



Selektion von Bakterien und Pilzen gegen das Eschentriebsterben

Für die Widerstandsfähigkeit von Eschen gegenüber dem Erreger des Eschentriebsterbens *Hymenoscyphus fraxineus* kann neben dem Pflanzengenotyp auch die Zusammensetzung des Mikrobioms in den Blättern verantwortlich sein. Durch Vergleich der Mikrobiome anfälliger und resistenter Eschen und ein Screening auf Antagonisten wurden Pilze und Bakterien selektiert, die potenziell für die biologische Bekämpfung des Pathogens geeignet sind.

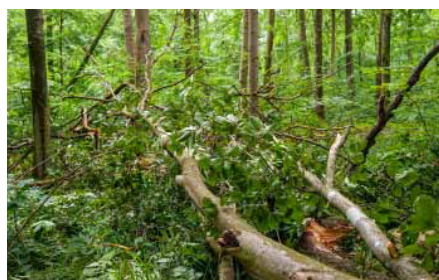
TEXT: KRISTINA ULRICH, REGINA BECKER, UNDINE BEHRENDT, MICHAEL KUBE, ANDREAS ULRICH

Das durch den Pilz *Hymenoscyphus fraxineus* verursachte Eschentriebsterben hat sich in den letzten Jahren massiv in Europa ausgebreitet. Die Erkrankung ruft schwerwiegende Schäden an Bäumen aller Altersklassen hervor und führt letztlich zum Absterben ganzer Bestände. Durch die hohen Verluste und die krankheitsbedingten schlechten Stammformen ist die forstliche Zukunft der Esche stark gefährdet. Der Erreger stammt ursprünglich aus Asien, wo er zuerst auf Laubstreu und später auch als harmloser Endophyt der Mandschurische Esche (*Fraxinus mandshurica*) nachgewiesen wurde. Die Übertragung der Krankheit erfolgt durch Ascosporen. Diese entstehen je nach Witterungsbedingungen von Mai bis August in der vorjährigen Laubstreu



Schneller ÜBERBLICK

- » **Das durch den Pilz** *Hymenoscyphus fraxineus* verursachte Eschentriebsterben hat sich massiv ausgebreitet
- » **Blattbesiedelnde** Bakterien und Pilze können das Eindringen und die Ausbreitung des Pathogens verhindern
- » **Durch Vergleich** der Mikrobiome anfälliger und resistenter Eschen und ein Screening auf Antagonisten wurden Pilze und Bakterien selektiert, die potenziell mit der Abwehr von *H. fraxineus* in Verbindung stehen können



Fotos: Thünen-Institut

Abb. 1: Die Entnahme von Blattproben aus widerstandsfähigen Eschen erfolgte mithilfe einer Schleuder (oben). Anfällige Bäume wurden zur Probenahme gefällt (unten links) und wiesen zum Teil starke Stammfußnekrosen als Sekundärschaden auf (unten rechts).

infizierter Eschenbestände in becherförmigen Fruchtkörpern und werden durch den Wind über große Entfernungen verfrachtet, um wieder neue Eschen über die Blätter zu infizieren. Das Pilzmycel kann bereits im August

über die Blattstiele in die Triebe eindringen und dort die Markröhre und das Xylem erreichen [6].

Die Bekämpfung des Eschentriebsterbens durch waldbauliche Maßnahmen ist sehr schwierig. Da ein geringer

