

SLAATS, B.E. <sup>1)</sup>; PATEL, A. <sup>2)</sup>; VORLOP, K.-D. <sup>2)</sup>; BEITZEN-HEINEKE, W. <sup>3)</sup>; HALLMANN, J. <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde, Topphaideweg 88, 48161 Münster; <sup>2)</sup> Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Institut für Technologie und Biosystemtechnik, Bundesallee 50, 38116 Braunschweig; <sup>3)</sup> BIO CARE GmbH, Dorfstr. 4, 37574 Einbeck; e-mail: b.slaats@bba.de

## Wirksamkeit von verkapseltem *Hirsutella rhossiliensis* gegen *Heterodera schachtii* an Zuckerrüben

Efficacy of encapsulated *Hirsutella rhossiliensis* to control the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*

### Einleitung

Der Rübenzystennematode *Heterodera schachtii* SCHMIDT 1871 ist ein bedeutender Schaderreger der Zuckerrübe. Die jährlichen Ertragsverluste werden auf 90 Millionen Euro allein in Europa geschätzt (MÜLLER, 1999). Der Einsatz von Nematiziden zur Bekämpfung des Rübenzystennematoden ist in Deutschland nicht zugelassen. Durch weite Fruchtfolgen, den Anbau resistenter Sorten und resistenter Zwischenfrüchte ist eine Reduzierung der Populationsdichte von *H. schachtii* unter die wirtschaftliche Schadschwelle möglich. Eine weite Fruchtfolge wird allerdings von Landwirten aus ökonomischen Aspekten nicht immer durchgeführt. Beim Anbau resistenter Zwischenfrüchte, wie Ölrettich oder Senf, muss die Aussaat für eine gute Wirkung gegen *H. schachtii* vor Mitte August erfolgt sein. Gerade bei spät räumenden Getreidekulturen (z. B. Winterweizen) ist dies nicht in jedem Jahr gewährleistet. Beim Anbau resistenter Sorten ist zu beachten, dass sie zu einer Selektion resistenzbrechender Pathotypen von *H. schachtii* führen können. Untersuchungen von MÜLLER (1992) haben gezeigt, dass virulente Nematoden in geringer Anzahl natürlicherweise im Feld auftreten und diese sich innerhalb von drei Zuckerrübenkulturen derart stark vermehren können, dass Schäden an resistenten Sorten auftreten können (MÜLLER, pers. Mitteilung). Um eine Brechung der Resistenz zu verhindern bzw. zu verzögern, sollte der Anbau resistenter Zuckerrübensorten nur im Wechsel mit nicht resistenten Sorten erfolgen. Eine weitere Möglichkeit für die Bekämpfung von *H. schachtii* könnte der Einsatz von natürlichen Gegenspielern (= Antagonisten) des Nematoden sein. Natürlicherweise im Boden auftretende Antagonisten können beachtliche Bedeutung erlangen. Untersuchungen an *H. schachtii* haben gezeigt, dass ein natürliches Auftreten des nematophagen Pilzes *Hirsutella rhossiliensis* z. B. den Nematodenbefall in Kohl bis zu 77% reduziert (JAFFEE und MULDOON, 1989). Biologische Pflanzenschutzmittel basierend auf antagonistischen Pilzen werden bereits in einigen Ländern zur Bekämpfung bestimmter pflanzenparasitärer Nematoden eingesetzt (z. B. Bioact® gegen *Meloidogyne spp.* an Tomate). Für die Bekämpfung des Rübenzystennematoden an Zuckerrüben gibt es bisher kein biologisches Pflanzenschutzmittel. Ein möglicher Kandidat für ein solches Bekämpfungsverfahren könnte der nematophage Pilz *Hirsutella rhossiliensis* sein.

*H. rhossiliensis* MINTER und BRADY, 1980 kommt natürlicherweise in landwirtschaftlichen Böden vor. Er parasitiert verschiedene Arten pflanzenparasitärer Nematoden (STURHAN und SCHNEIDER, 1980; JAFFEE und MULDOON 1989; JAFFEE et al., 1989; JAFFEE et al., 1991). Die klebrigen Konidien von *H. rhossiliensis* haften an der Kutikula des Nematoden. Innerhalb von zwölf Stunden wird ein Keimschlauch gebildet, der die Kutikula des Nematoden durchdringt. Im Wirtskörper entsteht ein Infektionsbulbus, aus dem Assimilationshyphen wachsen und den Nematodenkörper durchziehen. Mit fortschreitendem Myzelwachstum stirbt der Nematode ab. Neu gebildete Hyphen wachsen aus dem Nematodenkörper und bilden ein Luftmyzel mit Phialiden, an denen erneut Sporen gebildet werden (STURHAN und SCHNEIDER, 1980; JAFFEE, 1992). Sowohl im Gewächshaus als auch im Freiland kann *H. rhossiliensis* zu hohen Mortalitätsraten bei pflanzenparasitären Nematoden führen (JAFFEE et al., 1989; JAFFEE und MULDOON, 1989). Grundsätzlich fördert eine hohe Besatzdichte von Nematoden das Auftreten des Pilzes im Boden (CHEN und REESE, 1999; VIANNE und ABAWI, 2000; JAFFEE et al., 1989). In der Praxis steigt die Parasitierungsrate allerdings mit zunehmender Nematodendichte nur langsam an und bleibt in der Regel hinter der Nematodenvermehrung zurück (JAFFEE et al., 1992; UNDERWOOD et al., 1994). Gerade im empfindlichen Jugendstadium der Kulturpflanzen ist die Sporendichte von *H. rhossiliensis* im Boden häufig zu gering für einen ausreichenden Schutz der Keimlinge vor Nematodenbefall (GRIFFIN, 1981). Eine Erhöhung der Sporendichte im Boden wäre durch künstliche Applikation des Pilzes möglich. Voraussetzung hierfür ist eine entsprechende Formulierung, die eine gute Etablierung von *H. rhossiliensis* im Boden ermöglicht und eine sichere Handhabung des Produktes gewährleistet. Da vom pilzlichen Myzel abge-

trennte Sporen nicht mehr infektiös sind, wurde im vorliegenden Forschungsvorhaben pilzliches Myzel formuliert. Um das Pilzwachstum zu fördern und den Pilz gegenüber anderen Mikroorganismen konkurrenzfähiger zu machen, wurden zusätzlich Nährstoffe der Formulierung beigefügt (PATEL, 1998, PATEL et al., 2002). Die Formulierung selbst sollte möglichst aus Materialien auf Basis nachwachsender Rohstoffe bestehen. Ziel des Forschungsvorhabens war es, die Wirksamkeit verschiedener feuchter und getrockneter Formulierungen von *H. rhossiliensis* gegen *H. schachtii* an Zuckerrüben zu untersuchen. Anhand der Ergebnisse sollte geprüft werden, inwieweit dieses Verfahren als Grundlage für ein biologisches Pflanzenschutzmittel geeignet ist.

## Material und Methoden

**Vermehrung und Verkapselung von *Hirsutella rhossiliensis*:** Die Untersuchungen wurden mit dem BBA-Isolat des Pilzes *Hirsutella rhossiliensis* durchgeführt, das ursprünglich 1985 am Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Münster aus Larven von *H. schachtii* isoliert wurde. Die Nematoden stammten aus Mikroplots, in denen Zuckerrüben angebaut wurden. Die Stammkultur des Pilzes wurde auf Kartoffel-Glucose-Agar (Merck, Darmstadt) im Inkubator bei 23°C für 14 Tage angezogen. Die Anzucht und Bereitstellung ausreichender Mengen pilzlicher Biomasse und die Kapselherstellung erfolgte durch die Firma BIOCARE. Für die Herstellung von Pilzkapseln wurden, soweit nicht anders angegeben, 50 g Biofeuchtmasse in 5 kg Verkapselungslösung (= 1% Pilzgehalt), bestehend aus verschiedenen hydrogelbildenden Biopolymeren (Guargum MF, Guargum MG, Pektin PA5, Alginat) und jeweils 3% autoklavierter Bäckerhefe als Nährstoffzusatz, gemischt. Die Suspension wurde in eine 2%ige CaCl<sub>2</sub>-Lösung getropft. Durch ionotrope Gelbildung bildeten die Tropfen innerhalb von 20 Minuten feste Kugeln (PATEL et al., 2004). Nach der Formulierung wurden die Kapseln auf mögliche Kontaminationen untersucht (Vitalitätstest). Hierzu wurden jeweils 30 Pilzkapseln auf feuchtem, autoklaviertem Filterpapier, auf Kartoffel-Glucose-Agar und auf Wasseragar ausgelegt.

