

Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren - Teilprojekt: Graufäule und Echter Mehltau

Application of biocontrol agents to regulate diseases on strawberries – part: Grey Mould (*Botrytis cinerea*) and Powdery Mildew (*Podosphaera aphanis*)

FKZ: 11NA013

Projektnehmer:

Hochschule Geisenheim
Institut für Obstbau
Von-Lade-Straße 1, 65366 Geisenheim
Tel.: +49 6722 502-561
Fax: +49 6722 502-560
E-Mail: Obstbau@hs-gm.de
Internet: www.hs-geisenheim.de

Autoren:

Sylla, Justine; Krüger, Erika; Wohanka, Walter

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.

ZUWENDUNGSEMPFÄNGER:

Hochschule Geisenheim
Institute für Phytomedizin und Obstbau
Von-Lade-Straße 1
65366 Geisenheim

FÖRDERKENNZEICHEN:

11NA013

SCHLUSSBERICHT ZUM VORHABEN:

Einsatz mikrobiologischer Präparate
zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren

- Teilprojekt: Graufäule und Echter Mehltau

LAUFZEIT DES VORHABENS:

01.01.2012 bis 31.12.2013

BERICHTSZEITRAUM:

01.01.2012 bis 31.12.2013

ZUSAMMENARBEIT MIT:

Julius Kühn Institut
Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt

Inhaltsverzeichnis:

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes	4
1.1. Gesamtziel des Vorhabens	4
1.2. Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen	4
1.3. Wissenschaftliche und technische Arbeitsziele des Vorhabens	5
1.4. Planung und Ablauf des Projekts	5
1.5. Darstellung vorhandener Schnittpunkte und Synergieeffekte im Verbundprojekt.....	9
1.6. Wissenschaftlicher und technischer Stand	9
2 Material und Methoden	17
2.1. Allgemeine Informationen	17
2.2. Gewächshausversuche	18
2.2.1. Allgemeine Informationen zu den Gewächshausversuchen.....	18
2.2.2. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen <i>Botrytis cinerea</i> im Gewächshaus.....	19
2.2.3. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen <i>Podosphaera aphanis</i> im Gewächshaus	22
2.3. Freilandversuche	23
2.3.1. Allgemeine Informationen zu den Freilandversuchen.....	23
2.3.2. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen <i>Botrytis cinerea</i> im Freiland (2012)	25
2.3.3. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen <i>Botrytis cinerea</i> im Integrierten Anbau von Erdbeeren (2013).....	28
2.3.4. Vertiefung der molekularbiologischen Arbeiten.....	30
2.4. Statistik	32
3 Ergebnisse	34
3.1. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen <i>Botrytis cinerea</i> im Gewächshaus	34
3.2. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen <i>Podosphaera aphanis</i> im Gewächshaus.....	36
3.3. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen <i>Botrytis cinerea</i> im Freiland (2012)	37
3.4. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen <i>Botrytis cinerea</i> im Integrierten Anbau von Erdbeeren (2013)	46
3.5. Ergebnisse der 454 Pyrosequenzierung	53
3.5.1. Freilandversuche 2011 und 2012	53
3.5.1. Freilandversuch 2013	55
3.6. Diskussion der Ergebnisse	64
3.7. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse; bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse	68
4 Zusammenfassung.....	70
5 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen und Hinweise auf weiterführende Fragestellungen.....	72

6 Literaturverzeichnis.....	73
7 Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt	78

1 Ziele und Aufgabenstellung des Projektes

1.1. Gesamtziel des Vorhabens

Bei dem vorliegenden Vorhaben handelt es sich um eine Projektverlängerung des Projektes „Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren – Teilprojekt Graufäule und Echter Mehltau“ (FKZ 06OE354). Hauptziel des gesamten Projektes war die Entwicklung eines nachhaltigen Applikationssystems hinsichtlich der Regulierung von Schaderregern durch mikrobiologische Präparate im Ökologischen Erdbeeranbau. Im Rahmen des hier beschriebenen Teilprojektes sollte dies am Beispiel der Graufäule (*Botrytis cinerea*) und des Echten Mehltaus (*Podosphaera aphanis*) geschehen. Ziel der Projektverlängerung war es, die bisherigen Untersuchungen zum Einsatz von mikrobiologischen Präparaten gegen *B. cinerea* und *P. aphanis* (Sylla et al. 2012) in weiteren Gewächshaus- und Freilandversuchen zu vervollständigen und damit die Ergebnisse durch mehrere Vegetationsperioden abzusichern. Nach der Öffnung des Bundesprogramms Ökologischer Landbau (BÖL) für andere Formen der nachhaltigen Landwirtschaft (BÖLN), sollte in der Projektverlängerung auch ein Freilandversuch zur Kombinierbarkeit mikrobiologischer Präparate mit Fungiziden im Integrierten Erdbeeranbau Berücksichtigung finden.

1.2. Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen

Wichtiges Hemmnis bei der Umstellung zum Ökologischen Erdbeeranbau ist unter anderem die Befürchtung der Obstbauern, dass aufgrund fehlender wirksamer, biologischer Pflanzenschutzmittel erhöhte Ertragsausfälle durch Krankheiten und Schädlinge auftreten. Die Erarbeitung von neuen Behandlungsstrategien zur Regulierung von Schaderregern im Ökologischen Erdbeeranbau kann somit dazu beitragen, die Rahmenbedingungen für eine weitere Stärkung und Ausdehnung des Ökologischen Erdbeeranbaus dauerhaft zu verbessern. Das Forschungsprojekt leistet somit einen wichtigen Beitrag für die Ertrags- und Qualitätssicherung im Ökologischen Erdbeeranbau. Daneben kann ein Einsatz von mikrobiologischen Präparaten im Konventionellen bzw. Integrierten Erdbeeranbau sinnvoll sein und dazu beitragen, den Einsatz von Fungiziden zu reduzieren.

1.3. Wissenschaftliche und technische Arbeitsziele des Vorhabens

Hauptziel des beantragten Forschungsprojektes und der Projektverlängerung war die Entwicklung eines Applikationssystems bzw. von Behandlungsstrategien für mikrobiologische Präparate, die für eine optimierte Schaderregerregulierung bei ökologisch angebauten Erdbeeren geeignet sind. Im Einzelnen sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- Können *B. cinerea* und *P. aphanis* effektiv mit mikrobiologischen Präparaten reguliert werden?
- Können verbesserte Wirkungen gegen die Pathogene erzielt werden, indem mikrobiologische Präparate kombiniert appliziert werden?
- Beeinflussen diese Präparate das Auftreten anderer Schaderreger?
- Gibt es Wechselwirkungen zwischen den ausgebrachten Mikroorganismen und der indigenen Mikroorganismengemeinschaften in der Erdbeerphyllosphäre?
- Können mikrobiologische Präparate so kombiniert werden, dass ein ganzer Schaderregerkomplex effektiv reguliert werden kann?

Im Rahmen der Projektverlängerung sollte außerdem der mögliche Einsatz mikrobiologischer Präparate im Integrierten Erdbeeranbau untersucht und bewertet werden. Im letzten Projektjahr waren daher folgende Fragen zu bearbeiten:

- Können mikrobiologische Präparate erfolgreich im Integrierten Erdbeeranbau gegen Graufäule eingesetzt werden?
- Kann, neben dem Einsatz herkömmlicher Fungizide, der zusätzliche Einsatz von mikrobiologischen Präparaten im Integrierten Anbau von Erdbeeren zu einer verbesserten Regulierung von *B. cinerea* führen?
- Kann der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln die Etablierung der ausgebrachten Mikroorganismen beeinträchtigen?

1.4. Planung und Ablauf des Projekts

Die Projektverlängerung wurde vom 01.01.2012 bis 31.12.2013 durchgeführt. Arbeiten, die bereits im vorangegangenen Projekt „Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren – Teilprojekt: Graufäule und Echter Mehltau“ (FKZ 06OE354) durchgeführt wurden, sollten in zwei weiteren Vegetationsperioden vertieft werden.

Nachdem das Bundesprogramm Ökologischer Landbau (BÖL) für andere Formen der nachhaltigen Landwirtschaft geöffnet wurde (BÖLN), sollten zudem Fragestellungen zum kombinierten Einsatz von mikrobiologischen Präparaten und Fungiziden bearbeitet werden. Insbesondere sollte geklärt werden, ob der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln die Performance von mikrobiologischen Präparaten im Integrierten Anbau beeinflussen kann.

Dem Arbeitsplan (Abb. 1) ist die zeitliche Planung der verschiedenen Untersuchungen für 2012 und 2013 zu entnehmen.

zeitliche Arbeitsplanung	2012				2013			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Untersuchungen zur Wirksamkeit und Kombinierbarkeit von BCAs gegen <i>B. cinerea</i> im Gewächshaus								
Untersuchungen zur Wirksamkeit und Kombinierbarkeit von BCAs gegen <i>P. aphanis</i> im Gewächshaus								
Wirksamkeit und Kombinierbarkeit von BCAs im Freiland								
Versuche unter Praxisbedingungen								
Molekularbiologische Arbeiten								
Integrierter Erdbeeranbau - Freilandversuch								
Endauswertung und Endbericht								
Meilensteine				M1 M2				M3 M4

Abb. 1: Zeitlicher Ablaufplan für das Projekt von 2012 bis 2013

Die zu erreichenden Meilensteine waren wie folgt definiert:

- M1: Bewertung der Wirksamkeit und Kombinierbarkeit von mikrobiologischen Präparaten im Gewächshaus
- M2: Bewertung des Einsatzes von mikrobiologischen Präparaten im Freiland und Erstellung eines Applikationssystems für eine anschließende Anwendung in der Praxis
- M3: Bewertung der Integrierbarkeit von mikrobiologischen Präparaten im Integrierten Erdbeeranbau
- M4: Endauswertung und Endbericht

Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Botrytis cinerea* im Gewächshaus

Im vorangegangenen Projekt FKZ 06OE354 wurden im Jahr 2011 ausgewählte mikrobiologische Präparate separat und in Kombination mit anderen Präparaten hinsichtlich ihrer Wirkung gegen *B. cinerea* untersucht. Für eine zuverlässige Bewertung der gewonnenen Versuchsergebnisse unter Gewächshausbedingungen sollte dieser Versuch 2012 wiederholt werden.

Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Podosphaera aphanis* im Gewächshaus

Im vorangegangenen Projekt FKZ 06OE354 wurden im Jahr 2010 ausgewählte mikrobiologische Präparate separat und in Kombination mit anderen Präparaten zweimal hinsichtlich ihrer Wirkung gegen *P. aphanis* unter Gewächshausbedingungen untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse, hervorgerufen durch schwankende Präparatqualitäten, sollte der Versuch im Projektjahr 2012 wiederholt werden, um die bisher erhobenen Ergebnisse sinnvoll zu ergänzen.

Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Botrytis cinerea* und *Podosphaera aphanis* im Freiland

Nachdem im vorangegangenen Projekt FKZ 06OE354 der Freilandversuch zur Wirksamkeit ausgewählter Präparate und Präparatkombinationen gegen *B. cinerea* im Jahr 2010 aufgrund der extremen Witterungsverhältnisse nicht eindeutig bewertet werden konnte und das getestete Präparat Trianum-P (*Trichoderma harzianum* T22) im Freilandversuch 2011 durch das Präparat BoniProtect® forte (*Aureobasidium pullulans*) ersetzt werden musste, sollte der 2011 durchgeführte Freilandversuch im Projektjahr 2012 wiederholt werden.

In Anlehnung an das vorangegangene Projekt FKZ 06OE354 sollte neben dem Effekt der ausgebrachten BCAs auf die Entwicklung von *B. cinerea* an der Pflanze bzw. während der Lagerung auch ein möglicher Einfluss der BCAs auf die Entwicklung von Nichtzielorganismen (z.B. Schädlinge und indigene Mikrobiota) erfasst und bewertet werden. Weiterhin sollte im Anschluss an den Freilandversuch 2012 auf der gleichen Fläche ein Versuch zur Wirksamkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *P. aphanis* durchgeführt werden.

Ausweitung der Praxisversuche

Im Rahmen der Projektverlängerung war geplant, die Durchführung von Versuchen in Praxisbetrieben in 2012 und insbesondere in 2013 auszuweiten. Zu diesem Zeitpunkt sollten, basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Gewächshaus- und Freilandversuche, Behandlungsstrategien und Handlungsempfehlungen erarbeitet worden sein.

Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate im Integrierten Anbau von Erdbeeren

Aufgrund der Ausdehnung des Bundesprogramms Ökologischer Landbau auch auf andere Formen der nachhaltigen Landwirtschaft (BÖLN) sollte untersucht werden, ob mikrobiologische Präparate erfolgreich im Integrierten Erdbeeranbau gegen Graufäule und Echten Mehltau eingesetzt werden können und ob deren zusätzlicher Einsatz zu besseren Behandlungserfolgen führt. Hierfür war für 2013 ein Freilandversuch geplant, in dem verschiedene mikrobiologische und chemische Präparate im Hinblick auf ihre Wirksamkeit gegen Graufäule untersucht werden sollten. In diesem Versuch sollten weiterhin mikrobiologische Untersuchungen zur Etablierung der BCAs im Integrierten Erdbeeranbau zum Einsatz kommen, um wichtige Aussagen zu einem möglicherweise negativen Einfluss von Fungiziden auf die Etablierung der ausgebrachten BCAs zu treffen.

Vertiefung der molekularbiologischen Arbeiten

Für ein genaues Verständnis und eine korrekte Interpretation der Behandlungsergebnisse in den Freilandversuchen ist es notwendig, die Etablierung der ausgebrachten Mikroorganismen sowie deren mögliche Interaktionen mit den indigenen Mikroorganismen zu erfassen. Hierfür sollten im Rahmen der Projektverlängerung neben den klassischen mikrobiologischen Arbeiten (Lebendkeimzahlbestimmungen) erneut molekularbiologische Arbeiten (454 Pyrosequenzierung) durchgeführt werden.

1.5. Darstellung vorhandener Schnittpunkte und Synergieeffekte im Verbundprojekt

Während der Projektverlängerung fand auf dem Gebiet des Ökologischen Erdbeeranbaus eine Kooperation zwischen drei BÖLN-Projektpartnern statt:

Bioland/Föko beschäftigte sich mit der Unkrautkontrolle sowie der Regulierung des Erdbeerblütenstechers zur Stärkung der Ertragssicherheit und Rentabilität im Ökologischen Erdbeeranbau (FKZ 11NA011). Die Projekte des Julius Kühn-Institutes (JKI) und der Hochschule Geisenheim (ehemals Forschungsanstalt Geisenheim) konzentrierten sich hingegen auf die Erarbeitung von Behandlungsstrategien für den „Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren“, wobei sich das JKI mit bodenbürtigen Krankheitserregern (FKZ 11NA012) und die Hochschule Geisenheim mit Graufäule und Echtem Mehltau (FKZ 11NA013) beschäftigte.

Ziel des Verbundes war die Erarbeitung von Strategien zur Regulierung von Schaderregern im Ökologischen Erdbeeranbau. Zu diesem Zweck fanden während des Projektes, einschließlich der Projektverlängerung, regelmäßige Verbundtreffen statt, in denen die Ergebnisse der einzelnen Projekte ausgetauscht und diskutiert wurden.