„Erste Inokulationsversuche waren erfolgversprechend.“

KRISTINA ULRICH

Prozentsatz der Eschen unempfindlich gegenüber dem Erreger ist, wird die Selektion resistenter Einzelbäume zum Aufbau von Samenplantagen bis jetzt als einzige Möglichkeit zur Erhaltung der Baumart gesehen. In den letzten Jahren haben jedoch zahlreiche Studien gezeigt, dass Resistenzen nicht nur durch den genetischen Hintergrund, sondern auch durch das Mikrobiom (Gesamtheit der Mikroorganismen) der Pflanze bestimmt werden [10]. Die Wirkung von Mikroorganismen auf Pathogene kann über Antagonismus (Antibiose, Produktion lytischer Enzyme) oder durch Konkurrenz erfolgen. Neben der direkten Wirkung können verschiedene Bakterien und Pilze systemische Resistenzen in ihrer Wirtspflanze induzieren, die zu einer höheren Widerstandsfähigkeit gegenüber dem Pathogen führen. Der Einsatz von Mikroorganismen wird in den letzten Jahren auch im Forstbereich immer mehr als erfolgversprechende Möglichkeit zur Bekämpfung von Schaderngern gesehen. Einzelisolate oder Isolate-Konsortien konnten schon vielfach erfolgreich eingesetzt werden [12]. Beim Eschentriebsterben stellen die Blätter und Petiolen den primären Infektionsort des Erregers dar. Deshalb ist davon auszugehen, dass *H. fraxineus* schon bei der Infektion und auch später auf seinem Weg ins Xylem mit endo- und epiphytischen Mikroorganismen, die in diesen Pflanzenteilen leben, in Konkurrenz tritt, von ihnen beeinflusst und gegebenenfalls auch gehemmt wird [11].

Ziel unserer Arbeiten ist die Entwicklung eines biologischen Kontrollsystems zur Bekämpfung des Eschentriebsterbens auf der Grundlage antagonistischer Mikroorganismen. Basierend auf der vergleichenden Analyse der Blatt-Mikrobiome von Eschen unterschiedlicher Resistenz und eines

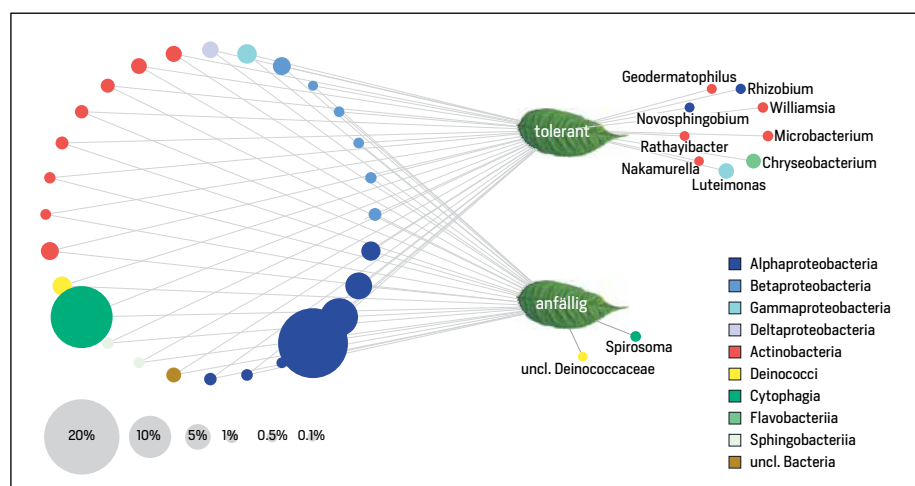


Abb. 2: Netzwerk-Analyse des bakteriellen Kernmikrobioms von Blättern toleranter und anfälliger Eschen auf Gattungsebene. Die Kernmikrobiome beinhalten Taxa, die in 75 % der Wiederholungen vorkommen und mindestens 0,1 % der Gesamtgemeinschaft ausmachen. Die Größe der Kreise korreliert mit der relativen Abundanz, bezogen auf die Gesamtzahl der Sequenzen. Die Farbe der Kreise gibt die Zuordnung der Gattungen zu den entsprechenden Bakterienklassen an [13].

ausgedehnten Antagonisten-Screenings sollen potenziell antagonistisch wirksame Isolate ermittelt werden. Ausgewählte Bakterien- und Pilzisolat bzw. Konsortien werden zur Bekämpfung des Schaderregers *H. fraxineus* im Freiland an Eschensämlingen getestet und sollen nachfolgend für die Etablierung eines biologischen Kontrollsystems genutzt werden. Das Projekt (22006116) wird gefördert durch die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR).

