auf den Labor- und Gewächshausversuchen konnten mikrobiologische Produkten mit antagonistischem Potential identifiziert werden. Weiterführende Ergebnisse veranschaulichten, dass diese Produkte miteinander kombiniert werden konnten und sich auch in der Regel mit chemischen Pflanzenschutzmitteln kombinieren ließen. Gewächshaus- und Freilandversuche legten aber auch dar, dass der Nutzen antagonistischer Mikroorganismen aufgrund ihrer komplexen Effekte schwer zu bewerten ist. Neben einer teils wuchsfördernden bzw. pflanzenstärkenden Wirkung erbrachten Freilandversuche in 2013 und 2014 Mehrerträge bis zu 20% nach Anwendung mikrobiologischer Produkte. Es besteht somit die berechtigte Hoffnung, dass mikrobiologischer Produkte mit dazu beitragen können, eine Stärkung und Ausdehnung des ökologischen und konventionellen Erdbeeranbaus zu verbessern. Allerdings muss der Einfluss der Mikroorganismen auf die Ertragssteigerung bzw. –stabilisierung durch weitere Versuche bestätigt werden. Auch sollte die Ökosystemleistung von Mikroorganismen in Agrarkulturlandschaften in Zukunft mehr Aufmerksamkeit gewidmet werden.

Das **Hauptziel** des beantragten Projektes war die Entwicklung eines nachhaltigen Applikationssystems zur Regulierung eines Schaderregerkomplexes durch mikrobiologische Präparate im ökologischen aber auch integrierten Erdbeeranbau. Dieses Ziel konnte nur in Teilen erreicht werden, da sich auf einzelne Applikationen und deren Kombinationen sowie der Kombination mit chemischen Pflanzenschutzmitteln konzentriert wurde. Fragen zur Nachhaltigkeit der Applikationssysteme konnten aus Zeitgründen nicht bearbeitet werden.

Die **wissenschaftlichen und/oder technischen Arbeitsziele** konnten im Wesentlichen erreicht werden. So konnte gezeigt werden, dass mikrobiologische Präparate bodenbürtige bzw. wurzelinfizierende Krankheitserreger der Erdbeere beeinflussen können. In wie weit eine effektive und ökonomisch sinnvolle Regulierung möglich ist, müsste allerdings noch in weiteren Feldversuchen geprüft werden. Die Beeinflussung (positiv wie negativ) mikrobiologischer Präparate auf andere Schaderreger konnte exemplarisch anhand der Versuche zur Anwendung des insektenpathogenen Pilzes *Metarhizium brunneum* Ma43 gegen Phytopathogene aufgezeigt werden. Der Einfluss von Mikroorganismen auf die Pflanzengesundheit kann dem zufolge sehr vielfältig sein, Wechselwirkungen innerhalb eines Schaderregerkomplexes sind zu erwarten. Durch die Zusammenarbeit mit der Hochschule Geisenheim konnte gezeigt werden, dass antagonistische Mikroorganismen auch Blatt- und Fruchtpathogene beeinflussen. Da allerdings keine Freilandflächen mit einem hohen Infektionsdruck an bodenbürtigen bzw. Blatt- und Fruchtpathogenen und Schädlingen zur Verfügung standen, konnte der Beweis, dass ein Schaderregerkomplex effektiv unter praxisnahen Bedingungen kontrolliert werden kann, nicht erbracht werden. Das Verbundprojekt konnte darlegen, dass antagonistische Mikroorganismen in ein Erdbeeranbausystem integriert werden können. Arbeiten zur optimierten Applikationstechnik zeigen, dass hier noch Optimierungspotential vorhanden ist.

## 8. Zusammenfassung

Auf Laboruntersuchungen aufbauend wurden im Rahmen des vorliegenden Projektes drei Mikroorganismen bzw. Produkte für weitere Versuche ausgewählt: der bakterielle Antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, der Pilz *Trichoderma harzianum* T58 und der insektenpathogene Pilz *Metarhizium brunneum* Ma43.

In Gewächshausversuchen wurde die Wirkung dieser drei antagonistischen Mikroorganismen sowie deren Mischung auf Pflanzengesundheit, Pflanzenwuchs und Fruchtertrag hin untersucht. In der unbehandelten Kontrolle starben nach künstlicher Infektion mit *P. cactorum* bis zu 44% der Pflanzen ab. Überlebende Pflanzen zeigten deutlich geringeren Fruchtertrag und das Wurzelwachstum war stark reduziert. Bei den mit den Antagonisten behandelten Pflanzen konnte die Absterberate bis auf null Prozent reduziert und der Ertrag nach Anwendung pilzlicher Antagonisten leicht erhöht werden. Bei mit *V. dahliae* infizierten Pflanzen zeigten auch die bakteriellen Antagonisten sowie die Mischung einen positiven Einfluss auf den Fruchtertrag.

Um die Integration von Antagonisten in eine IPM-Strategie zu prüfen, wurde die Kompatibilität dieser mit chemischen Pflanzenschutzmitteln geprüft. Nur in wenigen Fällen konnte ein



negativer Einfluss dieser chemischen Pflanzenschutzmittel auf die Vitalität der getesteten Mikroorganismen festgestellt werden.

