

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Außenstelle Kitzberg, Heikendorf

## Möglichkeiten und Grenzen der biologischen Bekämpfung des Wurzelkropfes (*Agrobacterium tumefaciens*)

### Biological control of crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*)

Von W. Zeller

#### Zusammenfassung

Die von KERR in Australien entwickelte Methode zur biologischen Bekämpfung des Wurzelkropfes mit dem antagonistischen Stamm K 84 von *Agrobacterium radiobacter* wird beschrieben. In einer kurzen Übersicht wird zunächst die erfolgreiche Bekämpfung an verschiedenen Wirtspflanzen vorgestellt und über Fälle in verschiedenen Ländern berichtet, in denen die Methode bereits praktiziert wird. Es folgt eine Darstellung der technischen Durchführung des Verfahrens, eine Beschreibung des Wirkungsmechanismus und ein Ausblick auf die sich infolge von möglichen genetischen Veränderungen ergebenden Komplikationen.

#### Summary

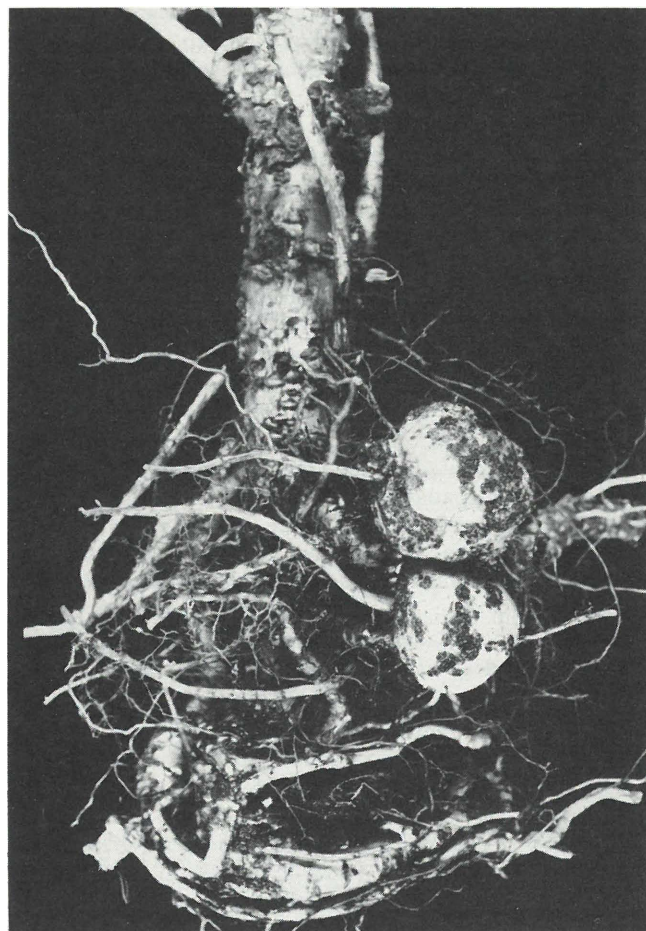
A short review of the biological control of crown gall first developed by KERR in Australia is given. Initially, successful control in different host plants in those countries practicing this method is described, followed by a description of the technical application, mechanism of control and an outlook on the possible complications as a result of genetic modifications.

Der Wurzelkropferreger (*Agrobacterium tumefaciens*) ist ein im Boden lebendes stäbchenförmiges, bewegliches Bakterium. Es dringt vom Erdboden aus durch Wunden an den Wurzeln und unterirdischen Stammteilen in die Pflanze ein und induziert dort eine unregelmäßige Zellteilung im Gewebe der Wirtspflanze, die sich später in massiver Krebswucherung und Knollenbildung äußert (Abb. 1).