Versuchsansatz

Als Probenahmestandorte wurden in Kooperation mit der Landesforst Mecklenburg-Vorpommern vier Forstreviere mit hohem *H. fraxineus*-Befallsdruck ausgewählt. Pro Standort wurden im Juli 2017 repräsentative Blattproben von vier benachbarten Baumpaaren, bestehend aus einem anfälligen und einem weitgehend symptomfreien (toleranten) Baum, beprobt (Abb. 1). Die Untersuchung der bakteriellen und pilzlichen Gemeinschaften der 32 Mischproben erfolgte durch Kombination einer kulturunabhängigen DNA-basierten Analyse (Amplikon-Sequenzierung von Markergenen) und Kultivierungsmethoden. Durch den Vergleich der Mikrobiome toleranter und anfälliger Bäume wurden Mikroorganismengruppen ermittelt, die für tolerante Bäume spezifisch sind. Ergänzend erfolgte die Selektion antagonistisch wirksamer Pilze und Bakterien durch *in vitro* Ko-Kultivierung mit dem

Pathogen *H. fraxineus*. Die Eignung der Antagonisten zur biologischen Kontrolle des Eschentriebsterbens wird über zwei Jahre in Inokulationsversuchen an Eschensämlingen im Freiland untersucht. Dazu werden die Mikroorganismen einzeln oder in Konsortien über Sprossinokulation appliziert, die Infektion mit *H. fraxineus* erfolgt durch Einbringung infizierter Eschen-Petiolen.

Vergleich der bakteriellen Mikrobiome resistenter und anfälliger Eschengenotypen

Bei der Suche nach Mikroorganismen, die mit der Abwehr von Pathogenen im Zusammenhang stehen, gewinnt bei Pflanzen, ähnlich wie in der Medizin, der Vergleich der Kernmikrobiome gesunder und kranker Individuen immer mehr an Bedeutung [4]. Unsere Ergebnisse zeigten im bakteriellen Kernmikrobiom der toleranten Eschen eine höhere Anzahl Taxa als bei den anfälligen (37 vs. 30). Neun Gattungen waren spezifisch für tolerante Pflanzen, darunter mit relativ hohen Anteilen *Luteimonas* und *Chryseobacterium*, aber auch Vertreter der Actinobacteria und α -Proteobacteria (Abb. 2). Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen beschrieben M. Köberl et al. [4] die Gattung *Luteimonas* als Teil des Kernmikrobioms gesunder Bananenpflanzen in *Fusarium*-infizierten Gebieten Zentralamerikas, sodass auch bei der Esche ein Zusammenhang mit der

Quelle: Thünen-Institut



Relativer Anteil an der Bakteriengemeinschaft

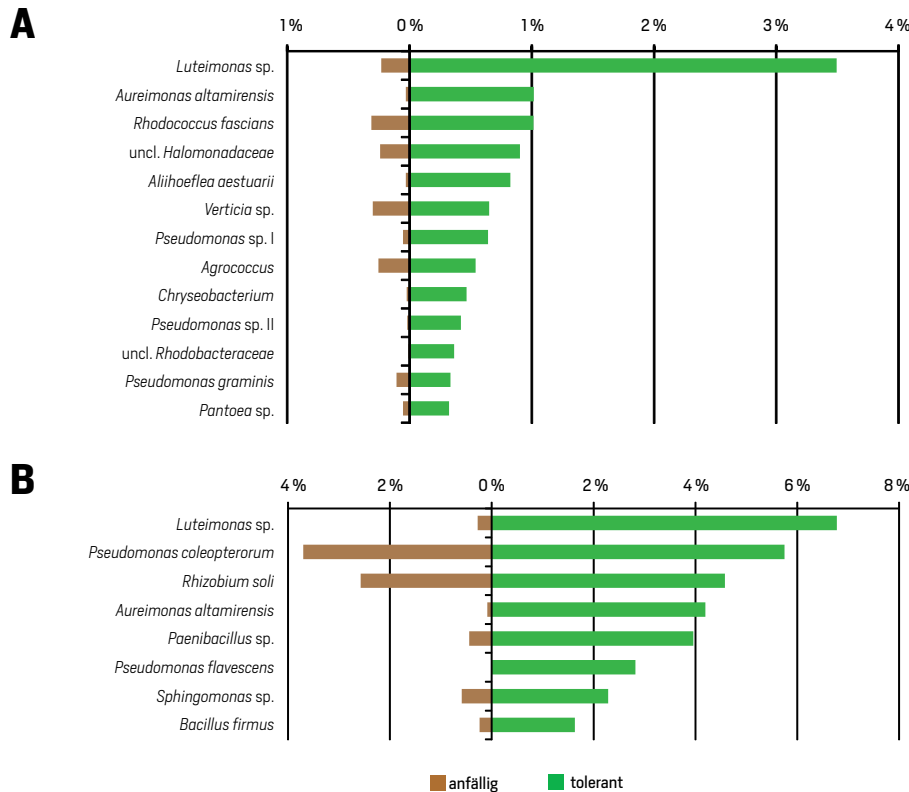


Abb. 3: Signifikant erhöhte Bakteriengruppen in den Blättern toleranter Eschen über **(A)** kulturunabhängige Analyse (Amplikon-Sequenzierung der 16S rRNA) und **(B)** Kultivierung von Bakterien-Isolaten. Die Gruppen sind nach ihrer Abundanz sortiert.