Freilandflächen von zwei Praxisbetrieben im Rhein-Main Gebiet, die nachweislich mit *V. dahliae* befallen waren, wurden mit den Produkten RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl. und Trichostar<sup>®</sup> und deren Mischung behandelt. Bei Betrieb D konnte durch Anwendung von RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl. in 2013 der Ertrag um fast 21% und bei Betrieb G durch Anwendung von Trichostar<sup>®</sup> um ca. 10% erhöht werden. In 2014 wurden diese Ertragssteigerungen nicht erreicht. Jedoch konnte ähnliche Tendenzen erfasst werden. In den Ertragsjahren 2013 und 2014 wurden bei Betrieb D durch einmalige Anwendung von Trichostar<sup>®</sup> eine Steigerung von 8 bzw. 9% erreicht und bei Betrieb G nach jährlicher Anwendung von RhizoVital<sup>®</sup> 42 fl. in beiden Jahren eine 6%ige Steigerung erzielt. Die eigenen Ergebnisse und die der Projektpartner zeigen, dass Mikroorganismen die Pflanzengesundheit fördern und somit auch eine ertragsstabilisierende bzw. -steigernde Wirkung erzielen. Jedoch müssen die Ergebnisse durch weitere Versuche in Praxisbetrieben noch abgesichert werden.

## 9. Literaturverzeichnis

Anandhakumar J. and Zeller W., 2008. Biological control of red stele (*Phytophthora fragariae* var. *fragariae*) and crown rot (*P. cactorum*) disease of strawberry with rhizobacteria. Journal of Plant Diseases and Protection, 115 (2): 49-56.

Berg G., Fritze A., Roskot N. and Smalla K., 2001. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. Journal of Applied Microbiology, 91: 963-971.

Berg G., Opelt K., Zachow C., Lottmann J., Gotz M., Costa R. and Smalla K., 2006. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. Fems Microbiology Ecology, 56: 250-261.

Bisutti I.L., Steen C. and Stephan D., 2013. Does *Metarhizium anisopliae* influence strawberries in presence of pest and disease? Abstracts of the 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology Conference on Invertebrate Pathology and Microbial Control, 87.

Byer K. N., Peng G., Wolf T.M. and Caldwell B.C., 2006. Spray retention for liquid and mycoherbicide inoculum in three weed-biocontrol systems. Biocontrol Science and Technology, 16: 815-823.

Cross J.V., Easterbrook M.A., Crook A.M., Crook D., Fitz Gerald J.D., Innocenzi P.J., Jay C.N. and Solomon G.M. 2001. Review: Natural enemies and biocontrol of pests of strawberry in northern and central Europe. *Biocontrol Science and Technology*, 11: 165-216.

Dathe B., 1994. Unterschiede in der Anfälligkeit von Erdbeeren gegen *Verticillium*. *Obstbau*, 8: 405-407.

Debode J., De Maeyer K., Perneel M., Pannecouque J., De Backer G. and Höfte M., 2007. Biosurfactants are involved in the biological control of *Verticillium microsclerotia* by *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1184-1196.

Doyle J.J. and Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.

Edwards K., Johnstone C. and Thompson C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research*, 19: 1349.

Eikemo H., Stensvand A. and Tronsmo A., 2003. Induced resistance to *Phytophthora* diseases in strawberry. *Bulletin Oilb/Srop*, 26: 187-192.

Elad Y., Chet I. and Y Henis Y., 1981. A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, 9 (1): 59-67.

Erdogan O. and Benlioglu K., 2010. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control*, 53: 39-45.

Fradin E.F. and Thomma B.P.H.J., 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7 (2): 71-86.

Howart G., Holm F. and Wolf T., 2004. Interaction of droplet size and carrier volume for coverage and efficacy. *Aspects of Applied Biology*, 71: 231-238.

Klein R., Golus J. and Nelms K., 2009. The effect of adjuvants, pesticide formulation, and spray nozzle tips on spray droplet size. *Journal of ASTM International* JAI102156.

Knoche M., 1994. Effect of droplet size and carrier volume on performance of foliage-applied herbicides. *Crop Protection*, 13: 163-178.

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

Kuchta P., Jęcz T. and Małgorzata K., 2008. The suitability of PCR-based techniques for detecting *Verticillium dahliae* in strawberry plants and soil. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 6 (1): 295-304.

Lamers J. G., Evenhuis A., Wanten P. and Blok W.J., 2008. Biological soil disinfestation to control *Verticillium dahliae* in strawberries. COST863 WG2 and WG3 Joint SGM Jokioinen 19-20 May 2008.

Li K.-N., Rouse D. I., Eyestone E. J. and German T. L., 1999. The generation of specific DNA primers using random amplified polymorphic DNA and its application to *Verticillium dahliae*. *Mycological Research*, 103 (11): 1361-1368.

Li M., Asano T., Suga H., and Kageyama K., 2011. A multiplex PCR for the detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and a survey of their occurrence in strawberry production areas of Japan. *Plant Disease*, 95 (10): 1270-1278.

Marois J.J., Fravel D.R. and Papavizas G.C., 1984. Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere and its interaction with *Verticillium dahliae*. *Soil Biology and Biochemistry*, 16 (4): 387-390.

Michel V., Dutheil A., Ancay A. and Fuchs J., 2006. The use of compost and green manure to control soil borne diseases of strawberry. *Bulletin Oib/Srop*, 29: 59-66.

Möller E.M., Bahnweg G., Sandermann H. and Geiger H.H., 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20: 6115-6116.