Der Erreger, der unter den Phytobakteriosen den wohl größten Wirtspflanzenkreis einnimmt – nach ELLIOT (1951) allein 61 Familien mit 140 verschiedenen Arten – kommt in allen Obst und Wein anbauenden Ländern vor. In der Bundesrepublik Deutschland ist die Krankheit erst in letzter Zeit wieder vermehrt festgestellt worden, nachdem sie zuvor von Beginn des Jahrhunderts bis etwa zu Anfang der 30er Jahre wiederholt angetroffen wurde (STAPP 1958). Vorwiegend in Norddeutschland ist die Krankheit an Obstgehölzen und verschiedenen Rosenunterlagen zuletzt in so starkem Maße aufgetreten, daß sie den Export dieser Wirtspflanzen zunehmend gefährdet. Da die früher nach OPPENHEIMER (1926) praktizierte Bekämpfungsmethode – das Eintauchen der zurückge-

schnittenen Gehölze mit ihren Wurzeln bis zum Wurzelhals in einen Lehmbrei, dem ein quecksilberhaltiges Mittel (1 % Ceresan) zugesetzt war – nicht mehr zulässig ist, steht der Praxis zur Zeit kein geeignetes Bekämpfungsmittel zur Verfügung.

Abb. 1. Wurzelkropf an Pfirsich.  
Foto: Schmidle



Tab. 1. Biologische Bekämpfung des Wurzelkropfes in natürlich infiziertem Boden (nach KERR 1980)

Behandlung	Ø Trockengewicht (g) Tumorgewebes/ Pflanze	Bekämpfung in %
unbehandelte Kontrolle	11,64	—
Saatgut-Inokulation mit Stamm 84	2,50	78,5
Wurzel-Inokulation mit Stamm 84	0,59	94,9
Saatgut- und Wurzelinokulation mit Stamm 84	0,14	98,8

In letzter Zeit wurde nun von einer biologischen Bekämpfungsmaßnahme berichtet, die berechtigten Anlaß bietet, dem Erreger in einzelnen Fällen auch unter unseren Verhältnissen wirksam zu begegnen. Die 1972 in Australien entwickelte Methode (NEW und KERR 1972), mit der zum ersten Mal ein spezifischer Mikroorganismus zur Bekämpfung eines Pflanzenpathogens im Boden verwendet wird, wurde dort seit 1973 auch kommerziell bei Steinobst und Rosen eingesetzt. Nachfolgend soll über die Methode und deren bisherige Erfolge berichtet werden.

#### Entwicklung der Methode

In einer Untersuchung von Boden, der aus einer Baumschule mit Mandelbäumen stammte, konnten von NEW und KERR (1972) neben pathogenen Formen von *Agrobacterium* auch solche Isolate gefunden werden, die nach künstlicher Infektion keine Wucherungen an den Testpflanzen Tomate und Pfirsichsämlingen hervorrufen konnten. Es zeigte sich, daß im Bereich des Wurzelsystems erkrankter Pflanzen das Verhältnis von pathogenen zu apathogenen Bakterien hoch und bei gesunden Wirtspflanzen niedrig war. Dieser Befund ließ die Autoren eine genauere Untersuchung der Interaktionen dieser unterschiedlichen *Agrobacterien*-Formen\*) durchführen. Dabei ergab sich, daß bei einem Verhältnis von pathogenen zu apathogenen Bakterien von 1 oder < 1 nach künstlicher Infektion keine Tumorbildung an Tomaten oder Pfirsichsämlingen auftrat. Hiernach stellte sich die Frage, ob nicht auch eine Bekämpfung des Wurzelkropfes unter Freilandbedingungen möglich ist. Um das abzuklären, wurde zunächst natürlich infizierter Boden aus einer Anlage verwendet, in der zuvor Mandelbäume wegen zu hoher Verseuchung mit *Agrobacterium* gerodet worden waren. Der Boden wurde in größere Töpfe gebracht, diese ins Freie gestellt und anschließend der Einfluß der apathogenen *Agrobakterien* auf die Wurzelkropfbildung an Pfirsichen geprüft. Insgesamt erfolgten 3 unterschiedliche Inokulationen mit dem Stamm 84 von *Agrobacterium radiobacter* in den folgenden Versuchsanstellungen:

1. Inokulation von Saatgut
  2. Inokulation des Wurzelsystems
  3. Inokulation von Saatgut und Wurzelsystem
- Als Kontrolle dienten nicht inokulierte Pflanzen.