Pathogenabwehr möglich ist. Isolate der Gattung *Chryseobacterium* sind aus der Literatur als Antagonisten gegen verschiedene phytopathogene Pilze bekannt [9]. Actinobakterien haben generell eine große Bedeutung bei der Abwehr von Schadpilzen, vor allem für Vertreter der Gattung *Microbacterium* konnte eine effektive Wirkung gegen Pilze wie *Rhizoctonia solani* oder *Fusarium verticillioides* nachgewiesen werden [1, 8].

Beim Vergleich der relativen Anteile der Bakteriengruppen am Gesamt-mikrobiom war sowohl bei der Amplikon-Sequenzierung (15-fach, Abb. 3A) als auch bei der Kultivierung (24-fach, Abb. 3B) eine *Luteimonas*-Gruppe in toleranter Eschen besonders auffällig erhöht. Ähnlich konnte auch für die Gattung *Aureimonas* eine für tolerante Eschen spezifische Gruppe nachgewiesen werden (34- bzw. 49-fache Erhöhung). Auch für andere Gattungen wie *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* und *Sphingomonas* wurden, wenn auch weniger ausgeprägt, spezifische Gruppen gefunden (Abb. 3). Insgesamt

konnte so eine Reihe von Bakteriengruppen identifiziert werden, die potenziell mit der Abwehr des Erregers des Eschentriebsterbens in Verbindung stehen können [13]. Isolate der in dieser Studie gefundenen Gattungen sind auch aus anderen Wirt-Pathogen-Systemen als Antagonisten gegen pilzliche Pathogene bekannt, die antifungale Metabolite und lytische Enzyme zur Zerstörung pilzlicher Zellwände produzieren oder Resistenzmechanismen in der Pflanze induzieren. Einige *Pseudomonas*-Arten können die Ausbreitung von Pathogenen auch durch Hemmung der Sporenkeimung verhindern [12].

Vergleich der pilzlichen Mikrobiome

Die Untersuchung der pilzlichen Gemeinschaften über die kulturunabhängige Analyse ergab einen signifikant höheren Anteil des Hefepilzes *Papiliotrema flavescens* in toleranter Eschen. Pilze dieser Art bilden nicht nur über Konkurrenzwirkung durch starke saprophytische Kolonisierung

der Pflanzenoberfläche einen natürlichen Schutz gegen Pathogene, sondern besitzen auch antagonistische Fähigkeiten gegenüber verschiedenen phytopathogenen Pilzen [5]. Neben *P. flavescens* konnten auch für andere Arten wie *Microstroma* sp., *Sphaceloma* sp. und *Neosetophoma* sp. Gruppen nachgewiesen werden, die spezifisch für tolerante Bäume waren.

Für *Sarocladium strictum* wurde in den widerstandsfähigen Bäumen besonders bei den Pilzisolaten (über Kultivierung) eine signifikante Erhöhung (24-fach) festgestellt. Aus der Literatur sind Vertreter der Gattung *Sarocladium* als Mycoparasiten bzw. potenzielle Antagonisten gegen verschiedene pathogene Pilze bekannt [3].

Screening der Bakterien- und Pilzisolat auf ihre potenzielle antagonistische Wirkung

Bei einem ersten Screening gegen *H. fraxineus* zeigten 1/10 der getesteten Bakterien-Isolate eine deutliche Hemmung des Pilzes von über 30 %. Im statistischen Test mit zwei *H. fraxineus*-Isolaten konnte aber nur für 8 % dieser Isolate, darunter *Bacillus*, *Pantoea* und *Pseudomonas*, das antagonistische Potenzial bestätigt werden. Die stärkste Hemmung von über 50 % wurde für ein *Bacillus velezensis*-Isolat gemessen (Abb. 4). Das Bakterium produziert antifungale Metabolite und wurde schon als Antagonist gegen andere phytopathogene Pilze beschrieben. Bei Tomaten zeigte sich nach Beimpfung mit einem *B. velezensis*-Stamm eine Verschiebung in der Zusammensetzung des Mikrobioms, die zu einer geringeren Anfälligkeit gegenüber *Ralstonia solanacearum* führte [2]. Für Isolate der Gattungen *Luteimonas* und *Aureimonas* konnte in unseren Untersuchungen keine direkte antagonistische Wirkung bei der Ko-Kultivierung nachgewiesen werden.