1.6. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Erdbeeren stellen für den Verbraucher nach dem Apfel die beliebteste Frucht der Deutschen dar. Sie sind reich an Inhaltsstoffen, sind aber auch leicht verderblich und anfällig für Pilzkrankheiten. Pilzliche Krankheitserreger kommen sowohl an der Frucht, am Blatt wie an unterirdischen Pflanzenteilen vor. Mangels wirksamer Alternativen beschränkt man sich im Ökologischen Erdbeeranbau bei der Regulierung von Schaderregern vornehmlich auf pflanzenbauliche Maßnahmen und die Wahl weniger anfälliger Sorten. So wird z.B. versucht, über die Reduktion des organischen Düngereinsatzes oder veränderte Standweiten 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 (Moser et al. 2008).

In der Praxis beobachtet man jedoch eine geringe Akzeptanz der BCAs. 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: a) unzureichende Befallsreduzierung, b) hohe Empfindlichkeit gegenüber Witterungsbedingungen und c) Applikation zu spezifischen Zeitpunkten.

Da im vorgesehenen Teilprojekt spezifisch die Graufäule und der Echte Mehltau an Erdbeeren untersucht werden sollten, wird im Folgenden der Stand des Wissens für die biologische Bekämpfung dieser besonders wichtigen Erdbeerkrankheiten erläutert.

Die Graufäule (Erreger: *Botrytis cinerea* (Pers.)) zählt weltweit zu den wichtigsten Krankheiten der Erdbeere und führt besonders im Ökologischen Anbau zu gravierenden Ertragseinbußen. Die typische Fruchtfäule beginnt meist mit einer Infektion der Blüte. Die alternden Blütenblätter scheinen besonders empfindlich. Erst bei zunehmender Fruchtreife erfolgt dann die typische Fäulnis- und Grauschimmelbildung. Später kommt es oft durch direkten Kontakt mit bereits befallenen Organen und bei entsprechenden kleinklimatischen Bedingungen zu einer raschen Ausbreitung im gesamten Blüten- bzw. Fruchtstand (Abb. 2A und 2B). Spätinfektionen können dazu führen, dass die Fäulnis erst auf dem Weg zum oder beim Konsumenten auftritt (Abb. 2C). Von Bedeutung sind auch die Besiedlung abgestorbener Pflanzenteile und die darauf stattfindende, oft sehr starke Sporulation. Auf dem abgestorbenen Pflanzenmaterial erfolgt im Wesentlichen die Überwinterung des Schaderregers. Eine umfassende Darstellung zur Biologie und Pathogenese von *Botrytis cinerea* ist dem Werk von Elad et al. (2004) zu entnehmen.



Abbildung 2: Charakteristische Symptome an Erdbeeren verursacht durch *B. cinerea*. A: Abgestorbene Erdbeerblüte bei hohem Pathogendruck. B: Graufäule an einer Frucht im Bestand. C: Graufäule auf geernteten Früchten

Im Ökologischen Erdbeeranbau sind keine Pflanzenschutzmittel gegen die Graufäule zugelassen. Zur Befallsregulierung kommen deshalb in erster Linie kulturtechnische Maßnahmen zum Einsatz (z.B. weiter Stand, Strohunterlage, Sortenwahl, Entfernen von Infektionsquellen wie alte Blätter, usw.). Als besonders wichtige Maßnahme wird ein im Vergleich zum konventionellen Anbau deutlich weiterer Pflanzenabstand mit besserer Bestandesdurchlüftung angesehen. Dies hat jedoch eine geringere Flächenproduktivität zur Folge (Legard et al. 2000). Eine befallsreduzierende Veränderung der kleinklimatischen Bedingungen lässt sich auch durch den Anbau in Folientunneln erreichen (Xiao et al. 2001; Evenhuis and Wanten 2006), ohne Einbußen bei der Flächenproduktivität in Kauf nehmen zu müssen. Das Entfernen des abgestorbenen Laubes und vor allem das kontinuierliche Auspflücken befallener Früchte bedeuten einen enormen arbeitswirtschaftlichen Nachteil des ökologischen Anbaues von Erdbeeren. Es gibt erhebliche Sortenunterschiede in der Anfälligkeit der Erdbeeren gegenüber *Botrytis cinerea* (Daugaard and Lindhard 2000); allerdings stehen Sorten mit vollständiger Resistenz gegen die Graufäule nicht zur Verfügung. Die weniger anfälligen Sorten entsprechen nicht immer den Markterfordernissen, so dass eine gezielte Sortenwahl zur Reduzierung der Graufäule nur bedingt möglich ist.

Eine weitere Möglichkeit zur Reduzierung der Graufäule ist der Einsatz von mikrobiologischen Präparaten. Zahlreiche Präparate bzw. Isolate wurden bereits gegen *B. cinerea*, insbesondere auch an Erdbeere, getestet (Elad and Stewart 2004; Sesan 2006). Helbig und Bochow (2001) berichten über eine Reduktion (16-40 %) des Graufäulebefalls in Freilandbeständen durch *Bacillus subtilis* an reifen Früchten. Nach Helbig (2001) bewirkte *Paenibacillus polymyxa* eine Befallsreduzierung um 24 bis 36 %. Auch mit *Cryptococcus albidus* erzielte Helbig (2002) eine vergleichbare Befallsreduzierung. Tanovic et al. (2008) erreichten Wirkungsgrade von 40,3 bzw. 4,5 % mit 'Polyversum' (*Pythium oligandrum*) bzw. 'F-stop' (*B. subtilis*). Der hefeähnliche Pilz *Aureobasidium pullulans* reduzierte das Wachstum von *B. cinerea* auf Erdbeerfrüchten signifikant und verzögerte die Entwicklung des Pathogens auf gelagerten Früchten, die zuvor mit dem BCA behandelt wurden (Adikaram et al. 2002). Lima et al. (1997) berichteten, dass auch Behandlungen von Erdbeerpflanzen mit *A. pullulans* bereits während der Blüte die Graufäuleentwicklung auf gelagerten Früchten signifikant reduzierten. Freeman et al. (2004) konnten nachweisen, dass verschiedene Stämme von *Trichoderma harzianum* im Gewächshaus wirksam gegenüber *B. cinerea* waren. Auch Kovach

et al. (2000) erzielten mit einem spezifischen Stamm ("1295-22") von *Trichoderma harzianum* eine gute Wirkung gegen die Graufäule, insbesondere, wenn die Verteilung der *Trichoderma*-Konidien mit Hummeln oder Bienen erfolgte.

Der Echte Mehltau (Erreger: *Podosphaera aphanis* (Wallr.)) hat als Schaderreger an Erdbeeren stark an Bedeutung gewonnen, insbesondere durch den zunehmenden Anbau im Tunnel (Parikka 2004; Dogson et al. 2008). Während *P. aphanis* im Freiland oftmals keine signifikanten Ertragseinbußen verursacht (Maas 1984; Xiao et al. 2001; Carisse and Bouchard 2010), können im geschützten Erdbeeranbau erhebliche Schäden auftreten, die sowohl Ertrag als auch Fruchtqualität beeinträchtigen können. Der starke Mehлтаubefall im Tunnel ist mit dem fehlenden Niederschlag und den für *P. aphanis* günstigen klimatischen Bedingungen (z.B. hohe Luftfeuchtigkeit, verringerte Lichtintensität) korreliert (Xiao et al. 2001; Amsalem et al. 2006).

Auffällige Symptome des Echten Mehltau an Erdbeeren sind der typische, pudrige Mehлтаubelag auf den Blättern (Abb. 2A und 2B) sowie die nach oben gerollten Blätter (Abb. 2C). Mit fortschreitendem Befall können rötlich-violette Flecken auf der Blattunterseite sichtbar werden. Aber auch Blüten (Abb. 2D) und Früchte können besiedelt und geschädigt werden. Überwiegend entstehen die Ertragseinbußen jedoch durch eine allgemeine Schwächung der Pflanze und der damit verbundenen geringeren Blüten- und Fruchtentwicklung.



Abbildung 3: Charakteristische Symptome des Erdbeermehltaus. A: Kolonien des Echten Mehltaus auf Erdbeerblättern B: Dichter Mehлтаubelag auf Erdbeerblättern, C: Aufrollen der Blätter, D: Erdbeerblüte mit Befall durch *P. aphanis*

Zur direkten Bekämpfung des Echten Mehltau an Erdbeeren ist für den Ökologischen Anbau außer Schwefel kein Pflanzenschutzmittel zugelassen (Trapp 2013). Es gibt auch keine Erdbeersorten mit vollständiger Resistenz gegen diesen Erreger, die gleichzeitig resistent gegenüber anderen, wichtigen Schaderregern sind sowie zufriedenstellende Fruchtqualitäten aufweisen (Pertot et al. 2008). Deshalb stehen auch hier bislang die kulturtechnischen Maßnahmen im Vordergrund. Das Entfernen (Abmähen) des Erdbeerlaubes im Herbst hat nur eine begrenzte Wirkung und ist je nach Anbauform nicht immer möglich. Im Folientunnel werden vor allem die Ausläufer befallen (Vukovitz 1980; Xiao et al. 2001). Bei fehlenden sonstigen Gegenmaßnahmen müssen diese aufwändig von Hand entfernt werden, um ein Übergreifen des Pilzes auf die Ertragspflanzen und die heranreifenden Früchte zu vermeiden. Neben diesen eher kulturtechnischen Maßnahmen können gegen den Echten Mehltau an Erdbeere auch Behandlungen mit z.B. Na-Bicarbonat, Blattextrakten (z.B. aus *Reynoutria sachalinensis*) oder mikrobiologischen Präparaten durchgeführt werden. Der wohl bekannteste mikrobielle Antagonist ist der Hyperparasit *Ampelomyces quisqualis*, mit dem bereits an verschiedenen Kulturen gute Wirkungen gegen verschiedene Arten des Echten Mehltau erzielt werden konnten (Elad et al. 1996; Elad et al. 1998; Elad 2000; Kiss 2003; Romero et al. 2003; Kiss et al. 2004). In einer Studie von Pertot et al. (2008) zeigten Behandlungen mit *A. quisqualis*, *B. subtilis* und *T. harzianum* im geschützten Anbau von Erdbeeren deutliche Wirkungen, die jedoch nicht denen einer chemischen Behandlung entsprachen. In einer weiteren Untersuchung von Pertot et al. (2007) hemmten *T. harzianum* und zwei Stämme von *B. subtilis* (QST 713 und F77) die Entwicklung von *P. aphanis* auf Erdbeerblättern, während *A. quisqualis* jedoch nicht wirksam war. Untersuchungen von De Cal et al. (2008) zeigten, dass auch die Applikation von *Penicillium oxalicum* eine wirksame Reduzierung des Echten Mehltau an Erdbeeren ermöglicht.

Trotz der viel versprechenden Ergebnisse zur Wirkung von antagonistischen Mikroorganismen bzw. mikrobiologischen Präparaten gegenüber *B. cinerea* und *P. aphanis*, wird auch von unzureichenden Wirkungen der BCAs berichtet, insbesondere unter Freilandbedingungen (z.B. Prokkola and Kivijärvi 2007; Fravel 2005; Hjeljord et al. 2000). Die schwankenden Behandlungserfolge im Freiland können verschiedene Ursachen haben. Einerseits fehlen umfassende Kenntnisse über die Kompatibilität von BCAs mit anderen BCAs und mit anderen biologischen Pflanzenschutzmitteln. Andererseits können abiotische Faktoren (z.B. UV-Strahlung, Niederschlag) die Etablierung, die Aktivität sowie das Überleben

der ausgebrachten Mikroorganismen und damit den Behandlungserfolg wesentlich beeinträchtigen (Jacobsen 2006; Kiss et al. 2004; Magan 2004; Kiss 2003).

Bislang betrachteten die meisten Untersuchungen zur Wirkung von Mikroorganismen gegen Phytopathogene die Wirkung der Applikation eines einzelnen Präparates (Mikroorganismus) und berücksichtigten nicht mögliche Wechselwirkungen mit anderen Präparaten oder sonstigen Pflanzenschutzmaßnahmen. Dabei kann die Kombination verschiedener Mikroorganismen z.B. durch die Erfassung unterschiedlicher Entwicklungsstadien des Zielorganismus zu einer besseren Wirkung führen als die Applikation der einzelnen Produkte (Elad et al. 1994). Aber auch andere Wechselwirkungen sind beim Einsatz von BCA-Kombinationen möglich. So können sich bestimmte nützliche Mikroorganismen in ihrer Fähigkeit zur Anpassung an wechselnde Umweltbedingungen oder durch verschiedene Wirkmechanismen ergänzen und damit kann die Wirkung gegenüber dem Zielpathogen verbessert werden (Elad and Stewart 2004; Guetsky et al. 2002a; Guetsky et al. 2002b; Guetsky et al. 2001). Es wurde jedoch auch von antagonistischen Wechselwirkungen bei einer kombinierten Anwendung der Präparate Serenade™ (*B. subtilis*), Trianum™ (*T. harzianum* Rifai T22) und Sentinel™ (*Trichoderma artroviride*) gegen *B. cinerea* an Erdbeeren berichtet (Xu et al. 2010; Robinson-Boyer et al. 2009). Wenig Beachtung fanden bislang auch Neben- oder Wechselwirkungen von BCAs mit anderen Krankheiten bzw. Schädlingen oder Nützlingen. Die Literaturrecherche ergab nur eine Veröffentlichung zu dieser Thematik. Pertot et al. (2008) beobachteten keinerlei Auswirkungen des Einsatzes von *A. quisqualis*, *B. subtilis* and *T. harzianum* T39 auf die Entwicklung von Spinn- oder Raubmilben.

Es gibt außerdem nur wenige Untersuchungen zur Etablierung der ausgebrachten antagonistischen Mikroorganismen in der Phyllosphäre, insbesondere unter Freilandbedingungen und wann mögliche Wechselwirkungen bei einer kombinierten Behandlung von mehreren BCAs zu erwarten sind. Guetsky et al. (2002a) berichten über das Überleben von *Bacillus mycoides* und *Pichia guillemontii* auf Erdbeerblättern sowie auf Erdbeerfrüchten im Gewächshaus. Die Bestimmung der Lebendkeimzahlen ergab in dieser Arbeit, dass die Populationsgröße der ausgebrachten Mikroorganismen auf den Blättern nach zwei Tagen unverändert, nach fünf Tagen auf 1/50 und nach 19 Tagen auf 1/500 gesunken war. Eine kombinierte Anwendung von *Bacillus mycoides* und *Pichia guillemontii* zeigte

hinsichtlich ihrer Überlebensraten keine signifikanten Abweichungen zu den Einzelbehandlungen (Guetsky et al. 2002a). Eine weitere Untersuchung zeigte, dass unter Gewächshausbedingungen Populationen von *T. atroviride* auf Erdbeerblättern innerhalb von sieben Tagen von 3×10^5 auf 1×10^1 KBE pro mm^2 sanken (Longa et al. 2008). Aufgrund der insgesamt sehr schnellen Abnahme von BCA-Populationen in der Phyllosphäre müssen BCA-Behandlungen regelmäßig wiederholt werden (Jacobsen 2006).