**Larveninokulum:** Die Vermehrung des Rübenzystennematoden *H. schachtii* erfolgte an Ölrettich 'Siletina' im Gewächshaus bei 18-23°C. Als Anzuchtsubstrat für Ölrettich diente Löß. Nach acht Wochen war ein Generationszyklus von *H. schachtii* abgeschlossen und die neu gebildeten Zysten wurden extrahiert. Der Spross des Ölrettichs wurde entfernt und das Anzuchtsubstrat mit den Zysten über ein Sieb mit einer Maschenweite von 8 mm gegeben. Die auf dem Sieb verbliebenen Wurzelreste wurden verworfen und das gesiebte Substrat mit den Zysten als Vermehrungserde in Plastiktüten gefüllt und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Gewinnung von Larveninokulum wurde die Vermehrungserde mittels Leitungswasser durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 250 µm gespült. Der Löß wurde aufgrund seiner Körnungsgröße < 200 µm durch das Sieb gespült, die Zysten verblieben auf dem Sieb. Zur Gewinnung frisch geschlüpfter Larven wurden die extrahierten Zysten auf einen Baermann-Trichter gegeben und die Trichter bei Zimmertemperatur aufgestellt. Die geschlüpften Larven wurden abgezapft und bei 4°C bis zu einer Woche aufbewahrt.

**Versuchssubstrat:** Als Versuchssubstrat für alle Versuche diente eine sandige Felderde vom Versuchsfeld des Instituts für Nematologie und Wirbeltierkunde in Münster. Die Felderde hatte einen pH-Wert von 6,2 und einem Humusgehalt von 1,1%. Die Erde war frei von *H. schachtii*. Vor Versuchsbeginn wurde die Felderde auf 7 mm abgeseibt. Bei Verwendung gedämpfter Erde wurde diese einen Tag vor Versuchsbeginn für vier Stunden bei 180°C in einem Trockenschrank erhitzt.

**Statistik:** Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 11.01 (Superior Performing Software Systems) für Windows durchgeführt. Die Daten wurden mittels Varianzanalyse mit anschließendem Mittelwertvergleich mit dem Tukey-Test (p<0,05) ausgewertet.

### 1) Faltschachtelversuche

Es wurden verschiedene Biopolymere ausgewählt und als Kapselmaterial für die Formulierung des Pilzes *H. rhossiliensis* untersucht: Guargum MG, Guargum MF und Alginat. Alginat wurde als Standardkapselmaterial gewählt, da hierzu bereits Kenntnisse vorlagen (LACKEY et al., 1993; PATEL, 1998). Die Herstellung der Kapselformulierungen aus den Biopolymeren erfolgte durch die Firma BIOCARE GmbH. Folgende Varianten wurden untersucht:

1. Unbehandelte Kontrolle (KON)
2. Autoklavierte Bäckerhefe (BH)
3. Biofeuchtmasse (BFM)
4. Pilzfreie Alginatkapseln (ALG)
5. Pilzfreie Guar gum MG-Kapseln (MG)
6. Pilzfreie Guar gum MF-Kapseln (MF)
7. Pilzfreie Alginatkapseln mit Bäckerhefe (ALG+BH)
8. Pilzfreie Guar gum MG-Kapseln mit Bäckerhefe (MG+BH)
9. Pilzfreie Guar gum MF-Kapseln mit Bäckerhefe (MF+BH)
10. Pilzhaltige Alginatkapseln mit Bäckerhefe (ALG+BH+H.r.)
11. Pilzhaltige Guar gum MG-Kapseln mit Bäckerhefe (MG+BH+H.r.)
12. Pilzhaltige Guar gum MF-Kapseln mit Bäckerhefe (MF+BH+H.r.)

In zwei Faltschachtelversuchen mit gedämpfter bzw. ungedämpfter Erde wurde die Wirkung feuchter Kapseln gegen *H. schachtii* an Zuckerrüben 'Penta' untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte in Anlehnung an GUTBERLET (2000). Jedes Versuchsglied bestand aus zehn Wiederholungen. Als Versuchsgefäße wurden transparente PVC-Faltschachteln (40 x 20 x 120 mm, Kelder Plastibox b. v., 's-Heerenberg, Niederlande) mit einem Volumen von ca. 100 ml verwendet. Pilzkapseln bzw. pilzfreie Kapseln wurden zu Versuchsbeginn dem Versuchssubstrat beigemischt (4 g/100 ml Erde). Bei der kapsellosen Variante "Biofeuchtmasse" wurde in Wasser suspendierte pilzliche Biofeuchtmasse (0,04 g Biofeuchtmasse in 4 ml Wasser pro 100 ml Erde) zugegeben. Die Pilzmenge entsprach dem Pilzgehalt der Kapseln. Vergleichbares galt für die Variante autoklavierte Bäckerhefe (0,28 g in 4 ml Wasser pro 100 ml Erde). Die Faltschachteln wurden im Gewächshaus bei einer durchschnittlichen Tages- und Nachttemperatur von 20°C ± 3°C aufgestellt und nach Bedarf gegossen. Sieben Tage nach Versuchsbeginn erfolgte die Aussaat der Zuckerrüben. Nach weiteren sieben Tagen wurden 1000 Infektionsjuvenile von *H. schachtii* in 2 ml Wasser an die Zuckerrübenkeimlinge inokuliert. Hierzu wurden rechts und links neben der Pflanze mit einem Holzstäbchen ein 1 cm tiefes Loch in das Substrat gestochen und die Larvensuspension darauf verteilt. Nach einer weiteren Woche wurde der Versuch ausgewertet und die Pflanzen aus den Faltschachteln entfernt. Der Spross der Keimlinge wurde abgetrennt und verworfen, die Wurzeln unter Leitungswasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Anfärbung der Larven in der Wurzel mit einer 0,01%igen Säurefuchsinlösung (BYRD et al., 1983) und die Auszählung der in die Wurzeln eingedrungenen Larven.

## 2) Gefäßversuche

In zwei Gefäßversuchen wurde die Wirksamkeit von getrockneten Pilzkapseln gegen *H. schachtii* untersucht. Im ersten Versuch wurden Kapseln aus den Biopolymeren Guar gum MF + Pektin PA5 eingesetzt, im zweiten Versuch Kapseln aus dem Biopolymer Guar gum MG. Den Guar gum MF-Kapseln wurde das Biopolymer Pektin PA5 zugegeben, um die Form zu stabilisieren und ein Verkleben der Kapseln bei der Trocknung zu vermeiden. Da sich in vorausgegangenen Laboruntersuchungen zeigte, dass ein Teil des Pilzes während des Trocknungsprozesses abstirbt, wurde in einem Teil der Kapseln der Pilzgehalt von 1% auf 10% erhöht.

Die Kapseln wurden unter der Sicherheitswerkbank über Nacht getrocknet. Die Restfeuchte der Kapseln betrug 7,5%. Die Kapselformulierungen mit einem Pilzgehalt von 1% und 10% wurden in 300 ml Töpfen auf ihre Wirksamkeit gegen *H. schachtii* an der Zuckerrübe 'Penta' untersucht. Die Pilzkapseln aus den Biopolymeren Guar gum MF+Pektin PA5 und Guar gum MG wurden in jeweils getrennten Versuchen untersucht. Jeder der beiden Versuche bestand aus folgenden Varianten:

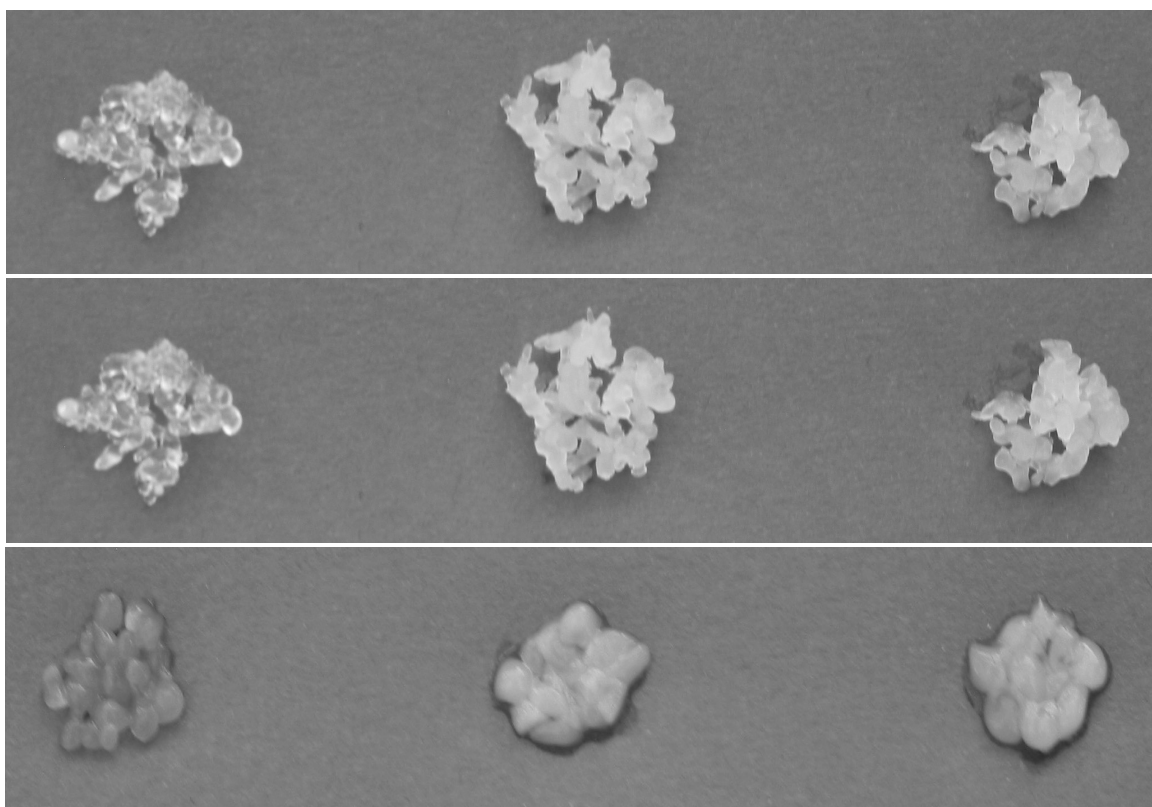
1. unbehandelte Kontrolle (KON)
2. Biofeuchtmasse (BFM)
3. 1%ige Pilzkapseln (MF+PA5 bzw. MG)
4. 10%ige Pilzkapseln (MF+PA5 bzw. MG)

Jedes Versuchsglied bestand aus zehn Wiederholungen. Zu Versuchsbeginn wurden die pilzliche Biofeuchtmasse (0,04 g Biomasse in 4 ml Wasser pro 100 ml Erde) bzw. die getrockneten Pilzkapseln (0,3 g/100 ml Erde) in das Versuchssubstrat eingemischt. Sieben Tage später erfolgte die Pflanzung drei Tage alter Zuckerrübenkeimlinge und die Inokulation mit 3.000 Infektionsjuvenilen von *H. schachtii* in 3,6 ml Wasser. Die Töpfe wurden im Gewächshaus aufgestellt und bei einer durchschnittlichen Tages- und Nachttemperatur von  $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  gehalten. Die Versuchsanlage war ein randomisierter Block. Die Pflanzen wurden nach Bedarf gegossen. Während der Versuchsdauer wurden die Pflanzen zweimal mit dem Flüssigdünger Wuxal Super® gedüngt. Nach Abschluss einer Nematodengeneration (8 Wochen) wurde der Versuch ausgewertet. Das Sprossfrischgewicht wurde ermittelt und die neu gebildeten Zysten mittels Zentrifugationsmethode nach CAVENESS und JENSEN (1955) aus der Erde extrahiert. Die Anzahl Zysten und der Zysteninhalt (Anzahl Eier und Larven pro 100 ml Erde) wurde ermittelt.

## Ergebnisse

### 1) Faltschachtelversuche

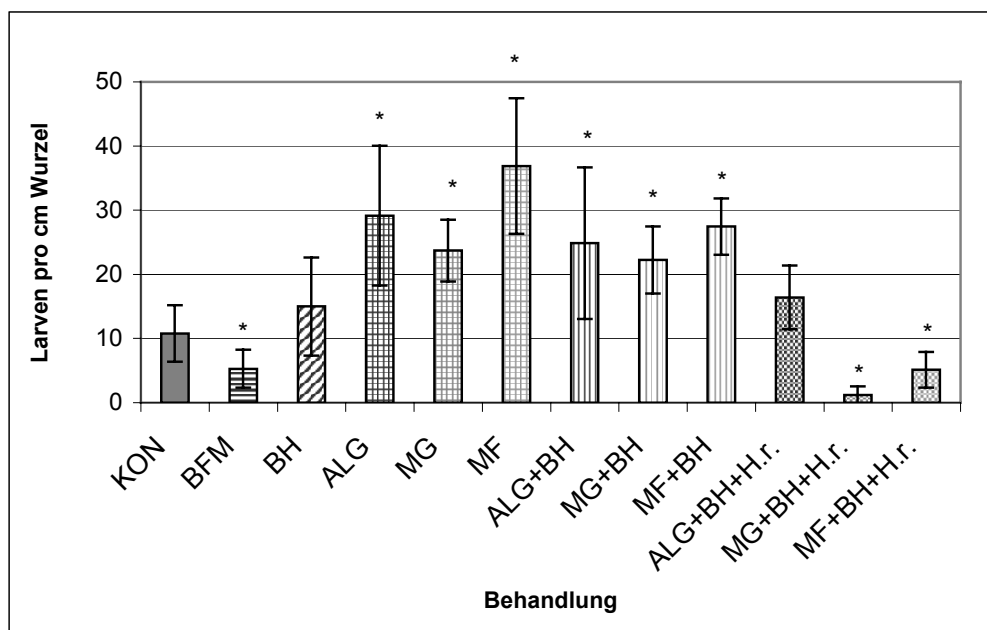
Kapselformulierung: Die Kapseln hatten je nach verwendetem Biopolymer einen Durchmesser von 1,16-2,36 mm. Bei Verwendung des Biopolymers Guargum MF war der Kapseldurchmesser allgemein höher, da die Kapseln linsenförmig flach waren (Abb. 1).



**Abb. 1** Feuchte Kapseln nach der Formulierung; von oben nach unten: Alginatkapseln, Guargum MG-Kapseln, Guargum MF-Kapseln; von links nach rechts: pilzfreie Kapseln, pilzfreie Kapseln mit 3% Bäckerhefe und pilzhaltige Kapseln mit 3% Bäckerhefe und 1% *Hirsutella rhossiliensis*

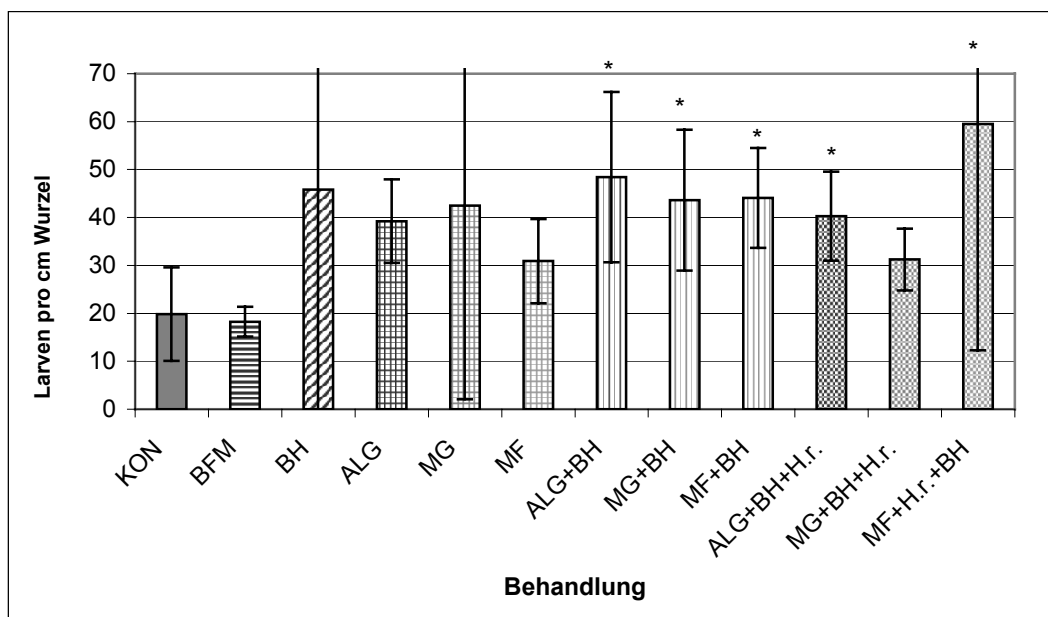
Vitalitätstest: Im Vitalitätstest wurde keine Kontamination der Pilzkapseln mit anderen Mikroorganismen festgestellt. *H. rhossiliensis* wuchs aus allen Pilzkapseltypen aus. Auswachsende Hyphen des Pilzes waren auf den Alginatpilzkapseln und den Guargum MG-Pilzkapseln nach zwei Tagen, auf den linsenförmigen Guargum MF-Pilzkapseln nach 4 Tagen sichtbar.