Bei den filamentösen Pilzen wiesen 11 % eine eindeutige Hemmwirkung nach der Ko-Kultivierung auf, bei den Hefen lag der Anteil positiv getesteter Isolate bei 20 %. Im statistischen Test bestätigten v. a. Vertreter der Gattungen *Cladosporium*, *Botryodiplodia* und *Diaporthe* und die Hefen *Aureobasidium pullulans* und *Papiliotrema flavescens* ihr antagonistisches Potenzial.

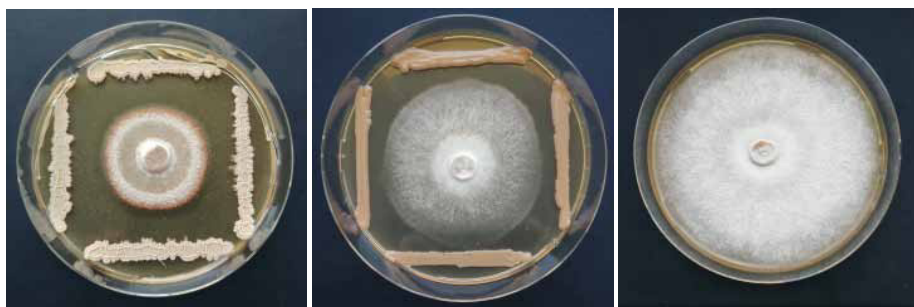


Abb. 4: Wachstumsinhibierung von *H. fraxineus* durch *Bacillus velezensis* A4P130 (links) bzw. *Papiliotrema flavescens* A3P071 (Mitte) im Vergleich zur Kontrolle (rechts) nach 14 Tagen Ko-Kultivierung

Fotos: Thünen-Institut

Erste Untersuchungen zur Wirkung der antagonistischen Isolate an Eschensämlingen

Für die ersten Inokulationstests wurden 20 aussichtsreiche Bakterien-Isolate ausgewählt, die entweder eine deutliche Hemmwirkung bei der Ko-Kultivierung gezeigt hatten oder als spezifische Taxa in den Blättern toleranter Eschen vorkamen. Vier Isolate

erwiesen sich als signifikant befalls-mindernd im Vergleich zur Kontrolle. Dabei handelte es sich um antagonistische Isolate der Arten *Bacillus velezensis* (A4P130, Abb. 5 links) und *Paenibacillus lautus* sowie um Vertreter der für tolerante Eschen spezifischen Gruppen *Luteimonas aestuarii* und *Aureimonas altamirensis* (B3P038, Abb. 5 Mitte). Die Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von B. Mitter et al. [8] überein,



Abb. 5: Signifikant verminderter *H. fraxineus*-Befall von Eschensämlingen nach Inokulation mit *Bacillus velezensis* A4P130 (links) und *Aureimonas altamirensis* B3P038 (Mitte) im Vergleich zur Kontrolle (rechts) 11 Wochen nach Infektion mit dem Pathogen

Fotos: Thünen-Institut

die bereits gezeigt haben, dass nicht nur Antagonisten, die direkt mit dem Pathogen agieren, als Kandidaten für die biologische Kontrolle von Bedeutung sind. Auch Isolate, die selbst keine antagonistische Wirkung zeigen wie *Luteimonas* und *Aureimonas*, können Resistenzen induzieren oder Änderungen im Pflanzenmikrobiom auslösen, die zu einer höheren Resistenz führen.