Der Einsatz mikrobiologischer Präparate ist nicht nur für den Ökologischen Erdbeeranbau von Bedeutung, sondern könnte auch im Konventionellen Erdbeeranbau wesentlich an Bedeutung gewinnen. Grund hierfür sind die vermehrten Berichte über das Auftreten von Resistenzen gegenüber Fungiziden. So berichtete Weber (2011), dass eine Vielzahl an *Botrytis*-Isolaten aus Norddeutschland erhebliche Resistenzen gegenüber verschiedenen kommerziellen Botrytiziden aufzeigten (z.B. Fenhexamid, Thiophanat-Methyl, Iprodion). In dieser Studie konnte auch nachgewiesen werden, dass einige Isolate von *B. cinerea* gleichzeitig gegenüber mehreren Fungiziden resistent waren. Die Integration von effektiven BCAs im Konventionellen Anbau kann zu einer Reduktion von Fungizidapplikationen führen, ohne dass erhöhte Ertragsausfälle durch verstärkten Pathogenbefall auftreten (Elad and Shtienberg 1995; Shtienberg and Elad 1997). Pertot et al. (2008) testeten die Integration von mikrobiologischen Präparaten in verschiedenen Strategien zur Reduzierung des Fungizideinsatzes gegen Echten Mehltau an Erdbeeren im Tunnel. In ihrer Untersuchung konnte der integrierte Einsatz von mikrobiologischen Präparaten in einigen Strategien, in denen gleichzeitig die Anzahl der Fungizidbehandlungen verringert war, ähnlich gute Wirkungen gegenüber *P. aphanis* auf Blättern erzielen wie die gängigen Fungizidspritzfolgen. In einer Studie von Cota et al. (2009) führte der integrierte Einsatz des BCAs *Clonostachys rosea*, Fungiziden und kulturtechnischen Maßnahmen (Entfernen von infizierten und toten Pflanzenmaterial) im Vergleich zu den entsprechenden Einzelbehandlungen zu verbesserten Wirkungen gegen *B. cinerea* an Erdbeeren. Allerdings war in dieser Studie die Anzahl der Fungizidbehandlungen in den integrierten Versuchsgliedern nicht reduziert. Obwohl der integrierte Einsatz von BCAs und Fungiziden insgesamt sehr vielversprechend ist, wird auch davon berichtet, dass diese Strategie nicht immer erfolgreich ist (Elad and Shtienberg 1995). So kann ein integrierter Einsatz von BCAs und Fungiziden zu unzureichenden Wirkungen führen, wenn z.B. ungünstigen Witterungsbedingungen für die BCAs vorherrschen (Elad and

Shtienberg 1995) oder wenn die BCAs empfindlich gegenüber den Fungiziden sind (Cota et al. 2009).

Studien zur Struktur von Mikroorganismengesellschaften, die auch nicht kultivierbare Mikroorganismen erfassen (z.B. PCR-DGGE, SSCP) sind relativ zeit- und kostenaufwändig. Seit einigen Jahren sind moderne, preisgünstige Sequenziertechniken (next-generation sequencing) wie z.B. die Roche 454-Pyrosequenzierung verfügbar, die ebenfalls für metagenomische Untersuchungen geeignet sind. Mit dieser molekularbiologischen Methode können tausende Arten von Mikroorganismen (einschließlich der nicht kultivierbaren) in einer Probe genomisch erfasst werden (Wooley et al. 2010). Im Vergleich zur herkömmlichen Sanger-Sequenzierung kann die 454-Pyrosequenzierung die gleiche Menge an Sequenzdaten für nur 10 % der Kosten und 0,9 % des Zeitaufwands erzeugen (Jones 2010). Die neuen Sequenziertechniken erlauben die Erfassung von Metagenomen und liefern damit wertvolle Informationen für die gleichzeitige Beantwortung verschiedener Fragestellungen wie z.B. die Etablierung der ausgebrachten BCAs in der Phyllosphäre, mögliche Wechselwirkungen zwischen den BCAs und mögliche Auswirkungen der BCAs auf die Zusammensetzung der indigenen Mikrobiota.

2 Material und Methoden

2.1. Allgemeine Informationen

Mikrobiologische Präparate

Die Auswahl der BCAs für die Gewächshaus- und Freilandversuche im vorliegenden Projekt erfolgte auf Basis verschiedener Faktoren, u.a. der Wirkung der BCAs gegen *B. cinerea* und/oder *P. aphanis* in den Laboruntersuchungen des vorangegangenen Projektes FKZ 06OE354, deren Kombinierbarkeit *in vitro* sowie der Verfügbarkeit von kommerziell erhältlichen mikrobiologischen Präparaten.

Für die Gewächshaus- und Freilandversuche wurden die BCAs (Tabelle 1) in Form von formulierten Produkten und in denen vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen bzw. Aufwandmengen verwendet. In den Gewächshausversuchen wurden die verschiedenen Präparate mit 1/8 RINGER-Lösung, in den Freilandversuchen mit Leitungs- und Rheinwasser angesetzt.

Vor dem Hintergrund einer ganzheitlichen Betrachtung eines Applikationssystems im Ökologischen Erdbeeranbau, also der Erfassung verschiedener Organismen (einschließlich Schädlingen), wurde auch der entomopathogene Pilz *Beauveria bassiana* (Naturalis[®]) in dem vorliegenden Projekt verwendet. Dieser hatte im vorangegangenen Projekt FKZ 06OE354 gute *in vitro* Wirkungen gegen *B. cinerea* in Tests an abgeschnittenen Blüten gezeigt.

Tabelle 1: Liste der BCAs für die Gewächshaus- und Freilandversuche

Mikroorganismus	Präparat/ Zur Verfügung gestellt von
<i>Ampelomyces quisqualis</i> AQ10	AQ10 [®] WG/ Intrachem Bio Deutschland GmbH&Co.KG
<i>Aureobasidium pullulans</i> DSM Nr. 14940 & 14941	BoniProtect [®] forte/ Bio-Protect GmbH
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	RhizoVital [®] 42 fl./ ABiTEP GmbH
<i>Bacillus subtilis</i> FZB24	FZB24 [®] fl./ ABiTEP GmbH
<i>Beauveria bassiana</i> ATCC 74040	Naturalis [®] / Intrachem Bio Deutschland GmbH & Co.KG
<i>Trichoderma harzianum</i> T58	Trichostar [®] / Gerlach Natürliche Düngemittel GmbH & Co.KG

Pathogene

Für den Graufäule-Gewächshausversuch wurde ein aus Reben (Oestrich-Winkel, Deutschland) gewonnenes *B. cinerea* - Isolat aus der Stammsammlung des Institutes für Phytomedizin, Hochschule Geisenheim, verwendet. Das Isolat wurde bei -80 °C konserviert. Für den Versuch wurde es aufgetaut und anschließend bei 24 °C auf PDA (Dunkelheit) kultiviert.

Das Inokulum von *P. aphanis* für den Mehltau-Gewächsversuch stammte von natürlich infizierten Erdbeerpflanzen im Gewächshaus (Herbst 2012). Um den obligat biotrophen Schaderreger erhalten zu können, wurden junge, gesunde Erdbeerpflanzen der Sorte 'Elsanta' mit dem Echten Mehltau inokuliert und in einem Kulturraum bei circa 20 °C, 65 % relativer Luftfeuchtigkeit und einer Photoperiode von 12 Std./12 Std. kultiviert. Bei Bedarf wurden die Pflanzen durch neue ersetzt.

2.2. Gewächshausversuche

2.2.1. Allgemeine Informationen zu den Gewächshausversuchen

Der Graufäule-Gewächshausversuch wurde im Spätsommer/Herbst 2012, der Mehltau-Gewächshausversuch im Frühjahr 2013 durchgeführt. Für die Gewächshausversuche wurden Traypflanzen der Sorte 'Elsanta' verwendet. Für den Graufäule-Gewächshausversuch wurden diese in den Topfgrößen 13 cm (Anzucht) und 19 cm in Einheitserde Typ P (Gepac Patzer) kultiviert. Für den Mehltau-Gewächshausversuch wurden die Traypflanzen nur in der Topfgröße 13 cm in Einheitserde ED 73 (Gepac Patzer) kultiviert.

Die Gewächshausversuche wurden in einer 15 m² großen Gewächshauskabine durchgeführt. Von Anfang März bis Ende September wurde die Gewächshauskabine ab einer Lichtstärke von ca. 60 kLux schattiert. Von September bis März wurde eine Assimilationsbeleuchtung mit einer Photoperiode von 14 Std. (Tag) und 10 Std. (Nacht) eingeschaltet. Die Klimaführung für die verschiedenen Versuche ist in der Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht über die Klimaführung der Gewächshausversuche

Versuch	Klimaführung (Angaben in °C)
Graufäule - Gewächshausversuch	Vorkultur/Einwurzeln: (Tag/Abend/Nacht/Cool Morning) Heizung: 16/16/10/10 Lüftung: 20/20/14/14 Weiterkultur: (Tag/Abend/Nacht/Cool Morning) Heizung: 18/18/12/12 Lüftung: 22/22/16/16
Echter Mehltau -Gewächshausversuch	Während des gesamten Kultur: (Tag/Nacht) Solltemperatur: 20/18 Heizung: 18/16 Lüftung: 22/20

2.2.2. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Botrytis cinerea* im Gewächshaus

In diesem Versuch wurden pro Versuchsglied vier Parzellen mit je vier Versuchspflanzen (insgesamt 16 Pflanzen) auf Gewächshausstischen randomisiert aufgestellt. Die Pflanzen wurden zweimal wöchentlich manuell bewässert und ab Blühbeginn wöchentlich mit dem biologischen Flüssigdünger BIOTRISSOL[®] (0,5 %, Heinrich Propfe GmbH) gedüngt. Während der Blüte wurden täglich Ventilatoren für 1 Stunde eingeschaltet, um eine ausreichende Bestäubung der Blüten zu gewährleisten. Zur Vermeidung eines Spinnmilben- und Trauermückenbefalls wurden präventiv Raubmilben sowie Nematoden ausgebracht.

Die Versuchspflanzen wurden von Blühbeginn (BBCH 60) bis Erntebeginn (BBCH 87) wöchentlich mit den zu testenden BCAs behandelt (Tabelle 3). Die Kontrollpflanzen wurden mit 1/8 RINGER-Lösung oder mit einer im Erdbeeranbau gängigen Fungizidspritzfolge behandelt. Alle Behandlungen wurden mit Hilfe einer Rückenspritze (Hochdrucksprühgerät, 3615 INOX PLUS, Mesto GmbH) durchgeführt.

Tabelle 3: Versuchsglieder zur Bekämpfung von *B. cinerea* im Gewächshausversuch 2012

VG	Behandlung mit	Konzentration des Mittels (%)
VG01	1/8 RINGER-Lösung	
VG02	RhizoVital [®] 42 fl. (<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>)	0,07
VG03	BoniProtect [®] forte (<i>Aureobasidium pullulans</i>)	0,09
VG04	Naturalis [®] (<i>Beauveria bassiana</i>)	0,07
VG05	RhizoVital [®] 42 fl. + BoniProtect [®] forte	0,07 + 0,09
VG06	RhizoVital [®] 42 fl. + Naturalis [®]	0,07 + 0,07
VG07	BoniProtect [®] forte + Naturalis [®]	0,09 + 0,07
VG08	RhizoVital [®] 42 fl. + BoniProtect [®] forte + Naturalis [®]	0,07 + 0,09 + 0,07
VG09	1x Signum [®] , 2x Switch [®] , 1x Teldor [®] + Ortiva [®]	0,13; 0,1; 0,1 + 0,05

Um Aussagen zur Präparatqualität zu erhalten, wurden an jedem Behandlungstag die Lebendkeimzahlen in den mikrobiologischen Präparaten erfasst. Dabei entsprachen die Lebendkeimzahlen der entsprechenden Mikroorganismen in den BCA-Präparaten im Durchschnitt den Herstellerangaben.

Wie im Graufäule-Gewächshausversuch des Projektes FKZ 06OE354 wurden die Pflanzen jeweils 24 Stunden nach den ersten drei Behandlungsterminen mit einer Konidiensuspension von *B. cinerea* (ca. 1×10^5 Konidien/ml) in einer Aufwandmenge von 20-25 ml pro Pflanze inokuliert. Für eine ausreichende Infektion der Erdbeerpflanzen mit *B. cinerea* wurden die Pflanzen außerdem während der Blüte nachts (20 Uhr bis 8 Uhr) mit einer transparenten Plastikfolie abgedeckt. Die Abdeckung erfolgte von Montag bis Freitag, während dieses im Versuch des vorangegangenen Projektes FKZ 06OE354 täglich stattfand. Der Grund für die Reduzierung der Folienabdeckung von sieben auf vier Nächte pro Woche lag darin, dass damals bereits zu Blühbeginn ein sehr hoher Befall mit *B. cinerea* erfolgt war, was zum Absterben vieler Blüten geführt hatte.

Auswertung des Graufäule-Gewächshausversuches

Die Erdbeeren wurden wöchentlich geerntet und die Anzahl sowie das Frischgewicht der gesunden und mit *B. cinerea* befallenen Früchte erfasst.

Außerdem wurde die Befallshäufigkeit von *B. cinerea* an den Pflanzen an drei Terminen (BBCH 85, BBCH 87 und BBCH 89) erfasst. Dazu wurde bei jeder Bonitur an jeder Pflanze die Anzahl gesunder und mit *B. cinerea* befallener Früchte/Blüten sowie die Anzahl nicht bestäubter Blüten dokumentiert.

Die Befallshäufigkeit von *B. cinerea* wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Befallshäufigkeit von } B. \text{ cinerea } (\%) = (n_{\text{Bot}} / n_{\text{Ges}}) \times 100 \quad (1)$$

wobei n_{Bot} = Anzahl *Botrytis* infizierter Früchte pro Pflanze
 n_{Ges} = Gesamtanzahl Früchte pro Pflanze

In einem Lagerversuch wurden zudem Nachernteeffekte der BCAs untersucht. Hierfür wurden alle geernteten und gesunden Früchte auf Zellstoff-Papier in Plastikkisten (60 cm Länge x 40 cm Breite x 12 cm Tiefe) ausgelegt, so dass sich die Früchte nicht berührten (Abb. 4). Die Kisten mit den Erdbeeren wurden bei Raumtemperatur gelagert und die Früchte jeweils nach zwei, vier, sechs und sieben Tagen auf Infektionen mit *B. cinerea* sowie anderer Fruchtfäulen untersucht. Befallene Früchte wurden gezählt, gewogen und jeweils aus den Plastikkisten entfernt. Die Befallshäufigkeit von *B. cinerea* wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Befallshäufigkeit von } B. \text{ cinerea } (\%) = (n_{\text{Bot}} / n_{\text{Ges}}) \times 100 \quad (2)$$

wobei n_{Bot} = Anzahl *Botrytis* infizierter Früchte pro Kiste
 n_{Ges} = Gesamtanzahl Früchte pro Kiste



Abb. 4: Lagerung der Früchte in Plastikkisten

Nichtzielorganismen

Das Auftreten von Nichtzielorganismen wie Echter Mehltau, Blattläuse und Spinnmilben wurde während des Graufäule-Gewächshausversuches beobachtet. Es konnte ein Befall der Pflanzen mit Echtem Mehltau festgestellt werden. Der Echte Mehltau-Befall wurde gemäß eines Boniturschemas (Tabelle 4) an zwei Terminen (BBCH 85, BBCH 89) ermittelt.

Tabelle 4: Boniturschema zur Ermittlung des Befalls der Pflanzen mit Echtem Mehltau

Boniturskala	Mittlerer Befall
0	0%
1	0-1%
2	1-5%
3	5-20%
4	20-40%
5	>40%

Andere Nichtzielorganismen traten nicht auf.

2.2.3. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Podospaera aphanis* im Gewächshaus

Bei diesem Versuch handelte es sich um eine Wiederholung der beiden Mehltau-Gewächshausversuche, die 2010 im Rahmen des vorangegangenen Projektes FZK 06OE354 durchgeführt wurden.