Moorhouse E.R., Gillespie A.T. and Charnley A.K., 1992. Effect of potting media on the control of *Otiorhynchus sulcatus* larvae on outdoor strawberry plants using the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 2: 238-243.

Moser R., Pertot I., Elad Y. and Raffaelli R., 2008. Farmers' attitudes toward the use of biocontrol agents in IPM strawberry production in three countries. *Biological Control*, 47 (2): 125-132.

Neubauer C. and Heitmann B., 2011. Quantitative detection of *Verticillium dahliae* in soil as a basis for selection of planting sites in horticulture. *Journal für Kulturpflanzen*, 63(1): 1-8.

Porras M., Barrau C., Arroyo F.T., Santos B., Blanco C. and Romero F., 2007. Reduction of *Phytophthora cactorum* in strawberry fields by *Trichoderma* spp. and soil solarization. *Plant Disease*, 91(2): 142-146.

Reineke A., Karlovsky P. and Zebitz C.P.W., 1998. Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *Insect Molecular Biology*, 7: 95-99.

Ruffner B., Péchy-Tarr M., Ryffel F., Hoegger P., Obrist C., Rindlisbacher A., Keel C. and Maurhofer M., 2013. Oral insecticidal activity of plant-associated pseudomonads. *Environmental Microbiology*, 15(3): 751-763.

Sabbhai R, Merzouki A. and Guertin C., 2008. Efficacy of *Beauveria bassiana* against the strawberry pests, *Lygus lineolaris*, *Anthonomus signatus* and *Otiorhynchus ovatus*. Journal of Applied Entomology, 132: 151-160.

Sabbhai R, Merzouki A. and Guertin C., 2009. Potential effect of *Beauveria bassiana* (*Hypocreales: Clavicipitaceae*) on *Anthonomus signatus* (*Coleoptera: Curculionidae*) in strawberries. Biocontrol Science and Technology, 19: 729-741.

Shaw D.V., Gordon T.R., Hansen J. and Kirkpatrick S.C., 2010. Relationship between the extent of colonization by *Verticillium dahliae* and symptom expression in strawberry (*Fragaria x ananassa*) genotypes resistant to verticillium wilt. Plant Pathology, 59: 376-381.

Stephan D. and Bisutti I.L., 2011. Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren Teilprojekt: Bodenbürtige Krankheitserreger, (06OE155) Endbericht.

Stevenson L. A., Fahleson J., Hu Q. and Dixelius C., 2002. Identification of the causal agent of Verticillium wilt of winter oilseed rape in Sweden, *V. longisporum*. Mycological Research, 106 (5): 570-578.

Stol'nikova N. and Shamanskaya L., 2002. Evaluating strawberry cultivars for resistance to raspberry-strawberry weevil. Sadovodstvo i Vinogradarstvo, 16-17.

Subbarao K. V., Kabir Z., Martin F. N. and Koike S. T., 2007. Management of soilborne diseases in strawberry using vegetable rotations. Plant Disease, 91: 964-972.

Van der Scheer H.A.Th., 1971. Isolation of *Phytophthora cactorum* from soil in orchards and strawberry fields and differences in pathogenicity to apple. Netherlands Journal of Plant Pathology, 77(3): 65-72.

## 10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektteilnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt

Termin		Art der Darstellung
20.-22. Februar 2012	15 <sup>th</sup> International Conference on Organic Fruit-Growing, Hohenheim	Poster und Kurzvortrag: Influence of antagonistic micro-organism on the growth of strawberry plants in the presence of <i>Verticillium dahliae</i> and <i>Phytophthora cactorum</i>
22. Februar 2012	Erdbeer Fachtagung, LLH Griesheim	Vortrag: <i>Verticillium</i> -Welke
15.-16. März 2012	Tagung des Arbeitskreises „Biologische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten“, Einbeck	Vortrag: Einfluss von Antagonisten auf <i>Verticillium dahliae</i> an Erdbeeren
24.-27. Juni 2012	IOBC Tagung; Arbeitskreis “Biological Control of Fungal and Bacterial Pathogens”, Reims (F)	Vortrag: Influence of antagonists on <i>Verticillium dahliae</i> on strawberry plants
10.-11. Juli 2012	Fachtagung zur Ökoforschung, Hohenheim	Poster: Influence of antagonistic micro-organism on the growth of strawberry plants in the presence of <i>Verticillium dahliae</i> and <i>Phytophthora cactorum</i>
11.-14. September 2012	58. Pflanzenschutztagung, Braunschweig	Vortrag: Einsatz mikrobiologische Präparate zur Regulierung von <i>Verticillium</i> -Welke und Rhizomfäule an Erdbeeren
23. September 2012	Tag der offenen Tür am JKI Darmstadt	Vorstellung des Projektes
5.-8. März 2013	11 <sup>th</sup> International Verticillium Symposium, Göttingen	Poster: Influence of antagonistic micro-organisms on the growth of strawberry plants in the presence of <i>Verticillium dahliae</i>
11.-15. August 2013	46 <sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Pittsburg PA (USA)	Poster: Does <i>Metarhizium anisopliae</i> influence strawberries in presence of pest and disease?
18.-19. November 2013	Abschlussveranstaltung des Verbundprojektes Ökologischer Erdbeeranbau, Geisenheim	Vortrag: Einsatz von Mikroorganismen zur Regulierung der bodenbürtigen Erdbeerkrankheiten <i>Verticillium dahliae</i> und <i>Phytophthora cactorum</i>
12.-15. Februar 2014	Biofach, Nürnberg	Vorstellung des Projektes
23.-26. September 2014	59. Pflanzenschutztagung, Freiburg	Vortrag: Einsatz von Mikroorganismen zur Regulierung der bodenbürtigen Erdbeerkrankheiten <i>Verticillium dahliae</i> und <i>Phytophthora cactorum</i> .