**Nematodenbefall:** Bei Einsatz feuchter Pilzkapseln in gedämpfter Erde war der Nematodenbefall bei Guargum MG-Pilzkapseln (MG+BH+H.r.) und Guargum MF-Pilzkapseln (MF+BH+H.r.) signifikant reduziert gegenüber der unbehandelten Kontrolle (KON) (Abb. 2). Die Befallsreduktion betrug 91% für Guargum MG-Pilzkapseln und 55% für Guargum MF-Pilzkapseln. Bei Applikation von *H. rhossiliensis* als Biofeuchtmasse (BFM) lag die Befallsreduktion mit 55% auf einem vergleichbaren Niveau wie für Guargum MF-Pilzkapseln. Demgegenüber zeigten Alginat-Pilzkapseln (ALG+BH+H.r.) keine Wirkung. Die Applikation pilzfreier Kapseltypen führte zu einer signifikanten Steigerung des Larvenbefalls in die Wurzel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (KON). Während der Versuchsdauer zeigte sich kein Einfluss der Kapseltypen auf die Keimung der Zuckerrüben und das Pflanzenwachstum.



**Abb. 2** Einfluss einer Bodenapplikation mit feuchten Kapseltypen in **gedämpfter Erde** auf die Anzahl eingedrungener Larven von *Heterodera schachtii* in Zuckerrübenwurzeln. KON = unbehandelte Kontrolle, BFM = Biofeuchtmasse: freier Pilz (*Hirsutella rhossiliensis*), BH = Bäckerhefe, ALG = Alginatkapseln, MG = Guargum MG-Kapseln, MF = Guargum MF-Kapseln, ALG+BH = Alginatkapseln mit Bäckerhefe, MG+BH = Guargum MG-Kapseln mit Bäckerhefe, MF+BH = Guargum MF-Kapseln mit Bäckerhefe, ALG+BH+H.r. = Alginatkapseln mit Bäckerhefe und *H. rhossiliensis*, MG+BH+H.r. = Guargum MG-Kapseln mit Bäckerhefe und *H. rhossiliensis*, MF+BH+H.r. = Guargum MF-Kapseln mit Bäckerhefe und *H. rhossiliensis*; Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 10, \* = signifikant verschieden von KON nach dem Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$

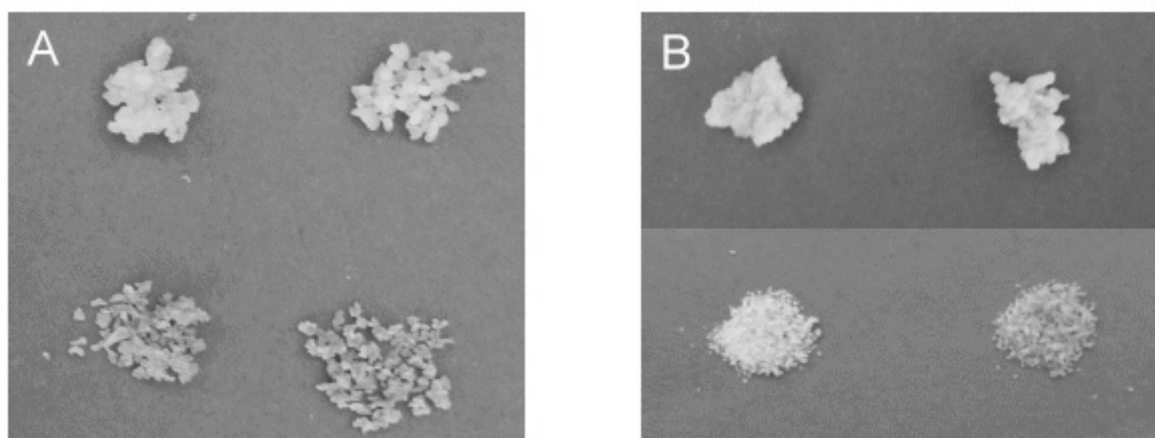
Wurden die feuchten Kapseln dagegen in ungedämpfter Erde eingesetzt, so bewirkte keine der Kapseltypen eine Reduktion von *H. schachtii* in den Zuckerrübenwurzeln. Vielmehr führte die Applikation von pilzfreien als auch pilzhaltigen Kapseltypen mit Ausnahme der Variante MG+BH+H.r. zu einer signifikanten Erhöhung des Nematodenbesatzes in der Wurzel (Abb. 3). Weder Keimung der Zuckerrüben noch das Pflanzenwachstum wurden durch die Applikation der feuchten Kapseln in ungedämpfter Erde gestört.



**Abb. 3** Einfluss einer Bodenapplikation mit feuchten Kapseltypen in **ungedämpfter Erde** auf die Anzahl eingedrungener Larven von *Heterodera schachtii* in Zuckerrübenwurzeln. KON = unbehandelte Kontrolle, BFM = Biofeuchtmasse: freier Pilz (*Hirsutella rhossiliensis*), BH = Bäckerhefe, ALG = Alginatkapseln, MG = Guar gum MG-Kapseln, MF = Guar gum MF-Kapseln, ALG+BH = Alginatkapseln mit Bäckerhefe, MG+BH = Guar gum MG-Kapseln mit Bäckerhefe, MF+BH = Guar gum MF-Kapseln mit Bäckerhefe, ALG+BH+H.r. = Alginatkapseln mit Bäckerhefe und *H. rhossiliensis*, MG+BH+H.r. = Guar gum MG-Kapseln mit Bäckerhefe und *H. rhossiliensis*, MF+BH+H.r. = Guar gum MF-Kapseln mit Bäckerhefe und *H. rhossiliensis*; Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 10, \* = signifikant verschieden von KON nach dem Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$

## 2) Gefäßversuche

Kapselformulierung: Eine Trocknung der Guar gum MF+PA5-Pilzkapseln war problemlos möglich. Der Durchmesser getrockneter Guar gum MF+PA5-Pilzkapseln betrug durchschnittlich 1,05 mm für Kapseln mit 1% *H. rhossiliensis* und 1,17 mm für Kapseln mit 10% *H. rhossiliensis* (Abb. 4). Die Trocknung von Guar gum MG-Pilzkapseln war schwieriger, da die Kapseln miteinander verklebten und nach der Trocknung in einem Porzellanmörser zerstoßen werden mussten. Der Durchmesser der Guar gum MG-Pilzkapseln mit 1% und 10% *H. rhossiliensis* betrug durchschnittlich 0,66 mm bzw. 0,77 mm.