Für diesen Versuch waren pro Versuchsglied sechs Parzellen mit je fünf Versuchspflanzen (insgesamt 30 Pflanzen) vorgesehen. Die Erdbeerpflanzen wurden zweimal wöchentlich per Hand bewässert. Es wurden präventiv Raubmilben sowie Nematoden eingesetzt, um einen Spinnmilben- bzw. Trauermückenbefall zu vermeiden.

Zu BBCH 12/13 wurden die verschiedenen BCAs gegen *P. aphanis* ausgebracht (Tabelle 5). Die Kontrollpflanzen wurden mit 1/8 RINGER-Lösung oder mit dem Fungizid Systhane 20 EW (Wirkstoff: Myclobutanil) behandelt. Alle Prüfmittel wurden mit einer Rückenspritze (Hochdrucksprüngerät, 3615 INOX PLUS, Mesto GmbH) ausgebracht. Nach der Behandlung, die außerhalb der Gewächshauskabine stattfand, wurden die Pflanzen entsprechend ihrer Behandlung randomisiert in der Gewächshauskabine auf insgesamt sechs Tischen aufgestellt.

Tabelle 5: Übersicht der Versuchsglieder im Mehltau-Gewächshausversuch

VG	Behandlung mit	Konzentration des Mittels (%)
VG 01	1/8 RINGER-Lösung	
VG 02	AQ10 [®] WG (<i>Ampelomyces quisqualis</i>)+ Nu-Film	0,07 + 0,3
VG 03	FZB24 [®] fl. (<i>Bacillus subtilis</i> FZB24)	0,1
VG 04	Trichostar [®] (<i>Trichoderma harzianum</i> T58)	1,0
VG 05	AQ10 [®] WG + Nu-Film + FZB24 [®] fl	0,07 + 0,3 + 0,1
VG 06	AQ10 [®] WG + Nu-Film + Trichostar [®]	0,07 + 0,3 + 1,0
VG 07	Trichostar [®] + FZB24 [®] fl	1,0 + 0,1
VG 08	Sythane 20 EW (200 g/l Myclobutanil)	0,05

Am Tag nach den Behandlungen wurden die Versuchspflanzen mit *P. aphanis* inokuliert. Dazu wurden jeweils zwei "Infektor-Pflanzen", welche starken Befall mit Echtem Mehltau aufwiesen, in einer Ampel über je einen Tisch angebracht. Die Konidien wurden einmalig mit Hilfe von zwei Ventilatoren für eine Stunde in der gesamten Kabine verwirbelt.

Auswertung des Mehltau-Gewächshausversuches

Nach einer zweiwöchigen Inkubation wurde der Befall der Pflanzen mit *P. aphanis* erfasst. Dazu wurde die Anzahl der Mehltaukolonien auf jedem Blatt gezählt und die mittlere Anzahl an Mehltaukolonien pro Pflanze berechnet.

2.3. Freilandversuche

2.3.1. Allgemeine Informationen zu den Freilandversuchen

Beide Freilandversuche wurden am Standort Geisenheim durchgeführt.

Der Freilandversuch 2012 wurde dabei auf derselben Versuchsfläche wie die Freilandversuche des vorangegangenen Projektes FZK 06OE354 durchgeführt. Hierbei handelte es sich um eine extensiv bewirtschaftete Fläche und der Versuch wurde erneut in einer randomisierten Blockanlage mit vier Blöcken zu neun Parzellen (insgesamt 36 Parzellen; ca. 1.300 m² Nettoversuchsfläche) angelegt. Im Projektjahr 2012 handelte es sich um zweijährige Erdbeerpflanzen. Diese waren am 12. August 2010 als getopfte Grünpflanzen (cv. Elsanta) gepflanzt und bereits im Freilandversuch 2011 als einjährige Pflanzen verwendet worden. Die Wasserversorgung der Pflanzen wurde über eine Tröpfchenbewässerung mit einem Einschaltpunkt von < -250 hPa sichergestellt.

Der Freilandversuch 2013 wurde auf einer benachbarten Fläche durchgeführt. Der Versuch wurde ebenfalls in einer randomisierten Blockanlage mit vier Blöcken zu acht Parzellen (insgesamt 32 Parzellen; ca. 1200 m² Nettoversuchsfläche) angelegt. Für diesen Versuch wurden am 5. Juni 2012 Frigopflanzen (cv. Elsanta) gepflanzt. Die Pflanzen wurden 2013 mittels Sprinkler bewässert (bei < -250 hPa).

In beiden Versuchsjahren bestanden die Parzellen aus vier Reihen mit jeweils 20 Pflanzen (= 80 Pflanzen). Zur Vermeidung von Randeffekten wurden die äußeren Reihen je Parzelle als Randpflanzen betrachtet, so dass pro Parzelle insgesamt nur 32 Pflanzen für die Auswertungen verwendet wurden.

In beiden Versuchen wurden die Pflanzen zum Ende der Blüte mit Stroh gemulcht. Die Unkräuter wurden bei Bedarf mechanisch entfernt.

Zur Gewährleistung günstiger Infektionsbedingungen für *B. cinerea* wurde, wie im vorangegangenen Projekt FZK 06OE354, in den Freilandversuchen eine Beregnungsanlage installiert, indem alle Parzellen mit einem Sprinkler ausgestattet und die Pflanzen ab Blühbeginn nachts beregnet wurden. Die Beregnung erfolgte in beiden Jahren jeweils um 20:30 Uhr, 21:30 Uhr, 23:30 Uhr und 5 Uhr für je 8 Minuten (ca. 2 - 2,5 mm simulierter Niederschlag pro Nacht). Im Jahr 2012 wurde die Beregnung aufgrund starker Niederschläge jedoch vom 17.5. bis 22.5. ausgesetzt.

In Anlehnung an die Versuche des vorangegangenen Projektes FZK 06OE354, bestand eine weitere Maßnahme zur Förderung von *B. cinerea* darin, einen Großteil der Pflanzen im Bestand nicht zu beernten, d.h. befallene Früchte wurden an der Pflanze belassen. Ausgenommen davon waren zehn Pflanzen pro Parzelle, die für die Erfassung der Erntemengen vorgesehen waren.

Zwei Datalogger dienten der Erfassung von Lufttemperatur und relativer Luftfeuchte. Zwischen den Erdbeerpflanzen wurden außerdem Blattfeuchtefühler angebracht, um die Blattbenetzungszeiten zu erfassen.

2.3.2. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Botrytis cinerea* im Freiland (2012)

Im Projektjahr 2012 wurde der Freilandversuch aus 2011 (Projekt: FZK 06OE354) hinsichtlich der Wirksamkeit und Kombinierbarkeit von ausgewählten mikrobiologischen Präparaten gegenüber *B. cinerea* wiederholt.

Die drei mikrobiologischen Präparate RhizoVital[®] 42 fl. (*B. amyloliquefaciens*), BoniProtect[®] forte (*A. pullulans*) und Naturalis[®] (*B. bassiana*) wurden von Beginn der Erdbeerblüte (BBCH 61) bis kurz vor Ernteende (BBCH 89) im wöchentlichen Abstand einzeln und in Kombination gegen *B. cinerea* appliziert (Tabelle 6). In den Kontrollvarianten wurde Wasser bzw. eine im Konventionellen Erdbeeranbau gängige Fungizidspritzfolge (an vier Terminen während der Blüte, anschließend Wasser) ausgebracht. Die Prüfmittel wurden mithilfe einer druckluftunterstützten Dreidüsengabel (Christian Schachtner Gerätetechnik) an insgesamt sieben Behandlungsterminen ausgebracht.

Tabelle 6: Übersicht der Versuchsglieder im Freilandversuch 2012

VG	Behandlung mit	Konzentration des Mittels (%)
VG01	Wasser	
VG02	RhizoVital [®] 42 fl. (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	0,07
VG03	BoniProtect [®] forte (<i>Aureobasidium pullulans</i>)	0,09
VG04	Naturalis [®] (<i>Beauveria bassiana</i>)	0,07
VG05	RhizoVital [®] 42 fl. + BoniProtect [®] forte	0,07 + 0,09
VG06	RhizoVital [®] 42 fl. + Naturalis [®]	0,07 + 0,07
VG07	BoniProtect [®] forte + Naturalis [®]	0,09 + 0,07
VG08	RhizoVital [®] 42 fl. + BoniProtect [®] forte + Naturalis [®]	0,07 + 0,09 + 0,07
VG09	1x Signum [®] , 2x Switch [®] , 1x Teldor [®] + Ortiva [®]	0,13; 0,1; 0,1 + 0,05

An jedem Behandlungstermin wurden die Lebendkeimzahlen in den mikrobiologischen Präparaten erfasst. Sie entsprachen dabei jeweils im Durchschnitt den Herstellerangaben.

Auswertung des Freilandversuches

In Anlehnung an die Freilandversuche des vorangegangenen Projektes FZK 06OE354 wurden die Erntemengen, die Befallshäufigkeit von *B. cinerea* an der Pflanze sowie die Entwicklung von *B. cinerea* während der Fruchtlagerung ermittelt.

Für die Bestimmung der Erntemengen wurden zehn, durchschnittlich entwickelte Pflanzen markiert, an sechs Terminen beerntet und das Frischgewicht von gesunden Früchten ermittelt. Mit Graufäule befallene Früchte wurden ebenfalls geerntet und gewogen. Die durchschnittliche Erntemenge pro Pflanze wurde aus den aufsummierten Erntemengen ermittelt. Anschließend wurde der Prozentsatz befallener Früchte pro Pflanze berechnet.

Die Befallsbonituren hinsichtlich *B. cinerea* wurden bei BBCH 89, BBCH 91 und BBCH 92 durchgeführt, wobei die EPPO-Prüfrichtlinie 1/16 (2) (Eppo 1996) erfüllt wurde. Hierbei wurde die Anzahl gesunder und mit *B. cinerea* befallener Früchte bei zehn markierten und nicht beernteten Pflanzen in jeder Parzelle erfasst. Die Befallshäufigkeit wurde unter Verwendung von Formel 1 (siehe Kapitel 2.2.2.) berechnet.

Für die Untersuchung der Graufäuleentwicklung an gelagerten Früchten wurden 30 gesunde Früchte (oder alle Früchte bei weniger als 30 Früchten) berührungsfrei auf Zellstoff-Papier in Plastikkisten ausgelegt. Die Kisten wurden bei Raumtemperatur aufgestellt. Die Früchte wurden alle zwei Tage (max. sieben Tage) auf Befall durch *B. cinerea* und anderen Erregern untersucht. Die faulen Früchte wurden dabei entfernt, die gesunden Früchte verblieben jeweils in den Kisten. Die Anzahl und das Gewicht von Botrytisfrüchten wurden dokumentiert und die Befallshäufigkeit von *B. cinerea* bei den gelagerten Früchten nach Formel 2 (siehe Kapitel 2.2.2.) berechnet. Der Lagerversuch wurde insgesamt zweimal durchgeführt.

Vor dem Hintergrund der ganzheitlichen Betrachtung eines Applikationssystems im Ökologischen Erdbeeranbau wurde neben der Graufäule auch das Auftreten von Nichtzielorganismen an den Pflanzen beobachtet. Eine Befallsbonitur hinsichtlich des Erdbeerblütenstechers (*Anthonomus rubi*) erfolgte einmalig nach der Blüte. Hierfür wurden 10 Pflanzen auf abgeknickte Blüten untersucht. Die Befallshäufigkeit von *A. rubi* pro Parzelle wurde anschließend wie folgt berechnet:

$$\text{Befallshäufigkeit von } A. \text{ rubi } (\%) = (n_{\text{abgeknickt}} / 10) \times 100 \quad (3)$$

wobei $n_{\text{abgeknickt}}$ = Anzahl an Pflanzen mit abgeknickten Blüten

Das Auftreten von Spinnmilben wurde in einer destruktiven Endauswertung ermittelt (Milbenwaschmethode nach Boller 1984).

Weitere Schädlinge (z.B. Blattläuse) konnten nicht im nennenswerten Umfang beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde auf eine zeitaufwändige Bonitur der Schädlinge im Bestand verzichtet.

Wie im Versuch 2011 (Projekt: FZK 06OE354) wurden an drei Terminen Blattproben (30 Blätter pro Parzelle) entnommen, um die Etablierung der BCAs sowie den Einfluss der BCAs auf die natürlichen Mikroorganismengemeinschaften der Erdbeerblätter zu untersuchen. Für einen direkten Vergleich mit dem Freilandversuch des vorangegangenen Projektes FZK 06OE354 wurden die Blattproben 2012 zu den gleichen BBCH-Stadien entnommen wie 2011: die erste Probenahme fand vor der ersten BCA-Applikation zu BBCH 60, die zweite nach vier BCA-Applikationen zu BBCH 73 und die dritte vier Wochen nach der siebten bzw. der letzten BCA-Applikation zu BBCH 93 statt. Zusätzlich wurden an zwei Terminen (BBCH 91 und BBCH 92) jeweils 15 Früchte aus jeder Parzelle entnommen, um Aussagen zur Etablierung der BCAs auf den Früchten treffen zu können. Der Probenumfang umfasste sowohl bei den Blatt- als auch bei den Fruchtproben 36 Proben.

Durch Abspülen der Mikroorganismen von der Blatt- bzw. Fruchtoberfläche wurden Extrakte hergestellt. Zur Herstellung der Blattextrakte wurden die Blätter einer Probe in eine Pufferlösung überführt. Anschließend wurden die Mikroorganismen mittels Überkopfschüttlung (30 Minuten bei ca. 50 Umdrehungen pro Minute) sowie anschließendem Ultraschallbad (7 Minuten bei 35 kHz) von den Blättern abgewaschen und in PBS-Pufferlösung suspendiert. Zur Herstellung der Fruchtextrakte wurden die Mikroorganismen lediglich mittels Ultraschallbad von den Früchten abgewaschen. Die Blattextrakte wurden für die Lebendkeimzahlbestimmungen (kulturabhängiges Verfahren) und für die 454 Pyrosequenzierung (kulturunabhängiges Verfahren), die Fruchtextrakte lediglich für Lebendkeimzahlbestimmungen verwendet.

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahlen wurden jeweils 50 µl eines Blatt- oder Fruchtextraktes mittels Spiralplater (Whitley Automatic Spiral Plater, Don Whitley Scientific, England) auf verschiedene Nährmedien plattiert: R2A (Gesamtkeimzahlen Bakterien), PDA dil. (Gesamtkeimzahlen Pilze), TSA dil. (Endosporen-formende Bakterien, u.a. Bacilli), SA (Keimzahlen von *Aureobasidium*) und BSM (Keimzahlen von *Beauveria*). Für die Bestimmung

von Endosporen-formenden Bakterien wurden die Extrakte vor dem Ausplattieren auf TSA dil. einer Hitzebehandlung (80°C für 15 Minuten) unterzogen.