\*) KERR (1979) zufolge existieren in der Bodenmikroflora beim Wurzelkropf-Komplex zwei unterschiedliche Formen von *Agrobacterium radiobacter* (two kinds of *Agrobacteria*): *A. radiobacter* var. *tumefaciens* und *A. radiobacter* var. *radiobacter*, von beiden können pathogene und apathogene Isolate im Boden vorkommen. Die meisten anderen Autoren differenzieren dagegen nur zwischen *Agrobacterium tumefaciens* und *A. radiobacter*.

Die Auswertung erfolgte 9 Monate nach der Behandlung, die Ergebnisse sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Es zeigte sich, daß nach der Wurzelinokulation mit Stamm K 84 eine nahezu 95%ige Bekämpfung des Wurzelkropfes und bei kombinierten Saat- und Wurzelinokulationen sogar ein Wirkungsgrad von 99 % erzielt werden konnte. Die alleinige Saatgutbehandlung, die erst nach 2 Jahren ausgewertet wurde, erbrachte noch einen 78%igen Bekämpfungserfolg (HTAY und KERR 1974).

#### Technische Durchführung und bisherige Anwendung

Die Anzucht des antagonistischen Bakteriums kann auf verschiedenen Nährböden wie auch in der Nährlösung erfolgen. In der nebenstehenden Tabelle 2 sind zwei Anzuchtmöglichkeiten wiedergegeben. Nach ca. 3tägigem Wachstum wird mit destilliertem Wasser auf eine Bakterienkonzentration von  $10^7$  bis  $10^8$ /ml eingestellt. Zu beachten ist, daß die Bakterien weder in chlorhaltigem Wasser suspendiert werden noch zu hohen oder zu niedrigen Temperaturen oder der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt werden. Die Behandlung erfolgt durch ca. 5 sek. Eintauchen des Pflanzenmaterials (Saatgut, Stecklinge oder Wurzeln) in die Bakterien suspension. Im Anschluß daran wird sofort ausgesät bzw. ausgepflanzt. Selbst in Baumschulanlagen mit mehr als 10jährigem starken Befall mit Wurzelkropf soll sich ein guter Bekämpfungserfolg gezeigt haben.

Aufgrund dieser guten Ergebnisse wird dieses biologische Verfahren seit 1973 auch kommerziell durch verschiedene Firmen in Australien und Neuseeland, USA (Kalifornien), Kanada und zuletzt in Südafrika genutzt. Nach neuesten Berichten wurde die Methode auch in Italien bereits mit Erfolg eingesetzt (BAZZI 1980). In den meisten Fällen werden Agarkulturen bzw. Nährlösungen dem Anbauer angeboten. In einigen Fällen wurden auch Techniken, wie sie bei der *Rhizobium*-Kultur üblich sind, angewendet. Da die Methode billig, einfach zu handhaben und von guter Wirkung ist, dürfte sie auch in weiteren Ländern Eingang finden können.

#### Einsatz an verschiedenen Wirtspflanzen

Bisher wurde das Verfahren vorwiegend an Prunoideen und Rosen erfolgreich eingesetzt (KERR 1980). Ein gutes Beispiel für diese Wirkung am Steinobst zeigt der anbei beschriebene

Tab. 2. Nährmedien zur Kultur von *Agrobacterium radiobacter* K 84

Yeast Extract-Saccharose Agar (DHANVANTARI 1976)	
Yeast Extract	1,0 %
Saccharose	0,5 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,02 %
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	0,02 %
NaCl	0,02 %
CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	0,01 %
Agar	1,5 %
pH 7,00	
Yeast-Glucose-Pepton Nährlösung (MOORE 1976)	
Yeast Extract	0,4 %
Glucose	2,0 %
Pepton	0,4 %
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 %
pH 7,00	