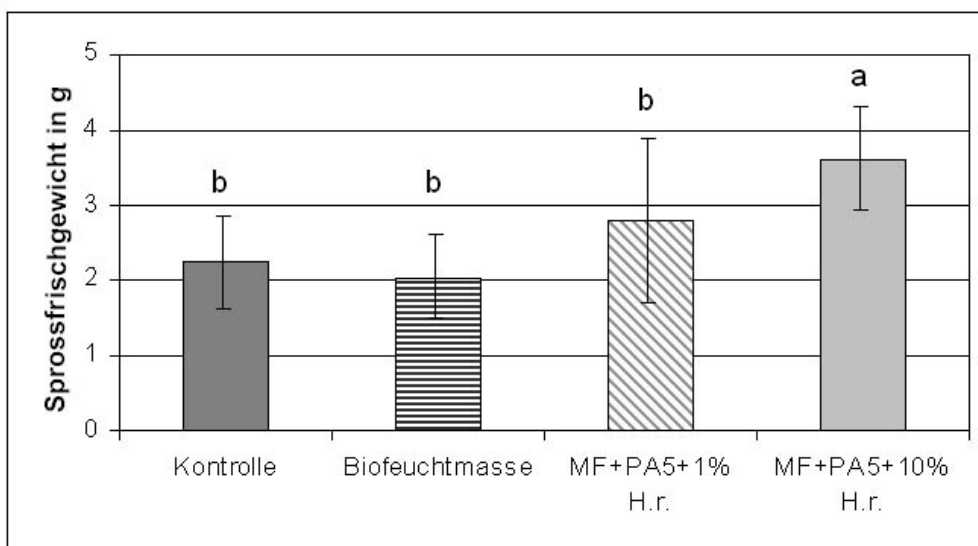
**Abb. 4** A) Guar gum MF+PA5-Pilzkapseln, von links nach rechts Kapseln mit 1% und 10% *Hirsutella rhossiliensis*; oben feucht, unten getrocknet; B) Guar gum MG-Pilzkapseln, von links nach rechts Kapseln mit 1% und 10% *H. rhossiliensis*; oben feucht, unten getrocknet

**Vitalitätstest:** Im Vitalitätstest wurde keine Kontamination der Pilzkapseln mit anderen Mikroorganismen festgestellt. Die Rückquellung der Kapseln war gewährleistet. Nach Auslegen auf feuchtem Filterpapier erreichten die Kapseln innerhalb von 24 Stunden bis zu zwei Drittel ihrer ursprünglichen Größe. Nach drei Tage war ein erstes Auswachsen von *H. rhossiliensis* mikroskopisch sichtbar. Bei Guargum MG-Pilzkapseln mit 1% *H. rhossiliensis* war das Auswachsen des Pilzes stark eingeschränkt und nach drei Tagen war *H. rhossiliensis* nur aus zwei von zehn Kapseln ausgewachsen.

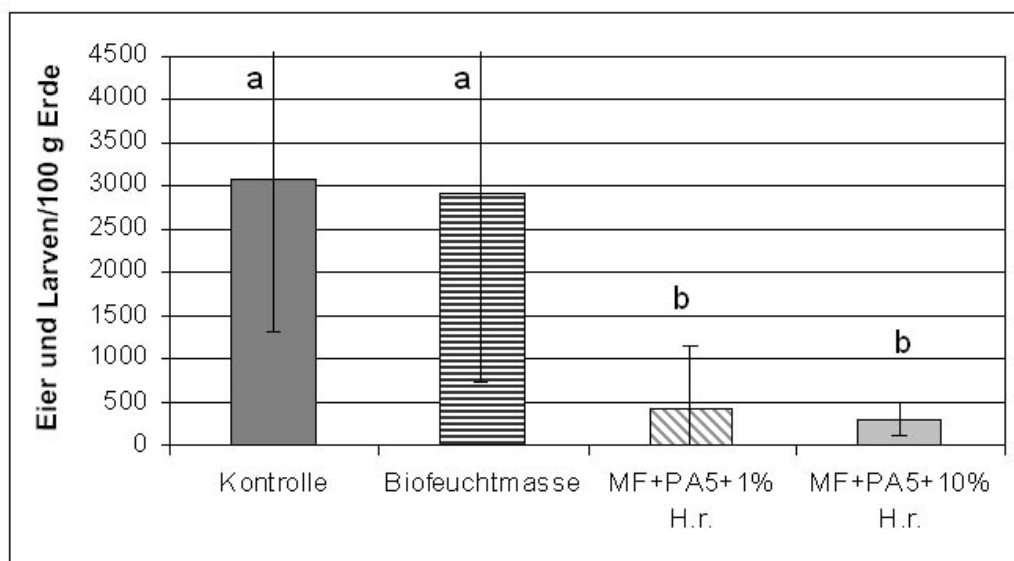
**Gefäßversuch A:** Einsatz getrockneter Guargum MF+PA5-Pilzkapseln mit 1% und 10% *H. rhossiliensis* in gedämpfter Erde

**Sprossfrischgewicht:** Die Applikation von getrockneten Guargum MF+PA5-Pilzkapseln mit 10% *H. rhossiliensis* bewirkte eine signifikante Steigerung des Sprossfrischgewichtes auf 3,63 g gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit 2,25 g (Abb. 5). Guargum MF+PA5-Pilzkapseln mit 1% *H. rhossiliensis* erhöhten tendenziell das Sprossfrischgewicht um durchschnittlich 24%. Die Biofeuchtmasse von *H. rhossiliensis* hatte keinen Einfluss auf das Sprossfrischgewicht der Zuckerrüben gegenüber der Kontrolle.

**Nematodenvermehrung:** Die Applikation von Guargum MF+PA5-Pilzkapseln führte zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl Eier und Larven von *H. schachtii* (Abb. 6). Die Befallsreduktion betrug 86% für Guargum MF+PA5-Pilzkapseln mit 1% *H. rhossiliensis* und 90% für Guargum MF+PA5-Pilzkapseln mit 10% *H. rhossiliensis*. Demgegenüber hatte die Applikation von *H. rhossiliensis* als Biofeuchtmasse keinen Einfluss auf die Nematodenvermehrung.



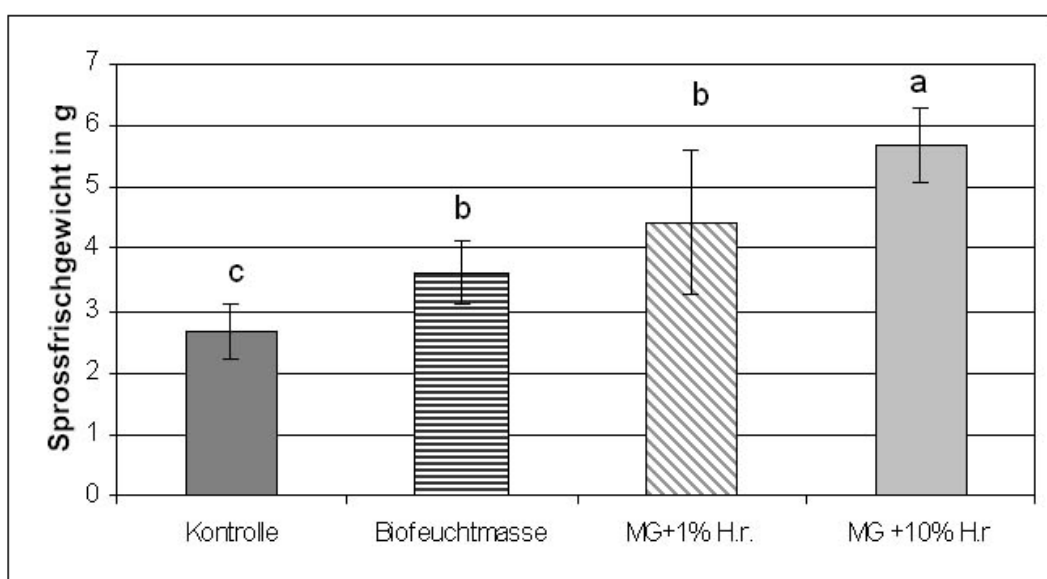
**Abb. 5** Durchschnittliches Sprossfrischgewicht von Zuckerrüben der Sorte 'Penta' acht Wochen nach Einarbeitung getrockneter MF+PA5-Pilzkapseln in gedämpfter Erde. H.r. = *Hirsutella rhossiliensis*; MF+PA5 = Guargum MF+PA5-Pilzkapseln, Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 10, Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden nach dem Tukey



**Abb. 6** Anzahl Eier und Larven pro 100 g Erde von *Heterodera schachtii* nach Einarbeitung getrockneter MF+PA5-Pilzkapseln in gedämpfter Erde. H.r. = *Hirsutella rhossiliensis*; MF+PA5 = Guargum MF+PA5-Pilzkapseln; Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 10$ , Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden nach dem Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$