## Veröffentlichungen

Bisutti I.L., Pelz J. und Stephan D., 2012. Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von *Verticillium*-Welke und Rhizomfäule an Erdbeeren; Julius-Kühn-Archiv, 438, p. 257.

Bisutti I.L., Pelz J. and Stephan D., 2012. Influence of antagonistic micro-organisms on the growth of strawberry plants in the presence of *Verticillium dahliae* and *Phytophthora cactorum*; Proceedings of the 15<sup>th</sup> "International conference on organic fruit-growing", p. 399-403.

Bisutti I.L. and Stephan D., 2013. Influence of antagonists on *Verticillium dahliae* on strawberry plants; IOBC/wprs Bulletin Vol. 86, pp. 87-88.

Bisutti I.L. and Stephan D., 2013. Influence of antagonistic micro-organisms on the growth of strawberry plants in the presence of *Verticillium dahliae*; Abstracts of the 11<sup>th</sup> International Verticillium Symposium, p. 142.

Bisutti I.L., Steen C. and Stephan D., 2013. Does *Metarhizium anisopliae* influence strawberries in presence of pest and disease? Abstracts of the 46<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology Conference on Invertebrate Pathology and Microbial Control, p. 87.

Stephan D und Bisutti I.L., 2014. Mikroorganismen als Helfer im Erdbeeranbau; Forschungsreport 1/2014, pp. 16-19.

Bisutti I.L. und Stephan D., 2014. Einsatz von Mikroorganismen zur Regulierung der bodenbürtigen Erdbeerkrankheiten *Verticillium dahliae* und *Phytophthora cactorum*; Julius-Kühn-Archiv, 447, p. 329.

## 11. Anhang I

**Tabelle A1:** Verwendete Nährmedien und Nährlösungen.

Medien	
CD	35,0 g Czapek- Dox Broth (Otto Nordwald, #233810)
MPA	30,0 g Malzextrakt (Merck, #1.05391) 5,0 g Pepton aus Sojabohnenmehl (Merck, #1.07212) 15,0 g Agar-Agar (Roth, #5210.2)
MPA+	MPA 30,0 mg Streptomycinsulfat (Sigma, #S6501) 50,0 mg Chloramphenicol (Roth, #3886.1) 50,0 mg Benomyl (Aldrich, #381586)
MSM ( <i>Metarhizium anisopliae</i> Sporen Selektivmedium; nach Strasser, pers. Mitteilung)	39 g PDA (BD, #213400) 1 g Hefeextract (Merck, # 0.5g Chloramphenicol (Roth, #3886.1) 0.25 g Cycloheximide (Sigma, #C7698) 0.004g Thiabendazole (Sigma, #T5535) 0.01g Bengalrosa (Merck/AppliChem, #1843)
PEM (nach Neubauer und Heitmann, 2011)	0,50 mL 2M MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Merck, #1.05886) 1,00 mL Tergitol Type NP-10 (Sigma) 5,00 mL 2M KNO <sub>3</sub> (Merck, 1.05063) 10,00 mL 1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, #1.04873) 250,00 mg Chloramphenicol (Roth, #3886.1) 5,00 g Polygaracturonic acid (MP-Biomedicals) 15,00 g Agar-Agar (Merck, 1.05063) Natronlauge um den pH einzustellen 200 mg Streptomycinsulfat (Sigma, #S6501) 1 mg Biotin (Sigma-Aldrich, #B4501)
TSB	30,0 g Bacto™ Tryptic Soy Broth (Otto Nordwald, #211822)
TSA	TSB 15,0 g Agar-Agar (Roth, #5210.2)
TSM ( <i>Trichoderma</i> Selektivmedium; verändert nach Elad, 1981)	0,900 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Roth, #6875.1) 0,150 g KCl 0,200 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Merck, #1.05886) 1,00 g NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (Merck, 1.01188) 3,30 g Glucose x H <sub>2</sub> O (Merck, #1.08342) 20,00 g Bacto Agar (BD, #214010) 150 mg Bengalrosa (Merck/AppliChem, #1843) 300 mg Streptomycinsulfat (Sigma, #S6501)
V8-flüssig	300 mL Gemüsesaft (Viva Vital, Netto) 4,5 g CaCO <sub>3</sub> (Merck, #1.02066) 30 mg β-Sitosterol (Fluka, #85451)
SNA (nach Nirenberg, 1976)	1,0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Merck, #1.04873) 1,0 g KNO <sub>3</sub> (Merck, 1.05063) 0,5 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Merck, #1.05886) 0,5 g KCl 0,2 g Glucose (Merck, 1.08337) 0,2 g Saccharose (Roth, #4621,2) 15,0 g Agar-Agar (Merck, 1.05063) 100 mg Penicillin G (Serva, #31749) 12 mg Tetracycline x HCl (Serva, 35866) 50 mg Streptomycinsulfat (Sigma-Aldrich, #S6501)
MSA	50 mL Möhrensaft 15,0 g Agar-Agar (Merck, 1.05063)