Die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) von Endosporen-formenden Bakterien wurde nach einer zweitägigen Inkubation bei 27°C (Dunkelheit) ermittelt. Die Anzahl an *Aureobasidium*-Kolonien auf SA wurde nach einer fünftägigen Inkubation bei 20°C (Dunkelheit) ermittelt, wohingegen die Auszählung der KBE auf den R2A-, PDA dil.- und BSM-Platten nach einer siebentägigen Inkubation bei 20°C (Dunkelheit) erfolgte. Die verwendeten Nährmedien und deren Rezepturen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Nährmedien für die Lebendkeimzahlbestimmungen

Nährmedium	Rezeptur
R2A	18,2 g/L R2A Agar (BD, Frankreich); 0,1 g/L Cycloheximid
PDA dil.	10,0 g/L Potato Dextrose Agar (Merck, Deutschland); 12,0 g/L Bacto Agar (BD, Frankreich) 0,1 g/L Streptomycinsulfat; 0,01 g/L Tetracycline hydrochlorid
SA	65,0 g/L Sabouraud Dextrose Agar (BD, Frankreich); 0,3 g/L Streptomycinsulfat
BSM	18,0 g/L Bacto Agar (BD, Frankreich); 20,0 g/L Glukose (99,9%); 10,0 g/L Soja-Pepton 0,05 g/L Cycloheximid; 0,1 g/L Dodine; 0,1 g/L Streptomycinsulfat; 0,05 g/L Tetracycline hydrochloride
TSA dil.	4,0 g/L Tryptic Soy Agar (BD, Frankreich); 13,5 g/L Bacto Agar (BD, Frankreich); 0,1 g/L Cycloheximid

Das restliche Volumen der Blattextrakte wurde in 250 ml Zentrifugenflaschen überführt und zentrifugiert (14.000xg, 20 Min., 4°C). Das entstandene Pellet wurde mit etwa 30 bis 40 ml des jeweils verbliebenen Überstandes resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspensionen wurden anschließend bis zum Beginn der molekularbiologischen Untersuchungen (siehe 2.3.4.) bei -20°C gelagert.

2.3.3. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Botrytis cinerea* im Integrierten Anbau von Erdbeeren (2013)

Im Versuch 2013 wurde neben der Wirksamkeit von ausgewählten BCAs und BCA-Kombinationen auch der Effekt eines zusätzlichen Einsatzes von ausgewählten BCA-Behandlungen nach einer vorangegangenen, klassischen Behandlungsfolge von Fungiziden im Hinblick auf eine möglicherweise verbesserte Regulierung von *B. cinerea* untersucht.

Hierzu wurden die Erdbeerpflanzen von Blühbeginn (BBCH 61) bis zur Fruchtreife (BBCH 85) mit den mikrobiologischen Präparaten RhizoVital[®] 42 fl. und BoniProtect[®] forte (jeweils einzeln sowie miteinander kombiniert) gegen *B. cinerea* behandelt. Darüber hinaus wurden diese BCA-Präparate in weiteren Versuchsgliedern nach einer klassischen Behandlungsfolge mit Fungiziden an drei weiteren Behandlungsterminen (jeweils einzeln oder miteinander kombiniert) ausgebracht (Tabelle 8). In den Kontrollvarianten wurde nur Wasser bzw. eine im Konventionellen Erdbeeranbau gängige Behandlungsfolge von Fungiziden (an drei Terminen während der Blüte, anschließend Wasser) ausgebracht. Die Prüfmittel wurden mithilfe einer druckluftunterstützten Dreidüsengabel an insgesamt sechs Behandlungsterminen appliziert.

Tabelle 8: Übersicht der Versuchsglieder im Freilandversuch 2013

VG	Behandlung mit	Konzentration des Mittels (%)
VG01	Wasser	
VG02	RhizoVital [®] 42 fl. (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	0,07
VG03	BoniProtect [®] forte (<i>Aureobasidium pullulans</i>)	0,09
VG04	RhizoVital [®] 42 fl. + BoniProtect [®] forte	0,07 + 0,09
VG05	1x Signum [®] , 1x Switch [®] , 1x Teldor [®] + Ortiva [®] , Rhizovital [®] 42 fl. (3x)	0,13; 0,1; 0,1 + 0,05; 0,07
VG06	1x Signum [®] , 1x Switch [®] , 1x Teldor [®] + Ortiva [®] , BoniProtect [®] forte (3x)	0,13; 0,1; 0,1 + 0,05 ; 0,09
VG07	1x Signum [®] , 1x Switch [®] , 1x Teldor [®] + Ortiva [®] , Rhizovital [®] 42 fl.+ BoniProtect [®] forte (3 x)	0,13; 0,1; 0,1 + 0,05; 0,09 + 0,07
VG08	1x Signum [®] , 1x Switch [®] , 1x Teldor [®] + Ortiva [®]	0,13; 0,1; 0,1 + 0,05

Auswertung des Freilandversuches

Wie bereits 2012 wurden an jedem Behandlungstag die Lebendkeimzahlen in den mikrobiologischen Präparaten erfasst. Auch in diesem Versuch entsprachen die Lebendkeimzahlen in den BCA-Präparaten den Angaben der Hersteller.

Die Erntemengen, der Befall von *B. cinerea* im Bestand sowie die Entwicklung von *B. cinerea* an gelagerten Früchten wurden wie im Freilandversuch 2012 ermittelt (siehe Kapitel 2.3.2). Abweichend zum Freilandversuch 2012 wurden die Befallsbonituren von *B. cinerea* in diesem Jahr nur an zwei Terminen durchgeführt (BBCH 91 und BBCH 92).

Im Versuch 2013 wurden weiterhin an zwei Terminen Blätter (30 Blätter pro Parzelle) gesammelt, um die Etablierung der BCAs, den Einfluss der vorangegangenen Fungizidbehandlungen auf die Etablierung der BCAs sowie den Einfluss der Behandlungen auf die indigenen Mikroorganismen zu untersuchen. Die ersten Blattproben wurden vor der ersten BCA-Applikation zu BBCH 55-57 und die zweiten nach vier Behandlungsterminen zu BBCH 67-71 entnommen. Die Herstellung der Blattextrakte und die Bestimmung der Lebendkeimzahlen von Bakterien, Pilzen, Endosporen-formenden Bakterien und *Aureobasidium* erfolgten wie im Freilandversuch 2012 (siehe Kapitel 2.3.2).

Das verbleibende Volumen der Blattextrakte wurde wie in Kapitel 2.3.2. beschrieben ebenfalls für die molekularbiologischen Untersuchungen bearbeitet und bis zum Beginn der molekularbiologischen Untersuchungen (siehe Kapitel 2.3.4.) bei -20°C gelagert.

2.3.4. Vertiefung der molekularbiologischen Arbeiten

Anmerkung

Die Proben aus dem Freilandversuch 2011 (Projekt: FZK 06OE354) wurden im Winter 2012 zusammen mit den Proben aus dem Freilandversuch 2012 bearbeitet. Somit werden die entsprechenden molekularbiologischen Arbeiten zum Freilandversuch 2011 ebenfalls in diesem Abschnitt bzw. in diesem Bericht vorgestellt.

Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten

Für die Freilandversuche 2011 und 2012 wurden die molekularbiologischen Arbeiten für ausgewählte Versuchsglieder durchgeführt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht der Blattproben für die molekularbiologischen Arbeiten 2011 und 2012

Versuchsglied	Behandlung	Anzahl Wiederholungen	Probenahme-terme
VG 01	Kontrolle (Wasser)	4	BBCH 60, 73, 93
VG 03	BoniProtect [®] forte	4	BBCH 60, 73, 93
VG 07	Boniprotect [®] forte + Naturalis [®]	4	BBCH 60, 73, 93

Für den Freilandversuch 2013 wurden die molekularbiologischen Arbeiten für alle Versuchsglieder an beiden Probenahmeterminen durchgeführt (Tabelle 10). Die Proben aus 2013 wurden im Rahmen einer Masterarbeit (Pauli 2013) bearbeitet.

Tabelle 10: Übersicht der Blattproben für die molekularbiologischen Arbeiten 2013

VG	Behandlung mit	Anzahl Wiederholungen	Probenahme-temine
VG01	Wasser	4	BBCH 55-57, BBCH 67-71
VG02	RhizoVital [®] 42 fl. (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	4	BBCH 55-57, BBCH 67-71
VG03	BoniProtect [®] forte (<i>A. pullulans</i>)	4	BBCH 55-57, BBCH 67-71
VG04	RhizoVital [®] 42 fl. + BoniProtect [®] forte	4	BBCH 55-57, BBCH 67-71
VG05	1x Signum [®] , 1x Switch [®] , 1x Teldor [®] + Ortiva [®] , Rhizovital [®] 42 fl. (3x)	4	BBCH 55-57, BBCH 67-71
VG06	1x Signum [®] , 1x Switch [®] , 1x Teldor [®] + Ortiva [®] , BoniProtect [®] forte (3x)	4	BBCH 55-57, BBCH 67-71
VG07	1x Signum [®] , 1x Switch [®] , 1x Teldor [®] + Ortiva [®] , Rhizovital [®] 42 fl.+ BoniProtect [®] forte (3 x)	4	BBCH 55-57, BBCH 67-71
VG08	1x Signum [®] , 1x Switch [®] , 1x Teldor [®] + Ortiva [®]	4	BBCH 55-57, BBCH 67-71

Die gefrorenen Blattextrakte wurden aufgetaut und erneut zentrifugiert. Aus den Pellets wurde die DNA isoliert (PowerSoil[®] DNA Isolation Kit, Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland). Fragmente des ITS rRNA (~400bp) und 16S rRNA (~450 bp) Gens wurden anschließend unter Verwendung der universellen Primer-Paare ITS1 und ITS2 (Buée et al. 2009) sowie 27F und 337R (Hamp et al. 2009) mittels PCR amplifiziert. Die Primer sind hierbei zuvor durch Einfügen der Key-Primer A (CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA) und B (CTATGCGCCTTGCCAGCC CGC), einer Schlüsselsequenz (TCAG) sowie einer proben-spezifischen Sequenz (MID) für die 454 Pyrosequenzierung modifiziert worden.

Im Anschluss an die PCR wurden jeweils 4 µl jedes PCR-Produktes auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen und mittels Gelelektrophorese auf Vorhandensein von 400 bp bzw. 450 bp großen DNA-Fragmenten untersucht. Die ITS rRNA - und 16S rRNA - PCR-Produkte wurden aufgereinigt (HiYield PCR Clean-up/Gel Extraction Kit, Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland), bevor diese zu äquimolaren Konzentrationen gepoolt wurden. Die beiden Pools aus PCR-Produkten wurden für die Durchführung der 454-Pyrosequenzierung an ein kommerzielles Labor (LGC Genomics GmbH, Berlin) gesendet. Die ITS rRNA - und die 16S rRNA - PCR-Produkte wurden hier jeweils auf verschiedenen 1/16-Platten sequenziert.

Auswertung der 454-Pyrosequenzierung

Die bioinformatische Analyse der 454-Pyrosequenzierungsdaten wurde durch den bioinformatischen Service von LGC Genomics GmbH mittels QIIME vorgenommen.

Eine ausführliche Beschreibung der verschiedenen Schritte der bioinformatischen Analyse für die Blattproben aus den Freilandversuchen 2011 und 2012 ist der Publikation von Sylla et al. (2013) zu entnehmen. Diese trifft auch generell für die bioinformatische Analyse der Blattproben aus dem Freilandversuch 2013 zu, mit Ausnahme von: Auslassen des Denoising-Schrittes, da für die Generierung der Daten das Flow Pattern B verwendet wurde und ein Denoising hier nicht möglich war.

In Kürze zusammengefasst beinhaltet die bioinformatische Analyse der 454 Pyrosequenzierungsdaten u.a. die Zusammenfassung von Sequenzen mit einer Übereinstimmung von mindestens 97 % zu operational taxonomic units (OTUs). Für jedes OTU wurde eine repräsentative Sequenz gewählt. Die repräsentativen Sequenzen jedes OTUs wurden im Anschluss mit Referenzsequenzen aus einer Datenbank (Greengenes für 16S rRNA-Sequenzen, UNITE für ITS rRNA-Sequenzen) verglichen.

Die durch den bioinformatischen Service zur Verfügung gestellten Daten wurden anschließend für die Darstellung der Zusammensetzung der bakteriellen und pilzlichen Phyllosphären-Mikrobiota verwendet. Die Mikroorganismengemeinschaften zwischen verschiedenen Proben wurden mit Hilfe einer ANOSIM (analysis of similarity) in PAST (paleontological statistics software package, Version 2.17b) verglichen. Für alle Proben wurden der Shannon-Diversity-Index und der Chao1-Estimator (nur für die Proben aus 2011 und 2012) in PAST berechnet. Als Grundlage für die Berechnung der ANOSIM, des Shannon-Diversity Index und des Chao1 Estimators wurden OTUs auf Gattungsebene (L6) verwendet.

2.4. Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurde mit Statistica (Version 7.1) durchgeführt. Die Werte der Lebendkeimzahlbestimmungen wurden log-transformiert ($x' = \log(x+1)$), während die restlichen Werte nicht transformiert wurden.

Alle Daten wurden auf Normalverteilung getestet (Shapiro-Wilk-Test, $\alpha = 5\%$). Für den Vergleich zwischen den Behandlungen wurde entweder eine einfaktorielle Varianzanalyse

(normalverteilte Daten) oder eine nicht-parametrische Kruskal-Wallis-ANOVA (nicht normalverteilte Daten) durchgeführt ($\alpha =$ jeweils 5%). Im Falle von signifikanten Behandlungseffekten wurde ein Dunnett- oder Tukey-Test (normalverteilte Daten) oder multiple Vergleiche mittels Kruskal-Wallis-Test (nicht normalverteilte Daten) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Botrytis cinerea* im Gewächshaus

Ermittlung von Erntemengen und Fruchtbefall

Das mittlere Frischgewicht von gesunden Früchten lag in diesem Versuch zwischen 25,9 g und 38,5 g pro Pflanze, das Frischgewicht von *Botrytis*-Früchten zwischen 0,6 g und 3,8 g pro Pflanze. Signifikante Behandlungsunterschiede im Frischgewicht lagen weder bei den gesunden noch bei den *Botrytis*-Früchten vor. Es konnten auch keine Behandlungsunterschiede hinsichtlich der durchschnittlichen Anzahl gesunder bzw. mit *Botrytis* befallener Früchte pro Pflanze nachgewiesen werden (Abb. 5).

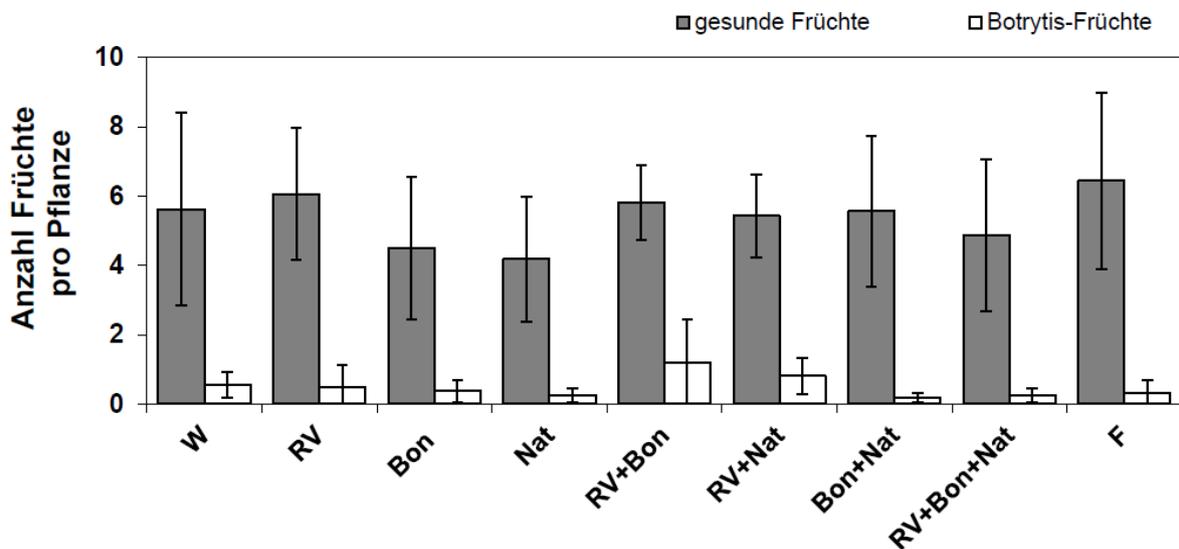


Abb. 5: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Anzahl der Früchte pro Pflanze. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte, Nat=Naturalis® und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (ANOVA, $\alpha = 5\%$).