**Gefäßversuch B:** Einsatz getrockneter Guargum MG-Pilzkapseln mit 1% und 10% *H. rhossiliensis* in gedämpfter Erde.

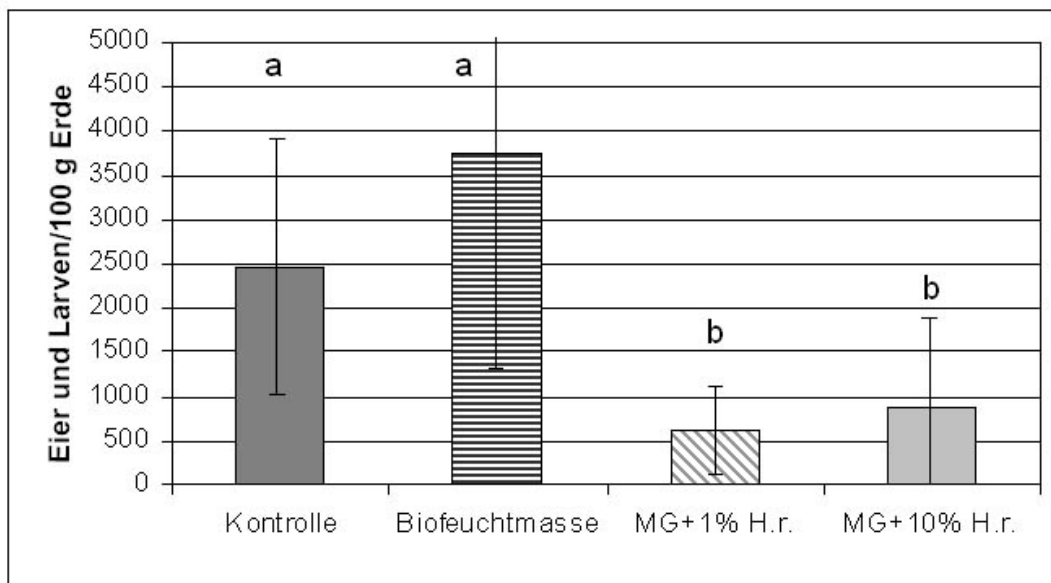
**Sprossfrischgewicht:** Sowohl die Applikation von Guargum MG-Pilzkapseln mit 1% und 10% *H. rhossiliensis* als auch von Biofeuchtmasse führte zu einer signifikanten Steigerung des Sprossfrischgewichtes im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 7). Das höchste Sprossfrischgewicht mit 5,7 g wurde nach Applikation von Guargum MG-Pilzkapseln mit 10% *H. rhossiliensis* beobachtet, gefolgt von Guargum MG-Pilzkapseln mit 1% *H. rhossiliensis* (4,4 g) und der pilzlichen Biofeuchtmasse (3,6 g).



**Abb. 7** Durchschnittliches Sprossfrischgewicht von Zuckerrüben der Sorte 'Penta' acht Wochen nach Einarbeitung getrockneter MG-Pilzkapseln in gedämpfter Erde. H.r. = *Hirsutella rhossiliensis*; MG = Guargum MG-Kapseln; Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 10$ , Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden nach dem Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$



**Nematodenvermehrung:** Eine Behandlung der gedämpften Erde mit getrockneten Guargum MG-Pilzkapseln mit 1% *H. rhossiliensis* sowie mit 10% *H. rhossiliensis* bewirkten eine signifikante Reduktion der Nematodenvermehrung von 75% bzw. 64% (Abb. 8). Die Applikation von *H. rhossiliensis* als Biofeuchtmasse hatte keine Wirkung gegen *H. schachtii* und führte tendenziell sogar zu einer Steigerung der Nematodenvermehrung (3736 E+L/100 ml Boden) gegenüber der Kontrolle (2460 E+L/100 ml Boden).



**Abb. 8** Anzahl Eier und Larven pro 100 g Erde von *Heterodera schachtii* nach Einarbeitung getrockneter MG-Pilzkapseln in gedämpfter Erde. H.r. = *Hirsutella rhossiliensis*; MG = Guargum MG-Kapseln; Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n = 10, Mittelwerte mit gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden nach dem Tukey HSD-Test bei  $p < 0,05$

## Diskussion

Der nematophage Pilz *Hirsutella rhossiliensis* ist ein weit verbreiteter Parasit pflanzenparasitärer Nematoden (JAFEE und MULDOON, 1989; JAFEE et al., 1989; STURHAN und SCHNEIDER, 1980). Seit seiner Entdeckung im Jahr 1980 (MINTER und BRADY, 1980) arbeiteten verschiedene Arbeitsgruppen daran, diesen Pilz zu einem biologischen Pflanzenschutzmittel zu entwickeln (JAFEE et al., 1996; VIAENE und ABAWI, 2000; LIU und CHEN, 2005). Eine Applikation des Pilzes als wässrige Myzelsuspension kann teilweise zu guten Bekämpfungserfolgen führen (LACKEY et al., 1992; LIU und CHEN, 2005), ist für die Praxis aber wenig geeignet. Voraussetzung für die Entwicklung eines biologischen Pflanzenschutzmittels ist eine geeignete Formulierung, die eine sichere Handhabung des Produktes gewährleistet und dem konkurrenzschwachen Pilz eine gute Etablierung im Boden sichert, so dass eine möglichst hohe Parasitierungsrate pflanzenparasitärer Nematoden erreicht wird. Die von verschiedenen Arbeitsgruppen favorisierten Alginatformulierungen erwiesen sich im Freiland als wenig wirkungsvoll (JAFEE et al., 1996; LACKEY et al., 1993; JAFEE und MULDOON, 1997). Demgegenüber waren erste Untersuchungen von PATEL (1998), GUTBERLET (2000) und ROSE (2000) mit Pilzkapseln auf Cellulosebasis recht vielversprechend. An diese Ergebnisse knüpften die hier dargestellten Versuche mit Guargum-Derivaten als Material für die Verkapselung von *H. rhossiliensis* an. Aufgrund der Erfahrungen aus der Vergangenheit wurden die neuartigen Formulierungen zuerst in gedämpfter Erde eingesetzt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten, dass eine Applikation von *H. rhossiliensis* in Kapseln aus verschiedenen Guargumderivaten einen Befall von Zuckerrüben mit *H. schachtii* in gedämpfter Erde bis zu 90% reduzieren kann. Im Faltschachtelversuch mit feuchten Kapseln aus Guargum MF und Guargum MG, die 1% *H. rhossiliensis* enthielten, war der Nematodenbefall signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert. Pilzkapseln aus Alginat zeigten in diesem Versuch keine Wirkung gegen *H. schachtii* und bestätigten damit die Ergebnisse von JAFEE et al. (1996) an Kohl. Das Kapselmateriale

allein sowie Kapseln ohne Pilz führten demgegenüber zu einer Förderung der Larveneindringung. Die Ursachen hierfür konnten nicht abschließend geklärt werden, doch ist auch aus anderen Untersuchungen bekannt, dass die Zufuhr von Formulierungshilfsstoffen, wie z. B. Alginat oder Körnerbrutpulver, den Nematodenbefall fördern kann (SCHUSTER und SIKORA, 1992; HALLMANN, 1994). Zu hohe Aufwandmengen der Formulierungshilfsstoffe können das Pflanzenwachstum und die Entwicklung von Nematoden aber auch hemmen (SCHUSTER und SIKORA, 1992). Eine Hemmung des Pflanzenwachstums wurde in den eigenen Untersuchungen jedoch nicht beobachtet, die Keimrate der Zuckerrüben lag in allen Gewächshausversuchen zudem über 80%. Untersuchungen von LACKEY et al. (1993) zeigten, dass niedrige Aufwandmengen pilzfreier Alginatkapseln keine Wirkung auf den Nematodenbefall bzw. das Pflanzenwachstum hatten und Alginatkapseln mit *H. rhossiliensis* das Pflanzenwachstum sogar leicht erhöhten.