Folgerungen

Der Vergleich der Mikrobiome der Blätter unterschiedlich resistenter Eschen ergab eine Reihe von Bakterien- und Pilzgruppen, die für tolerante Eschen spezifisch sind und potenziell mit der Abwehr von *H. fraxineus* in Verbindung stehen können. Zusätzlich konnten durch Ko-Kultivierung mit dem Pathogen Isolate selektiert werden, die ein starkes antagonistisches Potenzial gegen den Erreger des Eschentriebsterbens aufweisen. Erste Inokulationsversuche waren erfolgversprechend. Um die Eignung der selektierten Mikroorganismen zur biologischen Kontrolle des Eschentriebsterbens zu testen, sind *in planta* Untersuchungen an verschiedenen Eschenklonen über mehrere Vegetationsperioden geplant. In der nachfolgenden Anwendung sollen effektive Isolate und Konsortien als mikrobielle Präparate in Samenplantagen eingesetzt werden.

Literaturhinweise:

[1] BARNETT, S. J. et al. (2006): Suppression of *Rhizoctonia solani* AG-8 induced disease on wheat by the interaction between *Pantoea*, *Exiguobacterium*, and *Microbacteria*. *Aust. J. Soil Res.* 44:331-342. [2] ELSAYED, T. R. et al. (2020): Biocontrol of bacterial wilt disease through complex interaction between tomato plant, antagonists, the indigenous rhizosphere microbiota, and *Ralstonia solanacearum*. *Front. Microbiol.* 10: DOI: 10.3389/fmicb.2019.02835. [3] GUIMARÃES, R. A. et al. (2017): Characterization of *Sarocladium oryzae* and its reduction potential of rice leaf blast. *Pesq. Agropec. Trop. Goiânia* 47: 41-52. [4] KÖBERL, M. et al. (2017): Members of Gammaproteobacteria as indicator species of healthy banana plants on *Fusarium* wilt-infested fields in Central America. *Sci. Rep.* 7:45318. [5] LIU, J.; SUI, Y.; WISNIEWSKI, M. (2013): Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Int. J. Food Microbiol.* 167:153-160. [6] METZLER, B. et al. (2013): Handlungsempfehlungen beim Eschentriebsterben. *AFZ-DerWald*, Heft 5: 17-20. [7] MITTER, B. et al. (2017): A new approach to modify plant microbiomes and traits by introducing beneficial bacteria at flowering into progeny seeds. *Front. Microbiol.* 8. [8] PEREIRA, P.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. (2007): Effects of biocontrol agents on *Fusarium verticillioides* count and fumonisin content in the maize agroecosystem: Impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. *Biol. Control* 42: 281-287. [9] SANG, M. K. et al. (2018): Growth promotion and root colonisation in pepper plants by phosphate-solubilising *Chryseobacterium* sp. strain ISE14 that suppresses *Phytophthora* blight. *Ann. Appl. Biol.* 172: 208-223. [10] SCHLECHTER, R. O.; MIEBACH, M.; REMUS-EMSERMANN, M. N. P. (2019): Driving factors of epiphytic bacterial communities: A review. *J. Adv. Res.* 19: 57-65. [11] SCHLEGEL, M.; QUELOZ, V.; SIEBER, T. N. (2018): The endophytic mycobiome of European ash and sycamore maple leaves – geographic patterns, host specificity and influence of ash dieback. *Front. Microbiol.* 9:2345. [12] TERHONEN, E. et al. (2018): Biocontrol Potential of Forest Tree Endophytes, 283-318. In: Pirttilä, A. M.; Frank, A. C. (ed.), *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications* doi:10.1007/978-3-319-89833-9_13. Springer Internat. Publishing, Cham. [13] ULRICH, K.; BECKER, R.; BEHRENDT, U. et al. (submitted): A comparative analysis of ash leaf-colonising bacterial communities identifies putative antagonists of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Front. Microbiol.*



Dr. Kristina Ulrich

k.ulrich@thuenen.de,

ist wissenschaftliche Mitarbeiterin am Johann Heinrich von Thünen-Institut für Forstgenetik.

Dr. Regina Becker, Dr. Undine Behrendt, Dr. Andreas Ulrich sind tätig am Leibniz-Zentrum für Agrarlandschaftsforschung (ZALF) e. V. Müncheberg, AG Mikrobielle Bio-geochemie, Prof. Michael Kube ist tätig an der Universität Hohenheim, Fakultät Agrarwissenschaften, Fachgebiet Integrative Infektionsbiologie Nutzpflanze – Nutztier.