Bestimmung des Graufäulebefalls an der Pflanze

Beim ersten Boniturtermin (BBCH 85) lag die Befallshäufigkeit von *B. cinerea* zwischen 3 % und 28 % (Abb. 6). Bei der zweiten (BBCH 87) und dritten Bonitur (BBCH 89) lag die mittlere Befallshäufigkeit von *B. cinerea* zwischen 9 % und 30 % bzw. zwischen 23 % und 34 %. Signifikante Unterschiede zur unbehandelten Wasserkontrolle konnten an keinem der Boniturtermine nachgewiesen werden. Somit erzielten weder die getesteten Behandlungen mit den BCAs bzw. BCA-Kombinationen noch die Behandlung mit den Fungiziden eine im Vergleich zur Wasserkontrolle ausreichende Wirkung gegenüber *B. cinerea*.

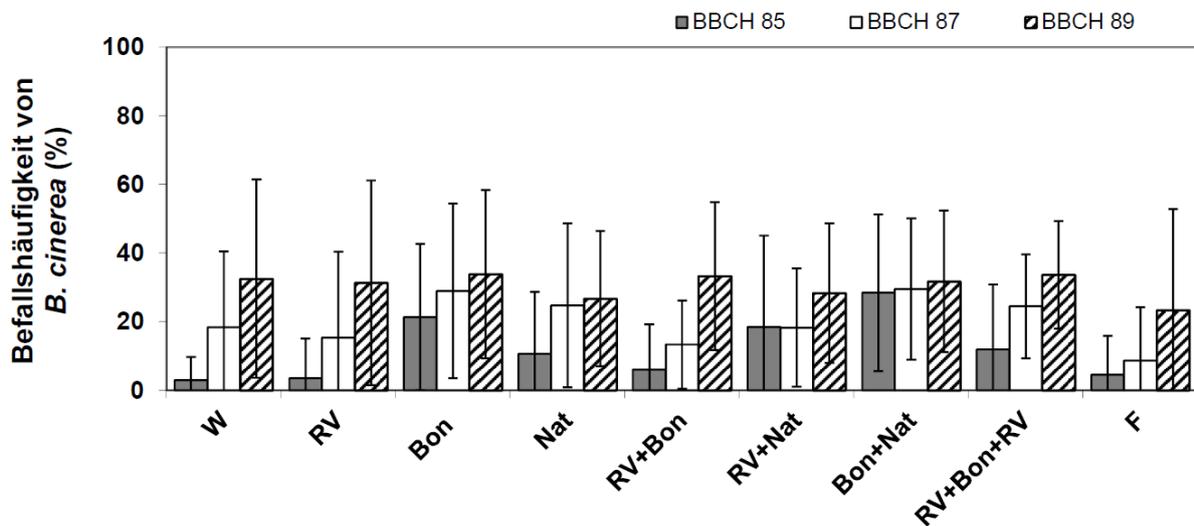


Abb. 6: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Befallshäufigkeit von *B. cinerea*. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=BoniProtect[®] forte, Nat=Naturalis[®] und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (ANOVA oder Kruskal-Wallis-ANOVA, $\alpha = 5 \%$).

Bestimmung des Graufäulebefalls während der Lagerung

Im Lagerversuch konnte nach zweitägiger Lagerung kein Graufäulebefall festgestellt werden. Der mittlere Befall der Früchte mit *B. cinerea* lag nach einer vier- und sechstägigen Lagerung zwischen 0 % und 28 % bzw. zwischen 15 % und 57 %. Der *Botrytis*-Befall nahm von sechstägiger auf siebentägiger Lagerung nicht mehr zu. In diesem Versuch konnten keinerlei signifikante Behandlungsunterschiede nachgewiesen werden, d.h. neben den BCAs reduzierte auch die klassische Behandlungsfolge mit den Fungiziden die Graufäuleentwicklung an gelagerten Früchten im Vergleich zur Wasserkontrolle nicht (Abb. 7).

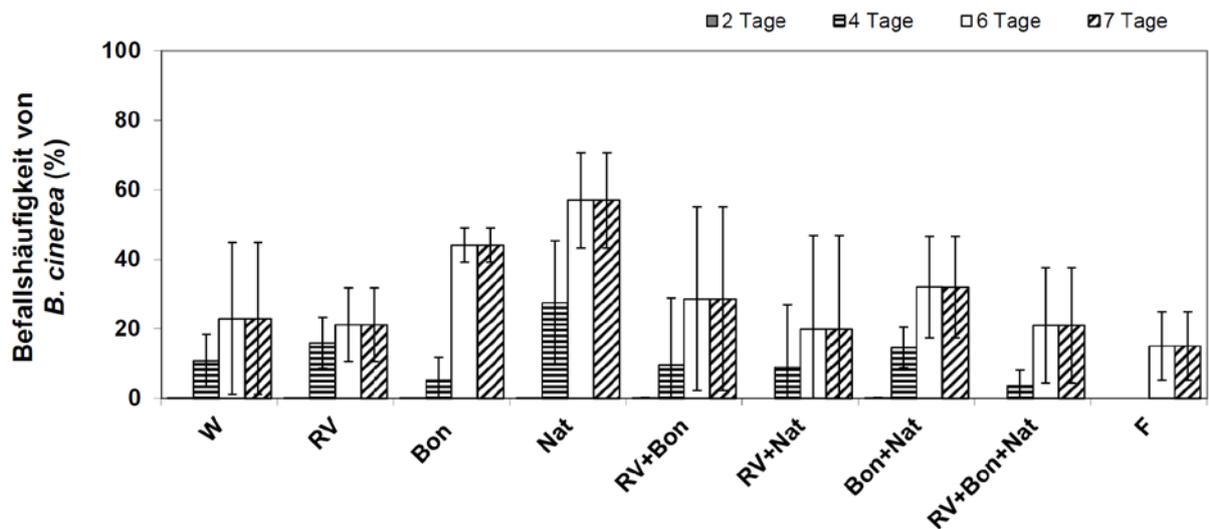


Abb. 7: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf den Graufäulebefall von Früchten während der Lagerung. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=BoniProtect[®] forte, Nat=Naturalis[®] und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (ANOVA oder Kruskal-Wallis-ANOVA, jeweils $\alpha = 5\%$).

Erfassung der Nichtzielorganismen

Die Erfassung des Mehltaubefalls an zwei Terminen ergab, dass der mittlere Befall der Pflanzen mit Echtem Mehltau bei allen Versuchsgliedern unter 1,5 % lag. Aufgrund des insgesamt geringen Befalls und der großen Streuung der Daten wurde davon abgesehen, die Daten statistisch auszuwerten.

3.2. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Podosphaera aphanis* im Gewächshaus

Der Befall mit Echtem Mehltau war trotz Inokulation der Versuchspflanzen mit dem Erreger insgesamt sehr gering (Abb. 8). In der Wasserkontrolle wurden im Durchschnitt nur 0,3 Mehltaukolonien pro Pflanze beobachtet. Bei drei der insgesamt acht Versuchsglieder waren keine Kolonien des Echten Mehltaus zu erkennen. Aufgrund des insgesamt sehr geringen Befalls der Pflanzen wurde bei diesem Versuch davon abgesehen, die Daten statistisch auszuwerten.

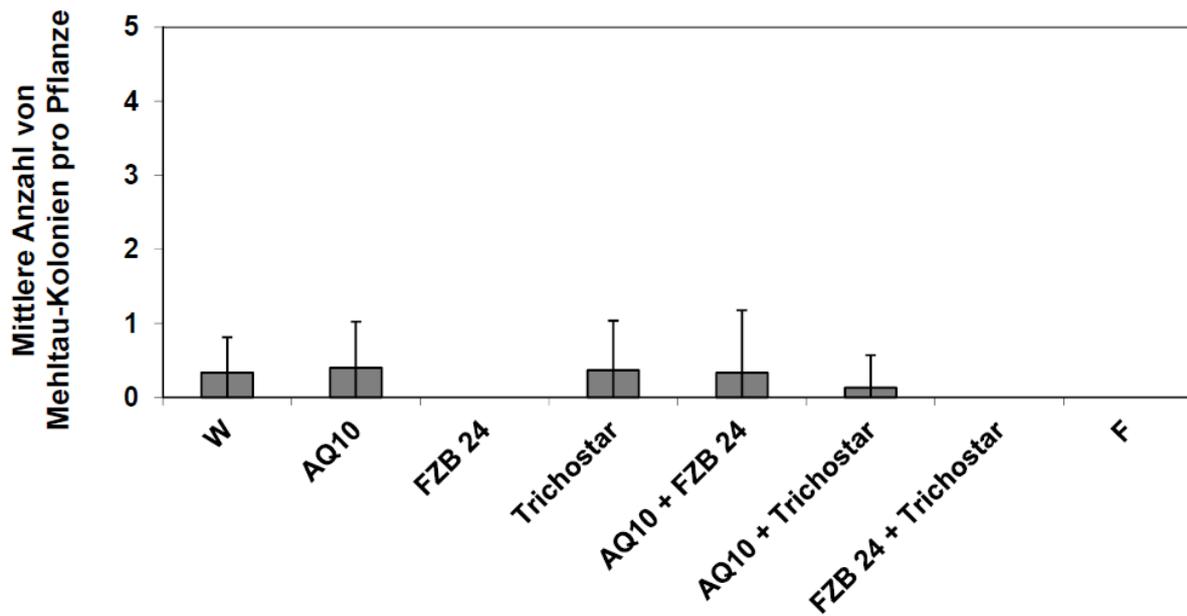


Abb. 8: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf den Befall der Pflanzen mit Echtem Mehltau. Die Kontrollbehandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

3.3. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Botrytis cinerea* im Freiland (2012)

Ermittlung von Erntemengen und Fruchtbefall

Im Freilandversuch 2012 lag der mittlere Ertrag pro Pflanze zwischen 266,3 g und 358,1 g. Der mittlere Ausfall an Botrytisfrüchten beim Erntegut lag bei allen Versuchsgliedern unter 8 % (Abb. 9) und unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Behandlungen (Kruskal-Wallis-ANOVA: $p=0,183$).

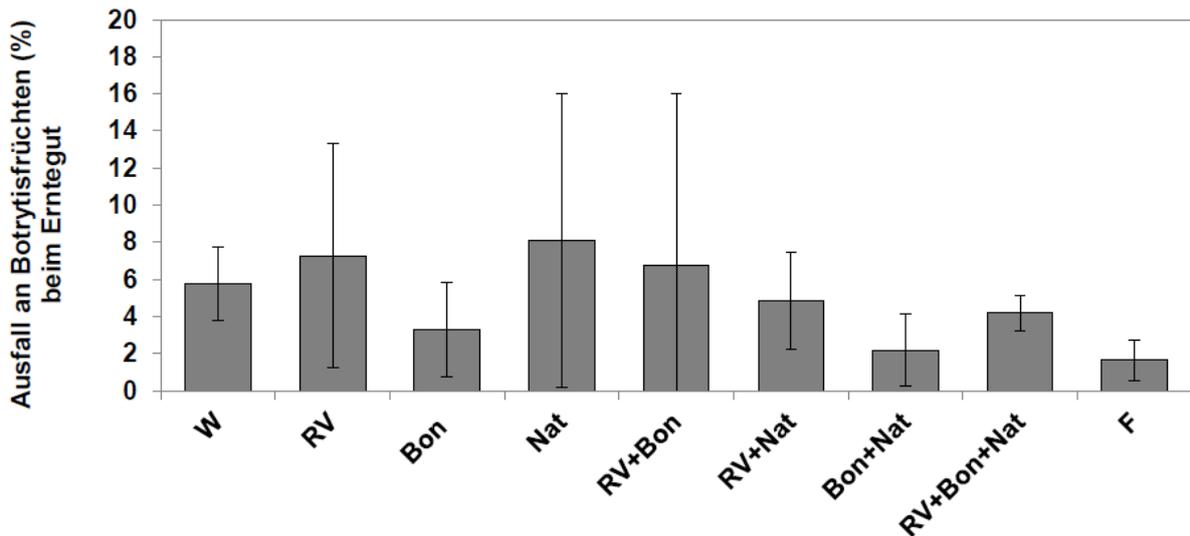


Abb. 9: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf den Ausfall an Botrytisfrüchten beim Erntegut. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=BoniProtect[®] forte, Nat=Naturalis[®] und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (Kruskal-Wallis-ANOVA, jeweils $\alpha = 5\%$).

Bestimmung des Graufäulebefalls an der Pflanze

Der Graufäulebefall an den Pflanzen war beim ersten Boniturtermin (BBCH 89) sehr gering und lag zwischen 0,3 % und 1,7 % (Abb. 10). Zu diesem Termin gab es keine signifikanten Behandlungsunterschiede (Kruskal-Wallis-ANOVA: $p=0,091$). Beim zweiten Boniturtermin (BBCH 91) lag der Befall der Pflanzen mit *B. cinerea* zwischen 8,9 % und 26,9 %. Zu diesem Zeitpunkt reduzierten Behandlungen mit RhizoVital[®] 42 fl. + BoniProtect[®] forte, RhizoVital[®] 42 fl. + Naturalis[®] sowie mit Fungiziden den Graufäulebefall an der Pflanze im Vergleich zur Wasserkontrolle (23,6 %) signifikant. Beim dritten Boniturtermin (BBCH 92) lag der mittlere *Botrytis*-Befall bereits zwischen 61,0 % und 78,4 %. An diesem Termin konnte nur noch die Behandlung mit der klassischen Fungizidspritzfolge den Graufäulebefall im Vergleich zur Wasserkontrolle signifikant reduzieren (Kruskal-Wallis-Test: $p=0,032$), während keine der BCA-Behandlungen signifikante Befallsreduktionen erzielte, vermutlich aufgrund des inzwischen sehr hohen Befalls der Pflanzen mit *B. cinerea*.