Im nächsten Schritt wurden die Pilzkapseln getrocknet. Getrocknete Formulierungen werden aufgrund ihrer besseren Handhabbarkeit, Lagerfähigkeit und Applikation in der Praxis normalerweise bevorzugt. Sowohl getrocknete Guar gum MF+PA5-Pilzkapseln als auch getrocknete Guar gum MG-Pilzkapseln hatten eine positive Wirkung auf das Pflanzenwachstum. Die Förderung des Sprossfrischgewichtes war aber nicht in allen Fällen signifikant. Interessant war die Beobachtung, dass die Erhöhung des Pilzgehaltes in den Kapseln von 1% auf 10% in beiden Versuchen zu einer signifikanten Steigerung des Sprossfrischgewichtes führte, nicht aber zu einer weiteren Reduzierung des Nematodenbefalls. Da alle anderen Faktoren identisch waren, könnte dies möglicherweise ein Hinweis dafür sein, dass die zusätzliche pilzliche Biofeuchtmasse entweder das Pflanzenwachstum direkt stimulierte oder aber indirekt durch Nährstofffreisetzung nach entsprechendem mikrobiellem Abbau des Pilzmyzels. Um diese Frage abschließend zu klären sind weitere Versuche erforderlich, in denen als zusätzliche Varianten zehnpromtente Biofeuchtmasse und pilzfreie Kapseln zu untersuchen sind. Neben der Förderung des Sprossfrischgewichtes führten die getrockneten Guar gum MF+PA5-Pilzkapseln bzw. Guar gum MG-Pilzkapseln auch zu einer signifikanten Reduktion des Nematodenbesatzes nach 8 Wochen von bis zu 90%. Die Reduktion des Nematodenbesatzes lag damit vergleichbar hoch wie bei Einsatz feuchter Kapseln nach 7 Tagen. Ein Mörsern der nach dem Trocknen verklebten MG-Pilzkapseln scheint die Wirkung nicht nachteilig beeinflusst zu haben. Die Kombination von Guar gum MF mit Pektin PA5 führte zu runden Kapseln, die auch nach der Trocknung nicht verklebten. Inwieweit mit der Zugabe von Pektin PA5 möglicherweise auch eine Wirkungssteigerung verbunden ist, bleibt abzuwarten, da entsprechende Versuche noch ausstehen. Auch über die maximale Lagerungsdauer getrockneter Pilzkapseln liegen noch keine abschließende Ergebnisse vor. Aus Untersuchungen mit getrockneten Alginatkapseln ist bekannt, dass *H. rhossiliensis* nach Lagerung über ein Jahr bei 5°C noch auswuchs und *H. schachtii* parasitierte (LACKEY et al., 1993).

Als Kostenfaktor bei der Entwicklung biologischer Pflanzenschutzmittel spielt auch die Wirkstoffkonzentration (= Pilzkonzentration) eine gewisse Rolle. Sie muss in jedem Falle hoch genug sein, um eine gute Parasitierung der Nematoden im Boden zu gewährleisten. Eine zu hohe Pilzkonzentration in der Kapsel könnte nicht nur unnötige Kosten bedeuten, sondern sich unter Umständen auch negativ auf die Wirksamkeit der Formulierung auswirken. In den eigenen Untersuchungen führte die zehnfache Erhöhung des Pilzgehaltes in den getrockneten Pilzkapseln zwar zu einer Steigerung des Sprossfrischgewichtes, nicht aber der Wirksamkeit gegen *H. schachtii*. Möglicherweise reichte die Nährstoffzugabe in Form von 3% Bäckerhefe für die zusätzliche pilzliche Biofeuchtmasse nicht aus und muss entsprechend angepasst werden. Sowohl bei der Nährstoffmenge, als auch der Nährstoffkomponenten besteht noch erheblicher Forschungsbedarf.

Zeigten die Formulierungen von *H. rhossiliensis* als feuchte wie auch getrocknete Kapseln eine gute Wirkung in gedämpfter Erde, so unbefriedigend waren die Ergebnisse feuchter Kapseln in ungedämpfter Felderde. Sowohl eine Behandlung mit pilzfreien als auch pilzhaltigen Kapseln führte im Faltschachtelversuch mit ungedämpfter Erde zu einer Steigerung des Larvenbefalls in den Wurzeln von bis zu 300% gegenüber der Kontrolle. Die Applikation von *H. rhossiliensis* als pilzliche Biofeuchtmasse hatte weder eine steigernde noch eine reduzierende Wirkung auf die Larveneindringung. Die Förderung des Nematodenbefalls sowohl durch die Formulierungshilfsstoffe als auch die pilzfreien und pilzhaltigen Kapseln könnte auf ein fehlendes Wachstum von *H. rhossiliensis* im Boden hindeuten oder aber eine Begleitscheinung in Verbindung mit dem Abbau der organischen Substanz im Boden sein. Andere Ursachen, wie z. B. kontaminierte Kapseln, geringe Vitalität des Pilzes oder zu niedrige Aufwandmenge konnten durch entsprechende Untersuchungen ausgeschlossen werden. Auch JAFFEE et al. (1996) berichten für Alginatkapseln mit *H. rhossiliensis* von einer ausbleibenden Wirkung gegen *H. schachtii* in unbehandel-

ter Erde. Sie führen dies darauf zurück, dass *H. rhossiliensis* aufgrund seiner geringen Konkurrenzkraft durch andere Organismen im Wachstum unterdrückt wird. Dies ist nachvollziehbar, wenn man bedenkt, dass sowohl das Kapselmaterial als auch mögliche Nährstoffe in den Kapseln in der Regel eine hervorragende Nahrungsquelle für Bodenmikroorganismen darstellen. Innerhalb kürzester Zeit kommt es vermutlich zu einem drastischen Anstieg der am Abbau des Kapselmaterials beteiligten Bakterien- und Pilzpopulationen im Boden. Aus Untersuchungen mit Bodenapplikationen von 1% Chitin ist bekannt, dass die Bakterienpopulation innerhalb von 24 Stunden um den Faktor 100 und die Pilzpopulation um den Faktor 50 erhöht wird (HALLMANN et al., 1999). Eine vergleichbare Stimulierung der Bodenmikroorganismen wäre auch im vorliegenden Fall bei Zugabe von 4% feuchter Kapseln vorstellbar. Auch die Zufuhr kompostierten Hühner- oder Rindermistes bzw. von Weizenstroh wirkt sich negativ auf die Wirksamkeit von *H. rhossiliensis* aus (JAFFEE et al., 1994). *H. rhossiliensis* muss im Boden nicht nur Phialiden und Konidien bilden, sondern er muss sich auch noch gegen eine stark erhöhte Mikroorganismendichte in unmittelbarer Umgebung der hier verwendeten Biopolymere als Kapselmaterial durchsetzen. Für den langsam wachsenden und konkurrenzschwachen Pilz *H. rhossiliensis* ist diese Hürde vermutlich zu hoch.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die hier für die Verkapselung von *H. rhossiliensis* verwendeten Biopolymere für die Bekämpfung von *H. schachtii* an Zuckerrüben in der Praxis nicht geeignet sind. Grundsätzlich wird die Verkapselung von Mikroorganismen für den biologischen Pflanzenschutz aber weiterhin als ein erfolgversprechendes und vielseitig einzusetzendes Verfahren angesehen. Für den Einsatz von *H. rhossiliensis* in der Praxis ist es erforderlich, weitere Formulierungshilfsmittel und Methoden zu untersuchen.

## Zusammenfassung

In dem vorliegenden Forschungsvorhaben wurde die Wirksamkeit verschiedener Verkapselungen des nematophagen Pilzes *Hirsutella rhossiliensis* gegen den Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii* an Zuckerrübe untersucht. In Faltschachtelversuchen wurden feuchte Kapseln aus den Biopolymeren Guar gum MF und Guar gum MG mit 1% *H. rhossiliensis* in gedämpfter und ungedämpfter Erde eingesetzt und die Anzahl eingedrungener Larven von *H. schachtii* nach 7 Tagen ermittelt. In Gefäßversuchen wurde die Wirksamkeit getrockneter, ein- und zehnprozentiger Pilzkapseln aus den Biopolymeren Guar gum MF + Pektin PA5 bzw. Guar gum MG gegen *H. schachtii* in gedämpfter Erde untersucht. Bei Applikation in gedämpfter Erde führten alle Pilzkapseltypen zu einer signifikanten Reduzierung des Nematodenbefalls bis zu über 90%. Durch Erhöhung des Pilzgehaltes von 1% auf 10% war keine zusätzliche Steigerung der Wirkung feststellbar. Pilzfreie Kapseln bzw. die Kapselmaterialien selbst bewirkten demgegenüber eine Stimulierung des Nematodenbefalls. Wurden die Pilzkapseln jedoch in ungedämpfter Erde eingesetzt, war keine Wirkung mehr feststellbar und der *H. schachtii*-Besatz in Zuckerrübe war teilweise sogar signifikant erhöht. Es ist zu vermuten, dass das ohnehin schon langsame Wachstum des insgesamt recht konkurrenzschwachen Pilzes *H. rhossiliensis* aus den Kapseln durch Bodenmikroorganismen gehemmt wurde. Abschließend bleibt festzuhalten, dass die hier für die Verkapselung von *H. rhossiliensis* verwendeten Biopolymere für die Bekämpfung von *H. schachtii* an Zuckerrüben in der Praxis nicht geeignet sind. Der erfolgreiche Einsatz von *H. rhossiliensis* als biologisches Bekämpfungsverfahren in der Praxis erfordert entweder andere Kapselmaterialien oder aber die Entwicklung eines alternativen Formulierungsverfahrens.