**Tabelle A1 (Fortsetzung):** Verwendete Nährmedien und Nährlösungen.

Medien	
Quarzsand-Roggenmehl Gemisch (Heitmann, persönliche Mitteilung)	210,0 g Quarzsand 15,0 g Roggenmehl (health food quality) 20 mL entionisiertes Wasser
Vermiculit-Weizenkleie Gemisch	100,0 g Vermiculit 100,0 g Weizenkleie 50 mL Gemüsesaft (Viva Vital, Netto) klarifiziert mit CaCO <sub>3</sub> (Merck, #1.02066)

Außer für Gemisch sind die Angaben für ein Liter angegeben. Alle Medien bei 121 °C 20 Min autoklaviert

### Getestete PCR Protokolle

#### Allgemein (Leclerque 2012, Pers. Mitt.)

initial denaturation	5 min	94 °C	35 cycles
denaturation	1 min	94 °C	
annealing	1 min	60 °C	
elongation	1 min	72 °C	
final elongation	10 min	72 °C	

initial denaturation	2 min	94 °C	30 cycles
denaturation	1 min	94 °C	
annealing	1 min	60 °C	
elongation	2 min	72 °C	
final elongation	5 min	72 °C	

initial denaturation	3 min	95 °C	34 cycles
denaturation	1 min	94 °C	
annealing	1 min	52 °C	
elongation	1 min	72 °C	
final elongation	5 min	72 °C	

### Spezifisch

#### Amplification for *V. longisporum* (Stevenson et al. 2002)

initial denaturation	2 min	94 °C	30 cycles
denaturation	2 min	94 °C	
annealing	2 min	48 °C	
elongation	3 min	72 °C	
final elongation	10 min	72 °C	



**Amplification for *V. dahliae*** (Li et al. 1999)

initial denaturation	3 min	95 °C	40 cycles
	1 min	37 °C	
	1 min	72 °C	
denaturation	1 min	95 °C	
annealing	1 min	37 °C	
elongation	1 min	72 °C	
final elongation	4 min	72 °C	

**Amplification for *P. cactorum*** (Li et al. 2011)

initial denaturation	5 min	95 °C	35 cycles
denaturation	30 s	95 °C	
annealing	30 s	66 °C	
elongation	1 min	72 °C	
final elongation	10 min	72 °C	

**Tabelle A2:** Getestete Pflanzenschutzmittel

Name		Schadereger	PfSchG	Zulassung bis	WZ	Konz. %
Aliette®	Fungizid	Rhizomfäule ( <i>P. cactorum</i> ) - Rote Wurzelfäule ( <i>P. fragariae</i> )	§ 15	Ende 2015	F	0,50 - 1
Calypso®	Insektizid	Blattläuse, Erdbeerblütenstecher zur Befallsminderung	§ 18a	Ende 2015	3	0,0125
Discus®	Fungizid	Echter Mehltau	§ 18a	Ende 2016	7	0,015
Flint®	Fungizid	Echter Mehltau, Weiß- und Rotfleckenkrankheit	§ 18a	Ende 2014	3	0,015
Fortress* 250	Fungizid	Echter Mehltau	§ 18a	Ende 2016	14	0,025
Funguran®	Fungizid	Eckige Blattfleckenkrankheit	§ 18a	Ende 2017	F	0,05
Ortiva®	Fungizid	<i>Colletotrichum</i> , Zusatzwirkung Mehltau, <i>Botrytis</i>	§ 18a	Ende 2020	F	0,05
Score®	Fungizid	Weiß- und Rotfleckenkrankheit, <i>Gnomonia</i>	§ 18a	Ende 2020	F	0,02
Signum®	Fungizid	Grauschimmelfäule, <i>Gnomonia</i> , Weiß- und Rotfleckenkrankheit	§ 15	Ende 2019	3	0,09
Stomp® Aqua	Herbizid	1-jähr. 2-keimblättrige Unkräuter (ausg. Klettenlabkraut, Kamillearten, Franzosenkrautarten, gem. Kreuzkraut)	§ 18a	Ende 2017	F	0,167
Switch®	Fungizid	Grauschimmelfäule	§ 15	Ende 2012	7	0,05
Teldor®	Fungizid	Grauschimmelfäule	§ 15	Ende 2021	3	0,10
Topas®	Fungizid	Echter Mehltau	§ 18a	31.05.2012	3	0,025
Vertimec®	Akarizid	Spinnmilben, Erdbeermilben, Thripse (GW)	§ 18a	Ende 2013	7, GW 3	0,0625