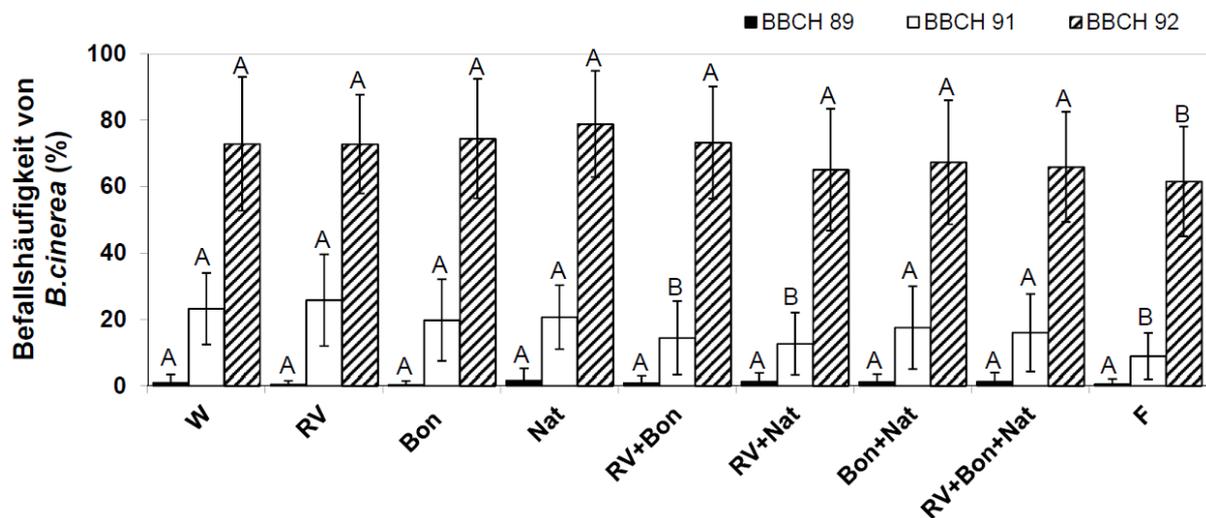


Abb. 10: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Befallshäufigkeit von *B. cinerea* an der Pflanze. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte, Nat=Naturalis® und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Versuchsglieder, die einen anderen Buchstaben als die Wasserbehandlung aufweisen, unterscheiden sich zum entsprechenden BBCH-Stadium signifikant von der Wasserkontrolle (Kruskal-Wallis-ANOVA, jeweils $\alpha = 5\%$).

Bestimmung des Graufäulebefalls während der Lagerung

Im ersten Lagerversuch lag insgesamt ein moderater Befall der Früchte mit *B. cinerea* vor (Abb. 11). Nach einer zweitägigen Lagerung der Erdbeeren lag die Befallshäufigkeit von *B. cinerea* zwischen 0 % und 4,2 %. Nach einer vier- bzw. sechstägigen Lagerung lag diese bereits zwischen 4,2 % und 12,5 % bzw. 13,3 % und 27,5 %. Nach sieben Tagen der Lagerung stieg der Graufäulebefall auf 13,3 % bis 32,5 % an. Allerdings konnte an keinem der Auswertungszeitpunkte ein signifikanter Behandlungseffekt nachgewiesen werden.

Im zweiten Lagerversuch war der Graufäulebefall an den gelagerten Früchten insgesamt höher als im ersten Lagerversuch (Abb. 12). Bereits nach zwei Tagen der Lagerung lag der Botrytisbefall bei den mit Wasser behandelten Früchten bei 16,7 %, bei den übrigen Versuchsgliedern zwischen 4,3 % und 14,0 %. Nach einer vier- und sechstägigen Lagerung lag der Graufäulebefall bei allen Versuchsgliedern zwischen 25,0 % und 40,2 % bzw. zwischen 40,6 % und 65,4 %. Am letzten Auswertungszeitpunkt, d.h. nach siebentägiger Lagerung, erreichte der *Botrytis*-Befall 42,3 % bis 72,1 %. Wie auch beim ersten Lagerversuch, konnten zu allen Auswertungsterminen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen ermittelt werden.

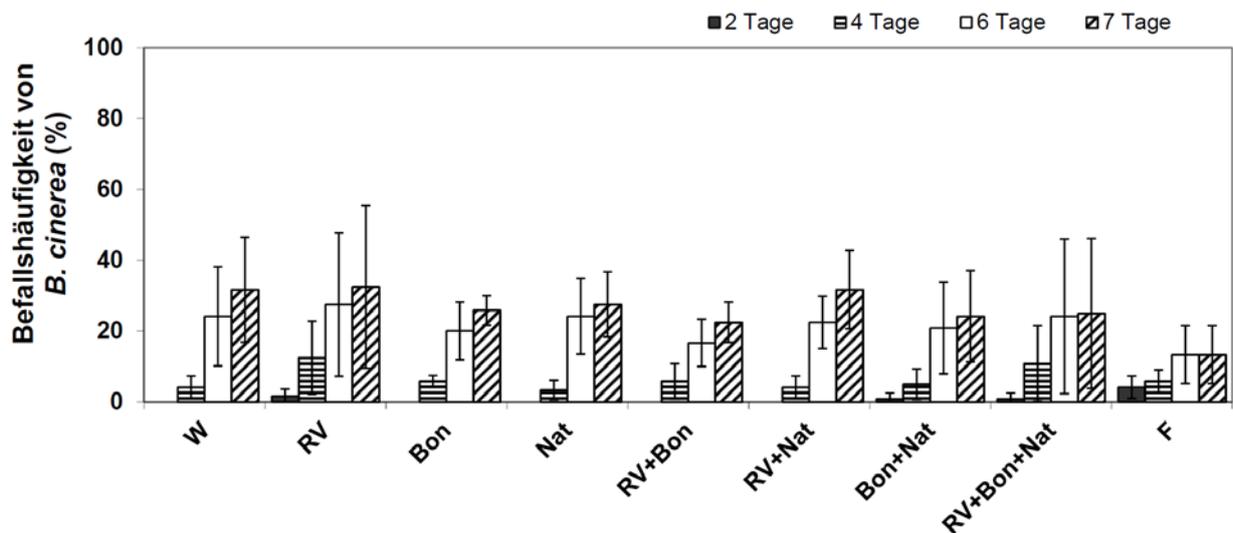


Abb. 11: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf den Graufäulebefall von Früchten während der Lagerung (1. Lagerversuch). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=BoniProtect[®] forte, Nat=Naturalis[®] und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (ANOVA oder Kruskal-Wallis-ANOVA, jeweils $\alpha = 5\%$).

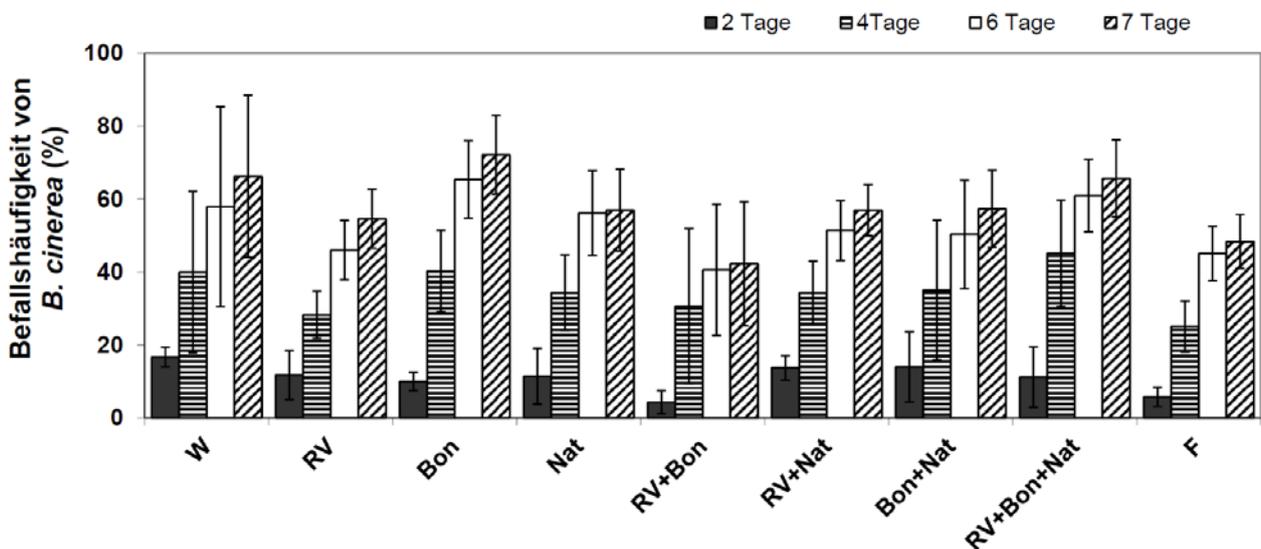


Abb. 12: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf den Graufäulebefall von Früchten während der Lagerung (2. Lagerversuch). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=BoniProtect[®] forte, Nat=Naturalis[®] und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (ANOVA oder Kruskal-Wallis-ANOVA, jeweils $\alpha = 5\%$).

Nichtzielorganismen

Im Versuch 2012 wies ein Großteil der hinsichtlich des Befalls mit dem Erdbeerblütenstecher untersuchten Pflanzen abgeknickte Blüten auf: im Durchschnitt waren zwischen 77,5 % und 90 % der untersuchten Pflanzen von *A. rubi* befallen. Signifikante Einflüsse der verschiedenen Behandlungen auf das Auftreten des Erdbeerblütenstechers konnten nicht nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-ANOVA: $p = 0,679$). Die Erfassung des Spinnmilbenbefalls mittels Milbenwaschmethode ergab, dass die mittlere Anzahl an Spinnmilben bei allen Versuchsgliedern zwischen 3,5 und 14,5 lag. Zwischen den Behandlungen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (ANOVA: $p = 0,559$).

Lebendkeimzahlbestimmungen

Die wichtigsten Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmungen des Freilandversuches 2012 sind in den Abb. 13 bis 20 dargestellt. Nach vier BCA-Behandlungen (BBCH 73) waren die Gesamtkeimzahlen der Bakterien (Abb. 13) sowie die Keimzahlen von Endosporenformenden Bakterien (Abb. 14) auf Blättern, die mit RhizoVital[®] 42 fl. (*B. amyloliquefaciens* FZB42) einzeln oder in Kombination mit einem anderen BCA-Präparat behandelt wurden, im Vergleich zur Wasserkontrolle signifikant erhöht. Die Gesamtkeimzahlen der Pilze waren auf Blättern, die mit den BCA-Kombinationen RhizoVital[®] 42 fl. + Naturalis[®], BoniProtect[®] forte + Naturalis[®] und RhizoVital[®] 42 fl. + BoniProtect[®] forte + Naturalis[®] behandelt wurden, signifikant erhöht (Abb. 15). Hingegen konnten *Aureobasidium* (Abb. 16) sowie *Beauveria* (Abb. 17) auf entsprechend behandelten Blättern nicht in signifikant höheren Keimzahlen detektiert werden.

Neben einem erwarteten Anstieg der Gesamtkeimzahlen von Bakterien sowie der Keimzahlen von Endosporenformenden Bakterien in entsprechend behandelten Blattproben konnte kein deutlicher Effekt der BCA-Behandlungen auf die natürliche Mikrobiota der Phyllosphäre mittels Lebendkeimzahlbestimmung nachgewiesen werden.

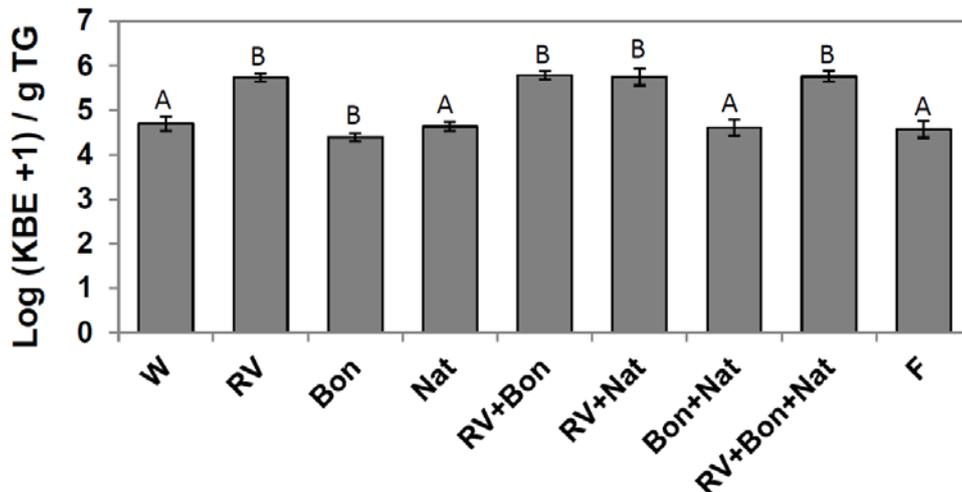


Abb. 13: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Gesamtkeimzahlen von Bakterien auf Blättern unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen nach viermaliger BCA-Applikation (BBCH 73). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=BoniProtect[®] forte, Nat=Naturalis[®] und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Versuchsglieder, die einen anderen Buchstaben als die Wasserbehandlung aufweisen, unterscheiden sich signifikant von der Wasserkontrolle (Dunnett-Test, $\alpha = 5\%$).

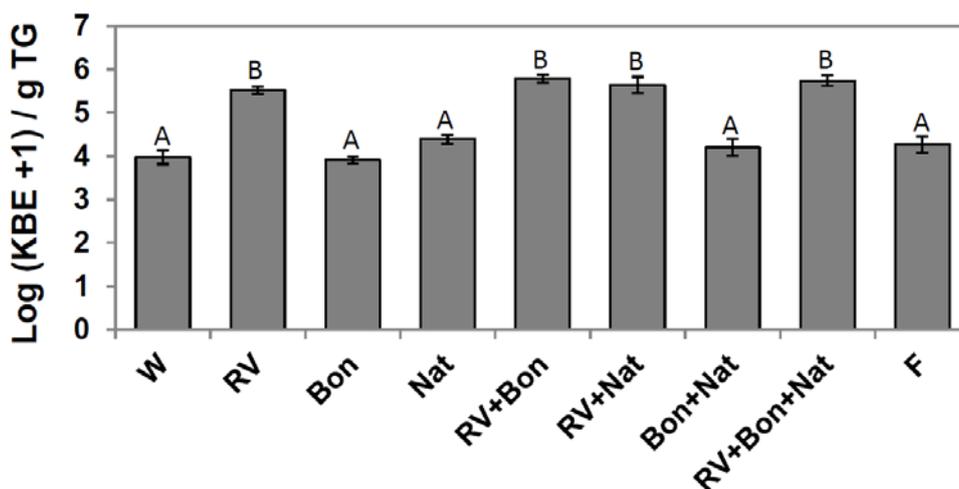


Abb. 14: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Lebendkeimzahlen von Endosporen-formenden Bakterien auf Blättern unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen nach viermaliger BCA-Applikation (BBCH 73). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=BoniProtect[®] forte, Nat=Naturalis[®] und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Versuchsglieder, die einen anderen Buchstaben als die Wasserbehandlung aufweisen, unterscheiden sich signifikant von der Wasserkontrolle (Kruskal-Wallis-Test, $\alpha = 5\%$).

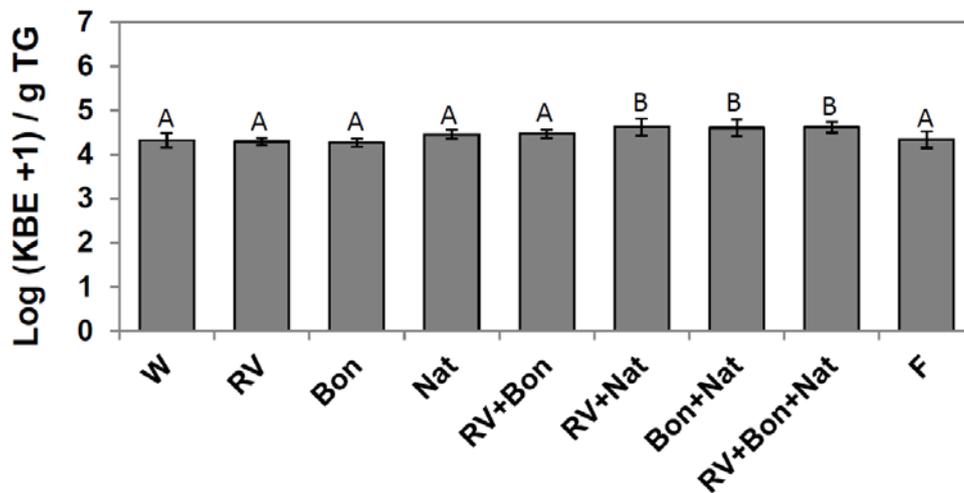


Abb. 15: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Gesamtkeimzahlen von Pilzen auf Blättern unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen nach viermaliger BCA-Applikation (BBCH 73). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte, Nat=Naturalis® und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Versuchsglieder, die einen anderen Buchstaben als die Wasserbehandlung aufweisen, unterscheiden sich signifikant von der unbehandelten Kontrolle (Dunnnett-Test, $\alpha = 5 \%$).