Tab. 3. Wurzelkropfentwicklung an jungen Steinobstbäumen 6 Monate nach biologischer oder chemischer Behandlung (Nach SCHROTH und MOLLER 1976)

Behandlung			Ø Gallen/ Baum
Mandelbaum	I	Unbehandelte Kontrolle	3,62
	II	Biologische Bekämpfung*)	0,49
	III	D-242/3000 ppm**)	4,31
Pfirsich	I	Unbehandelte Kontrolle	5,03
	II	Biologische Bekämpfung	0,96
	III	D-242/3000 ppm	4,79
Pflaume	I	Unbehandelte Kontrolle	4,46
	II	Biologische Bekämpfung	0,22
	III	D-242/3000 ppm	2,82
Aprikose	I	Unbehandelte Kontrolle	2,09
	II	Biologische Bekämpfung	0,39
	III	D-242/3000 ppm	0,19

\*) Biologische Bekämpfung mit  $10^7$  Zellen/ml von *Agrobacterium radiobacter* Stamm K 84

\*\*) D-242; Spritzbrühe von Tetraisopentyl-ammonium-bromid

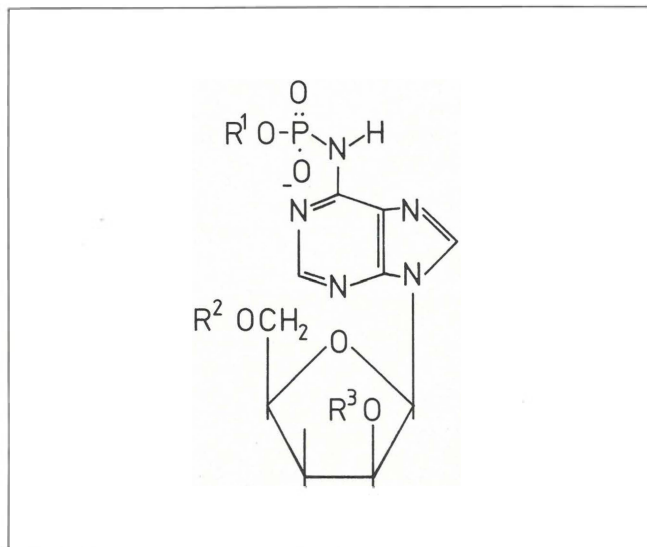


Abb. 2. Strukturformel von Agrocine 84 (nach KERR 1980).

Freilandversuch von SCHROTH und MOLLER (1976) in Kalifornien. Aus der Tabelle 3 geht deutlich hervor, daß an 3 von 4 geprüften Prunus-Arten jeweils das biologische Verfahren einen besseren Bekämpfungserfolg im Vergleich zur chemischen Behandlung erzielte. In einem Fall (Aprikose) zeigte die Inokulation mit K 84 nahezu den gleichen positiven Effekt wie die Spritzbrühe. Auch andere Autoren berichten von ähnlich guten Ergebnissen an verschiedenen Sämlingen und Unterlagen von Kirsche und Pfirsich in den USA (MOORE 1977, COOKSEY und MOORE 1980), Kanada (DHANVANTARI 1976) und England (GARRETT 1979). Im Gegensatz dazu konnte in den Niederlanden an Äpfeln und Birnen keine Reduktion des Wurzelkropfes mit dieser Methode nachgewiesen werden. Der Autor führt dies auf einen auf K 84 unempfindlich reagierenden Biotyp von *Agrobacterium* zurück (VAN DER SCHEER 1978). Von ähnlich negativen Ergebnissen berichtet GRIMM (1980) an Kernobstunterlagen in der Schweiz. Auch bei der Weinrebe liegt offenbar ein widerstandsfähiger Pathotyp vor, so daß eine Bekämpfung hier nicht zu erreichen war (KERR und PANAGOPOULOS 1977). Insgesamt gesehen ist der Einsatz des Verfahrens noch auf einen speziellen Wirtspflanzenkreis beschränkt geblieben und scheint insbesondere eine selektive Wirkung auf Prunoideen und Rosen auszuüben.