WZ: Wartezeit

**Tabelle A3:** Informationen über die gepflanzte Felder

	<b>Betrieb D</b>	<b>Betrieb G</b>	<b>Institut</b>
<b>Lage</b>	Bergen-Enkheim N 50° 10' 20.735" E 8° 47' 06.315"	Bischofsheim N 49° 58' 38.047" E 8° 22' 12.857"	Darmstadt N 49° 52' 1.822" E 8° 41' 1.926"
<b>Vorkultur / Vorbehandlung</b>	Erdbeere	Ölrettich Gründüngung	Kompost ausgebracht / Erdbeere
<b>Bepflanzt</b>	09.05.2012 Frigo-Pflanzen / Honeoye	16.08.2012 Grünpflanzen / Honeoye	23.08.2012 Frigo-Pflanzen / Honeoye
<b>BCA</b>	RhizoVital® 42 fl., Trichostar®, Mischung der beide	RhizoVital® 42 fl., Trichostar®, Mischung der beide	RhizoVital® 42 fl., Trichostar®, <i>M. brunneum</i> Ma43, Mischung der drei
<b>Behandlungen mit BCA</b>	04.07.2012 26.04.2013	01.10.2012 24.04.2013 16.04.2014	01.11.2012 06.06.2013
<b>Sandanteil Schluff + Tonanteil</b>	37,5% 62,2%	80,4% 19,6%	92,9% 7,1%
<b>pH</b>	6,75	8,21	8,37
<b>MS per g Boden §</b>	7,2	8,8	künstlich inokuliert
<b>Richtung</b>	20° N-E	46° N-E	14° N-O
<b>Bewässerung</b>	nein	ja	ja
<b>Bonitur</b>	13.06.2012 25.07.2012 08.08.2012 05.-07.09.2012 23.04.2013 26.04.2013(Etikettierung) 02.07.2013	28.05.2013(Etikettierung) 11.07.2013 08.11.2013 23.06.2014	12.09.2012 16.05.2013(Etikettierung) 22/23.07.2013 20.08.2013 19.09.2013 25/26.06.2014
<b>Ernten</b>	4 Termine in 2013 und 2014	6 Termine 2013 und 10 Termine 2014	4 Termine 2013 je alte und neue Pflanzung und 10 Termine 2014
<b>Entrankung</b>	25.07.2012 08.08.2012 05.-07.09.2012 (mechanisch)	18.10.2012 (mechanisch/chemisch)	vom 31.3.2013 bis 08.08.2013 (mechanisch); 05.2014 (mechanisch)
<b>Bodenproben</b>	11.07.2013 19.09.2013 24.10.2013 26.03.2014 01.07.2014	11.07.2013 14.08.2013 19.09.2013 24.10.2013 26.03.2014 23.06.2014	nein
<b>Vliesabdeckung</b>	nein	ja	nein
<b>Folienabdeckung</b>	nein	ja	nein
<b>Stroh ausgebracht</b>	ja	ja	nein
<b>Ab häckseln und Durchfräßen</b>	12.07.2013	10.07.2013	nein

§ Bodenproben am Tag der Pflanzung genommen.

<b>Nord</b>		
<b>Teil 1</b>		<b>Teil 2</b>
<b>Süd</b>		

**Abbildung A1:** Lage der Freilandversuche am Institut 2012-2013

<b>Kontrolle</b>	<b>RhizoVital® 42 fl.</b>	<b>Trichostar®</b>	<b>Ma43</b>	<b>Mischung</b>
<b>Mischung</b>	<b>Ma43</b>	<b>RhizoVital® 42 fl.</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Trichostar®</b>
<b>Ma43</b>	<b>Trichostar®</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Mischung</b>	<b>RhizoVital® 42 fl.</b>
<b>RhizoVital® 42 fl.</b>	<b>Mischung</b>	<b>Ma43</b>	<b>Trichostar®</b>	<b>Kontrolle</b>

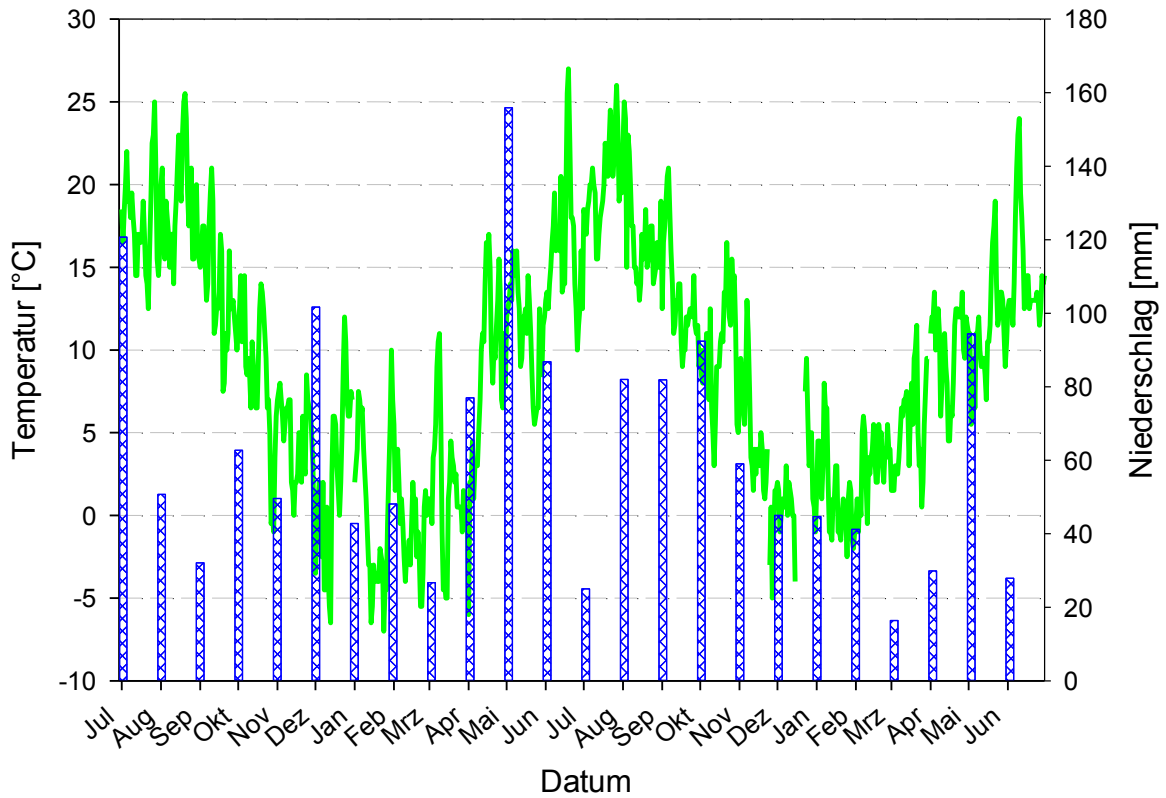
Ma43: *Metarhizium brunneum* Ma43; Mischung: Gemisch aus Trichostar® 1%, RhizoVital® 42 fl. 0,1% und Ma 43 1x10<sup>5</sup> Sporen/mL. Trichostar® wurde vier Stunden aktiviert.