## Summary

In the present study, research was conducted to determine the efficacy of various encapsulations of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* for control of the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii* on sugar beet. The potential of moist capsules, made of Guar gum MF and Guar gum MG and containing 1% *H. rhossiliensis*, was evaluated in a bioassay. It was conducted in heat-treated and untreated soil. The number of nematodes in each root system was counted seven days after germination. Dried capsules that were made of the biopolymers Guar gum MF + Pectine PA5 and Guar gum MG, containing 1% and 10% *H. rhossiliensis*, were tested for their effectiveness against *H. schachtii* in two separate pot trials (300 ml) on sugar beet. Both greenhouse trials were conducted in heat-treated soil. All capsule types containing *H. rhossiliensis* led to a significant reduction of nematode invasion up to 90% when applied to heat-treated soil. Increasing the amount of fungus added to a capsule from 1% to 10% did not improve its efficacy. In contrast, capsules without *H. rhossiliensis* or different capsule materials

stimulated root penetration by *H. schachtii*. When applied to untreated soil, capsules containing *H. rhossiliensis* failed to suppress nematode invasion of roots of sugar beet seedlings. In fact, in some cases it even lead to an increase in root penetration. As *H. rhossiliensis* is an inferior competitor and its growth is quite slow, it is assumable, that its growth was inhibited by other soil micro organisms. Perhaps an encapsulation of *H. rhossiliensis* as described in this study is not suitable for the control of *H. schachtii*. A successful application of *H. rhossiliensis* as a method of biological control requires the development of optimised encapsulation materials or perhaps even an alternative composition or formulation.

### Danksagung

Das Forschungsvorhaben war Teil des Verbundprojektes "Polymere auf Basis nachwachsender Rohstoffe zur biologischen Bekämpfung von Zuckerrüben nematoden und pilzlichen Wurzelbranderregern für eine ökologische Zuckerrübenproduktion" (FKZ: 22003802). Für die finanzielle Unterstützung danken wir der Fachagentur nachwachsender Rohstoffe e.V. Ein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Joachim Müller vom Institut für Nematologie und Wirbeltierkunde der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Münster, der dieses Forschungsvorhaben mit initiierte und über die Jahre mit Interesse verfolgte.

### Literatur

- BYRD, D.W., JR., T. KIRKPATRICK, K.R. BARKER (1983): An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *J. Nematol.* **15**, 142-143.
- CAVENESE, F.E., H.J. JENSEN (1955): Modification of the centrifugal-flotation technique for the isolation and concentration of nematodes and their eggs from soil and plant tissue. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* **22**, 87-89.
- CHEN, S.Y., C.D. REESE (1999): Parasitism of the nematode *Heterodera glycines* by the fungus *Hirsutella rhossiliensis* as influenced by crop sequence. *J. Nematology* **31**, 437-444.
- GRIFFIN, G.D. (1981): The relationship of plant age, soil temperature and population density of *Heterodera schachtii* on the growth of sugar beet. *J. Nematol.* **13**, 184-190.
- GUTBERLET, V. (2000): Untersuchungen zur Eignung der Verkapselung des nematophagen Pilzes *Hirsutella rhossiliensis* für die biologische Bekämpfung von *Heterodera schachtii* und *Meloidogyne incognita* unter Verwendung nachwachsender Rohstoffe. Dissertation Universität Bonn.
- HALLMANN, J. (1994): Einfluß und Bedeutung endophytischer Pilze für die biologische Bekämpfung des Wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita* an Tomate. Dissertation Universität Bonn.
- HALLMANN, J., R. RODRÍGUEZ-KÁBANA, J.W. KLOPPER (1999): Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 551-560.
- JAFFEE, B. A. (1992): Population biology and biological control of nematodes. *Can. J. Microbiol.* **38**, 359-364.
- JAFFEE, B.A., H. FERRIS, J.J. STAPLETON, M.V.K. NORTON, A.E. MULDOON (1994): Parasitism of nematodes by the fungus *Hirsutella rhossiliensis* as affected by certain organic amendments. *J. Nematol.* **26**, 152-161.
- JAFFEE, B.A., J.T. GASPARD, H. FERRIS (1989): Density-dependent parasitism of the soil-borne nematode *Cricone-mella xenoplax* by *Hirsutella rhossiliensis*. *Microb. Ecology* **17**, 193-200.
- JAFFEE, B.A., A.E. MULDOON (1989): Suppression of cyst nematode by natural infestation of a nematophagous fungus. *J. Nematol.* **21**, 505-510.
- Jaffee, B.A., A.E. MULDOON (1997): Suppression of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by alginate pellets containing the nematophagous fungi *H. rhossiliensis*, *Monacrosporium cionopagum* and *M. ellipso-sporum*. *Biocontr. Science and Techn.* **7** (2), 203-217.
- JAFFEE, B.A., A.E. MULDOON, C.E. ANDERSON, B.B. WESTERDAHL (1991): Detection of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* in California sugar beet fields. *Biol. Contr.* **1**, 63-67.
- JAFFEE, B.A., A.E. MULDOON, B.B. WESTERDAHL (1996): Failure of a mycelial formulation of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* to suppress the nematode *Heterodera schachtii*. *Biol. Contr.* **6**, 340-346.
- JAFFEE, B.A., R. PHILLIPS, A.E. MULDOON, M. MANGEL (1992): Host-parasite dynamics in soil microcosms. *Ecology* **73**, 495-506.
- LACKEY, B.A., B.A. JAFFEE, A.E. MULDOON (1992): Sporulation of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* from hyphae produced in vitro and added to soil. *Phytopathology* **82**, 1326-1330.

- LACKEY, B.A., A.E. MULDOON, B.A. JAFFEE (1993): Alginate pellet formulation of *Hirsutella rhossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. Biol. Contr. **3**, 155-160.
- LUI, S.F., S.Y. CHEN (2005): The efficacy of the fungi *Hirsutella minnesotensis* and *H. rhossiliensis* from liquid culture for control of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. Nematology **7**, 149-157.
- MINTER, D.W., B.L. BRADY (1980): Mononematous species of *Hirsutella*. Trans. Brit. Mycol. Soc. **74**, p. 271-282.
- MÜLLER, J. (1985): Aussichten des integrierten Pflanzenschutzes bei der Bekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden. Gesunde Pflanzen **37**, 216-221.
- MÜLLER, J. (1992): Detection of pathotypes by assessing the virulence of *Heterodera schachtii* populations. Nematologica **38**, 50-64.
- MÜLLER, J. (1999): The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. Helminthologia **36**, 205-213.
- PATEL, A.V., B.E. SLAATS, J. HALLMANN, R. TILCHER, W. BEITZEN-HEINEKE, K.-D. VORLOP (2004): Verkapselung von bakteriellen Antagonisten und eines nematophagen Pilzes. Gesunde Pflanzen **57**, 30-33.
- PATEL, A.V. (1998): Verkapselungsverfahren für die biologische Schädlingsbekämpfung und zur Konstruktion von „vegetativem Samen“. Landbauforschung Völkenrode SH **188**.
- PATEL, A.V., T. ROSE, K.-D. VORLOP (2002): Encapsulation of *Hirsutella rhossiliensis* in hollow beads based on sufoethylcellulose to control plant-parasitic nematodes. Landbauforschung Völkenrode SH **241**, 145-150.
- SCHUSTER, R.P., R.A. SIKORA (1992): Influence of different formulations of fungal egg pathogens in alginate granules on biological control of *Globodera pallida*. Fundam. Appl. Nematol. **15**, 257-263.
- STURHAN, D., R. SCHNEIDER (1980): *Hirsutella heteroderae*, ein neuer nematodenparasitärer Pilz. Phytopathol. Z. **99**, 105-115.
- UNDERWOOD, T., B.A. JAFFEE, P. VERDEGAAL, M.V.K. NORTON, W.K. ASAI, A.E. MULDOON, M.V. MCKENRY, H. FERRIS (1994): Effect of lime on *Criconebella xenoplax* and bacterial canker in two California orchards. J. Nematol. **26**, 606-611.
- VIAENE, N. M., G.S. ABAWI (2000): *Hirsutella rhossiliensis* and *Verticillium chlamydosporium* as Biocontrol Agents of the root-knot nematode *Meloidogyne hapla* on lettuce. J. Nematol. **32**, 85-100.