### Wirkungsmechanismus

Der Wirkungsmechanismus, auf dem der antagonistische Effekt des Stammes K 84 beruht, wurde von KERR und seiner Arbeitsgruppe bisher sehr eingehend untersucht (KERR und HTAY 1974, ROBERTS et al. 1977) und wird einer von K 84 produzierten antibiotischen Substanz, die selektiv die meisten pathogenen *Agrobacterien* hemmt, zugesprochen. Diese als Agrocine 84 bezeichnete Verbindung gehört zu einer neuen Gruppe hoch spezifischer Nucleotid-Bacteriocine, deren Strukturformel in Abbildung 2 wiedergegeben ist.

Die Bedeutung der Agrocine-Bildung wird u. a. darin deutlich, daß nur solche apathogenen Stämme, die Agrocine 84 zu bilden vermögen, die Wurzelkropfentwicklung verhindern können; die Stämme, die es nicht produzieren können, zeigen keinen Effekt. Umgekehrt können nur solche pathogenen Stämme gehemmt werden, die auf das Agrocine 84 empfindlich reagieren. So waren z. B. Isolate von der Weinrebe gegen das Bacteriocine resistent und ließen sich nicht bekämpfen (KERR

und PANAGOPOULOS 1977). In ähnlicher Weise reagierte, wie zuvor erwähnt, ein in Holland isolierter pathogener Biotyp 1, der ebenfalls nicht sensitiv auf Agrocine 84 war (VAN DER SCHEER 1978).

Der neuesten Hypothese zufolge ist die Produktion des Agrocine genetisch determiniert und soll auf einem spezifischen Plasmid codiert sein. Ein Plasmid-Transfer auf apathogene *Agrobacterien*stämme wird nach Konjugation für möglich gehalten, soll jedoch an ein anderes Plasmid gekoppelt sein. Dieses induziert die Katabolisierung von Nopalin, einem spezifischen Aminosäure-Derivat, das nur im Wurzelkropfgebe bisher gefunden wurde. Das recipiente apathogene Bakterium kann über diesen Transfer ebenfalls Agrocine 84 produzieren und hat damit die Fähigkeit erlangt, die Wurzelkropfbildung zu hemmen (ELLIS und KERR 1979).

Abschließend soll noch auf eine Problematik hingewiesen werden, die KERR (1980) zufolge das gesamte Konzept seiner biologischen Bekämpfung zum Scheitern verurteilen könnte. Dies wäre z. B. der Fall, wenn sich zeigen sollte, daß bei einer routinemäßigen Anwendung von Stamm K 84 aus den bekämpften pathogenen Stämmen solche mutieren, die infolge Plasmid-Transfers von K 84 selbst in der Lage wären, Agrocine zu produzieren und damit gegen das Agrocine resistent wären. Daß diese Hypothese nicht ganz auszuschließen ist, wird aus ersten Anzeichen, die offenbar in diese Richtung weisen, deutlich. Denn in Griechenland wurden nach Versuchen an Pfirsichsämlingen, die mit einem Gemisch aus Stamm 84 und einem pathogenen Stamm im Verhältnis 1:1 inokuliert wurden, in 16,5 % der Fälle Isolate gefunden, die sowohl das Agrocine 84 produzierten als auch pathogen waren (PANAGOPOULOS et al. 1979). Außerdem konnte in vitro nach einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung sogar eine Mutationsrate von über 80 % an resistenten *A. tumefaciens*-Stämmen, die einer Agrocine-84-Behandlung ausgesetzt waren, gefunden werden (SOULE und KADO 1981). Dies sind bisher Einzelfälle, die zwar KERRS Bekämpfungsverfahren mit *A. radiobacter* K 84 in einem mehr kritischen Licht erscheinen lassen, für die Methode spricht jedoch, daß sie seit 7 Jahren in vielen Ländern in Übersee und Europa erfolgreich eingesetzt wurde.

Literaturverzeichnis folgt in Heft 9, 1981.