**Abbildung A2:** Versuchsaufbau der Freilandversuche am Institut 2012-2013 oben Teil 1 und unten Teil 2

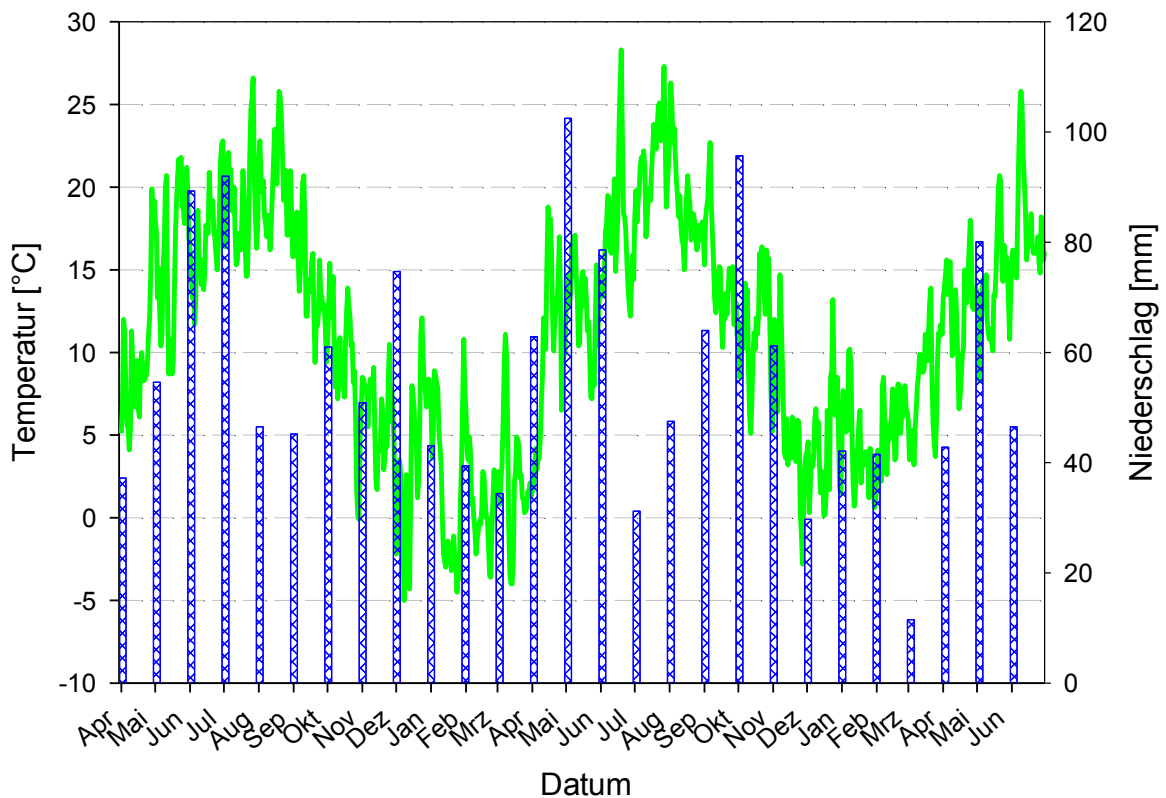
<b>Kontrolle</b>	<b>RhizoVital® 42 fl.</b>	<b>Trichostar®</b>	<b>RhizoVital® 42 fl.+ Trichostar®</b>
<b>Trichostar®</b>	<b>RhizoVital® 42 fl.+ Trichostar®</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>RhizoVital® 42 fl.</b>
<b>RhizoVital® 42 fl.</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>RhizoVital® 42 fl.+ Trichostar®</b>	<b>Trichostar®</b>
<b>RhizoVital® 42 fl.+ Trichostar®</b>	<b>Trichostar®</b>	<b>RhizoVital® 42 fl.</b>	<b>Kontrolle</b>

Bei der Mischung von RhizoVital® 42 fl. und Trichostar® wurden die vom Hersteller genannte Konzentrationen (0,1% und 1%) im Endvolumen gemischt. Trichostar® wurde vier Stunden aktiviert.

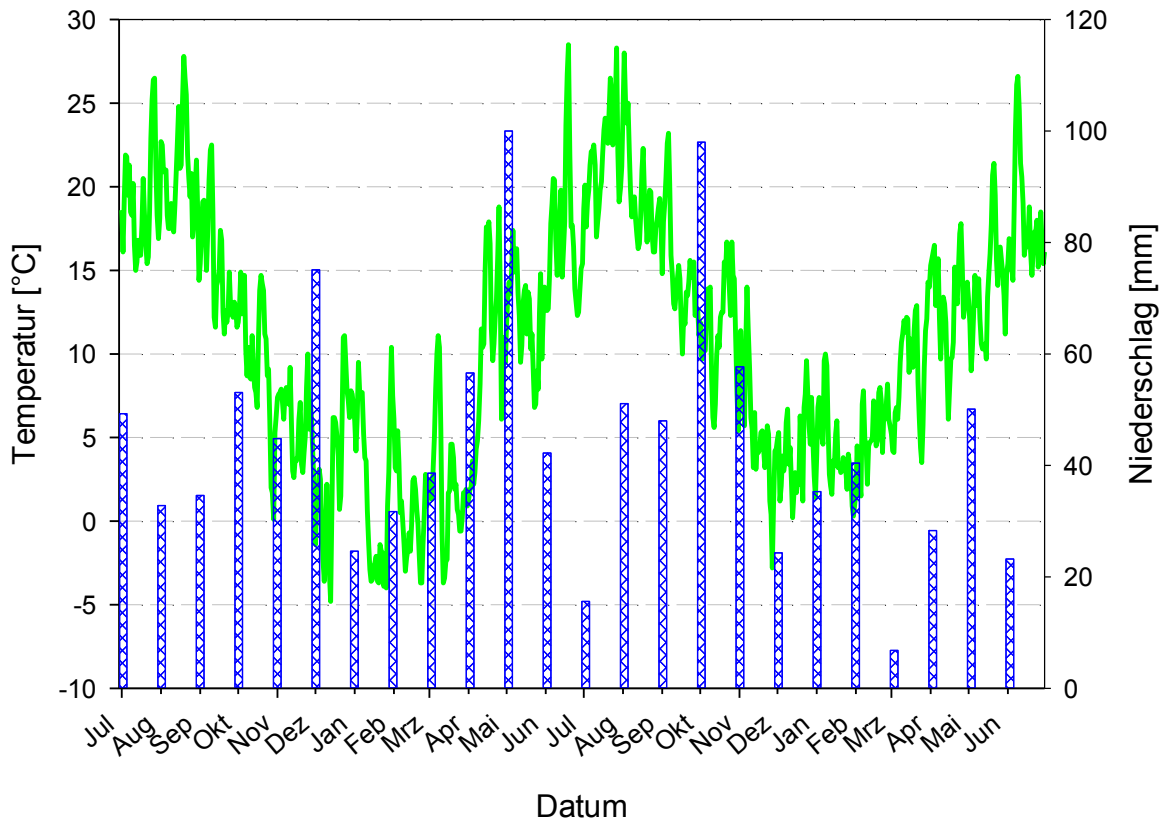
**Abbildung A3:** Versuchsaufbau der Freilandversuche bei Betrieb D und G



**Abbildung A4:** Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen während des Versuchszeitraums von Institut (vom 01.07.2012 bis 30.06.2014). Daten von der Instituts Wetterstation



**Abbildung A5:** Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen während des Versuchszeitraums von Betrieb D (vom 01.04.2012 bis 30.06.2014). Daten vom Deutschen Wetterdienst: Wetterstation in Offenbach-Wetterpark



**Abbildung A6:** Temperaturverlauf und Niederschlagsmengen während des Versuchszeitraums von Betrieb G (vom 01.07.2012 bis 30.06.2014). Daten vom Deutschen Wetterdienst: Wetterstation in Mainz-Lerchenberg (ZDF)

**Tabelle A4:** Prozentanteil lebender Pflanzen nach Bonitur am 22.-23.03.2012

Kontrolle		T58		Ma43		P1		FZB24		Mischung	
S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H
33	77	87	100	93	86	21	79	100	93	71	83
<b>FZB24</b>		<b>P1</b>		<b>Mischung</b>		<b>T58</b>		<b>Ma43</b>		<b>Kontrolle</b>	
S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H
57	80	80	93	93	86	100	60	87	87	93	87
<b>Mischung</b>		<b>Ma43</b>		<b>FZB24</b>		<b>Kontrolle</b>		<b>P1</b>		<b>T58</b>	
S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H
60	25	13	13	0	7	7	0	13	0	27	40
<b>P1</b>		<b>Kontrolle</b>		<b>T58</b>		<b>Ma43</b>		<b>Mischung</b>		<b>FZB24</b>	
S	H	S	H	S	H	S	H	S	H	S	H
67	80	69	0	71	43	67	60	80	27	73	60

Über der grauen Doppellinie einfacher Anwendungsmenge, unter der Doppellinie 10facher Anwendungsmenge  
 T58: *Trichoderma harzianum* T58; Ma43: *Metarhizium brunneum* Ma43; P1: *T. atroviride* P1; FZB24: RhizoPlus®;  
 Mischung: Gemisch aus den vier obengenannten Antagonisten mit jeweils 25 % Aufwandmenge.  
 S: cv. Sonata; H: cv. Honeoye