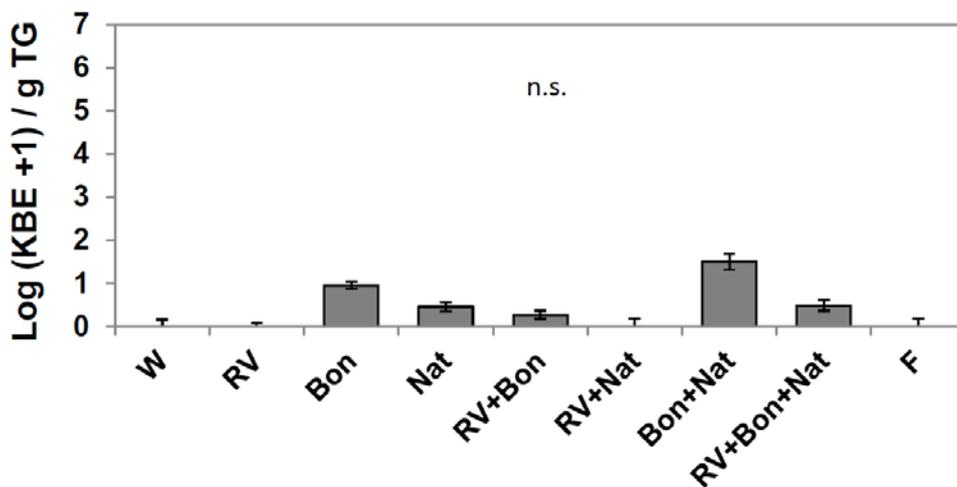


Abb. 16: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Lebendkeimzahlen von *Aureobasidium* auf Blättern unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen nach viermaliger BCA-Applikation (BBCH 73). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte, Nat=Naturalis® und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (Kruskal-Wallis-ANOVA, $\alpha = 5 \%$).

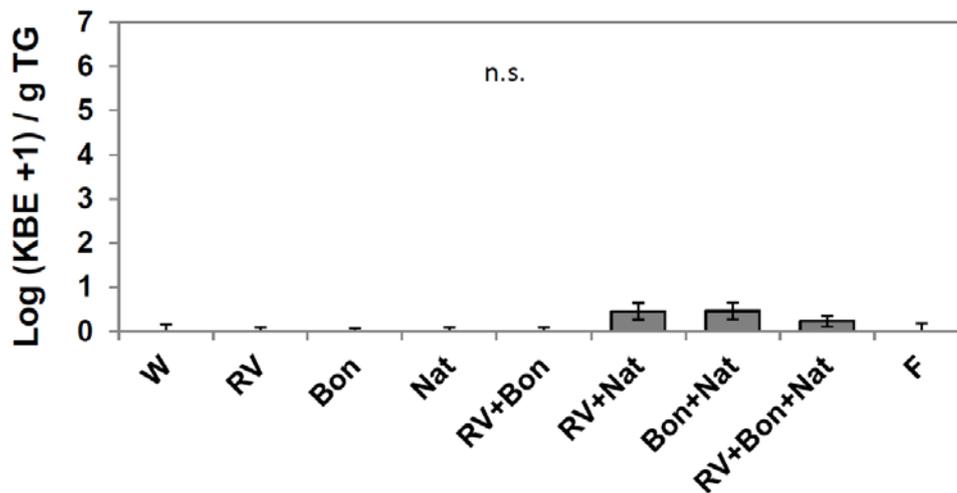


Abb. 17: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Lebendkeimzahlen von *Beauveria* auf Blättern unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen nach viermaliger BCA-Applikation (BBCH 73). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®]42 fl., Bon=BoniProtect[®]forte, Nat=Naturalis[®] und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (Kruskal-Wallis-ANOVA, $\alpha = 5\%$).

Vier Wochen nach der letzten BCA-Behandlung, d.h. zu BBCH 93, waren die Keimzahlen von Endosporen-formenden Bakterien in allen Versuchsgliedern insgesamt sehr niedrig, auch in denen, die zuvor mit RhizoVital[®]42 fl. behandelt wurden (Abb. 18). In den meisten Blattproben, die zuvor mit BoniProtect[®]forte allein oder in Kombination mit einem anderen BCA-Präparat behandelt wurden, waren die Keimzahlen von *Aureobasidium* ebenfalls sehr gering (Abb. 19). *Aureobasidium* konnte lediglich auf Blättern, die vier Wochen zuvor mit RhizoVital[®]42 fl. + BoniProtect[®]forte behandelt wurden, in signifikant höheren Keimzahlen nachgewiesen werden als in den wasserbehandelten Kontrollblättern (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,024$). Die Keimzahlen von *Beauveria* waren auch zu BBCH 93 in allen Blattproben sehr niedrig (Abb. 20). Signifikante Unterschiede konnten zwischen den Behandlungen nicht festgestellt werden (Kruskal-Wallis-ANOVA: $p = 0,530$).

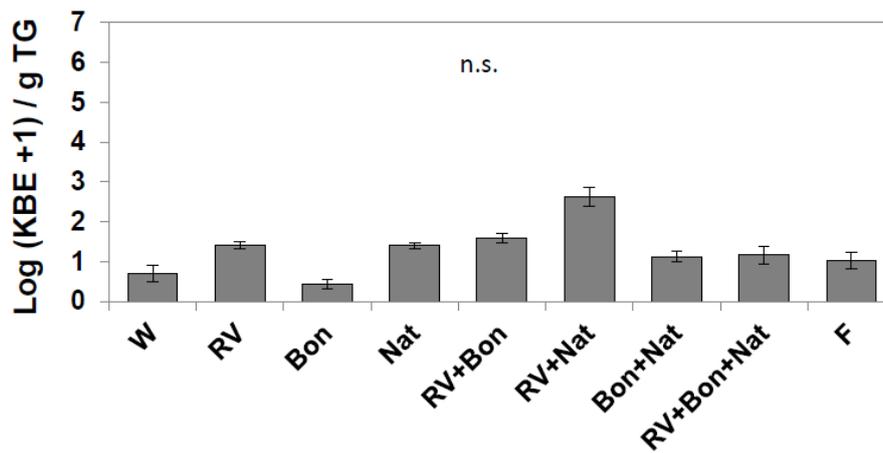


Abb. 18: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Lebendkeimzahlen von Endosporen-formenden Bakterien auf Blättern unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen vier Wochen nach letzter BCA-Applikation (BBCH 93). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=BoniProtect[®] forte, Nat=Naturalis[®] und F=Fungizide. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (Kruskal-Wallis-ANOVA, $\alpha = 5\%$).

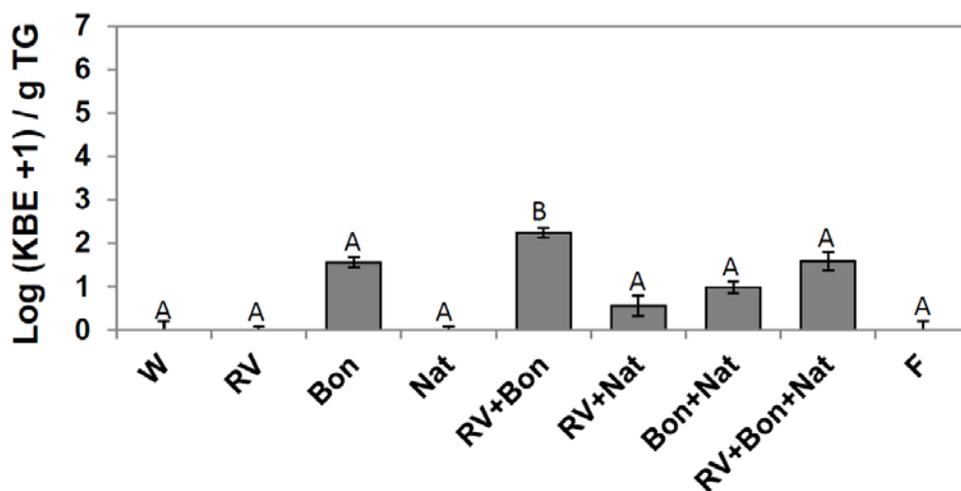


Abb. 19: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Lebendkeimzahlen von *Aureobasidium* auf Blättern unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen vier Wochen nach letzter BCA-Applikation (BBCH 93). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=BoniProtect[®] forte, Nat=Naturalis[®] und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Versuchsglieder, die einen anderen Buchstaben als die Wasserbehandlung aufweisen, unterscheiden sich signifikant von der unbehandelten Kontrolle (Kruskal-Wallis-Test, $\alpha = 5\%$).

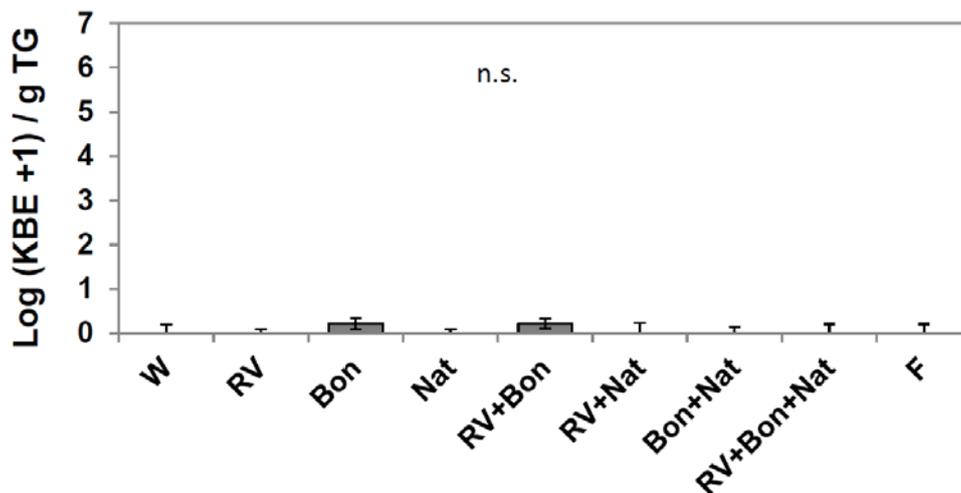


Abb. 20: Einfluss von Behandlungen mit BCAs und BCA-Kombinationen auf die Lebendkeimzahlen von *Beauveria* auf Blättern unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen vier Wochen nach letzter BCA-Applikation (BBCH 93). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte, Nat=Naturalis® und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (Kruskal-Wallis-ANOVA, $\alpha = 5 \%$).

3.4. Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegen *Botrytis cinerea* im Integrierten Anbau von Erdbeeren (2013)

Ermittlung von Erntemengen und Fruchtbefall

Der mittlere Ertrag pro Pflanze lag im Freilandversuch 2013 zwischen 534,5 g und 684,1 g. In diesem Jahr betrug der Ausfall an Botrytisfrüchten beim Erntegut zwischen 1,7 % und 4,1 % (Abb. 21). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungen festgestellt werden (ANOVA: $p=0,517$).

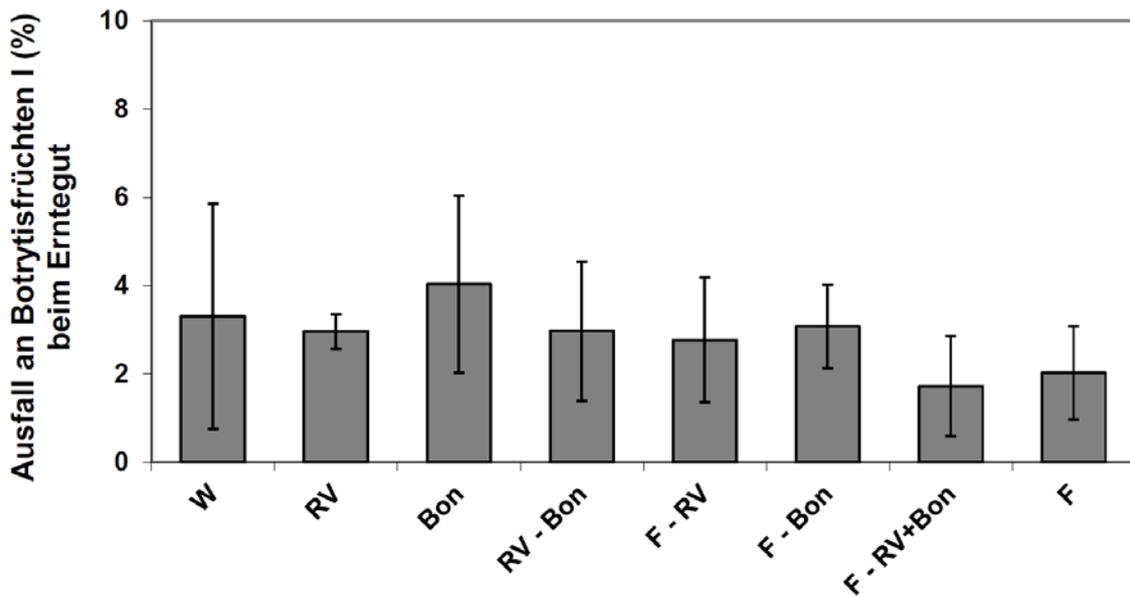


Abb. 21: Einfluss von Behandlungen mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden mit anschließenden BCA-Behandlungen auf den Ausfall an Botrytisfrüchten beim Erntegut. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (Kruskal-Wallis-ANOVA, jeweils $\alpha = 5\%$).

Bestimmung des Graufäulebefalls an der Pflanze

Der Graufäulebefall an der Pflanze lag beim ersten Boniturtermin (BBCH 91) im Versuchsjahr 2013 zwischen 2,1 % und 6,3 % und war damit insgesamt sehr gering (Abb. 22). Dennoch lag zu diesem Zeitpunkt in den mit Fungiziden (F) sowie in den mit Fungiziden plus RhizoVital® 42 fl. + BoniProtect® forte (F – RV+Bon) behandelten Parzellen ein im Vergleich zur Wasserkontrolle signifikant geringerer Befall durch *B. cinerea* vor. Die wirksamen Behandlungen (F sowie F – RV+Bon) unterschieden sich hierbei nicht signifikant hinsichtlich des Graufäulebefalls.

Beim zweiten Boniturtermin (BBCH 92) lag der Befall der Pflanzen mit *B. cinerea* bei allen Versuchsgliedern zwischen 20,2 % und 57,9 %. Zu diesem Zeitpunkt reduzierten Behandlungen mit den Fungiziden (F), den Fungiziden plus RhizoVital® 42 fl. (F – RV) sowie den Fungiziden plus RhizoVital® 42 fl. + BoniProtect® forte (F – RV+Bon) den Graufäulebefall an der Pflanze im Vergleich zur Wasserkontrolle (47,1%) signifikant. Hierbei war der Befall mit *B. cinerea* in Parzellen, die mit Fungiziden plus RhizoVital® 42 fl. + BoniProtect® forte (F – RV+Bon) tendenziell geringer (20,2 %) als in Parzellen, die lediglich mit den Fungiziden behandelt wurden (30,1 %). Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

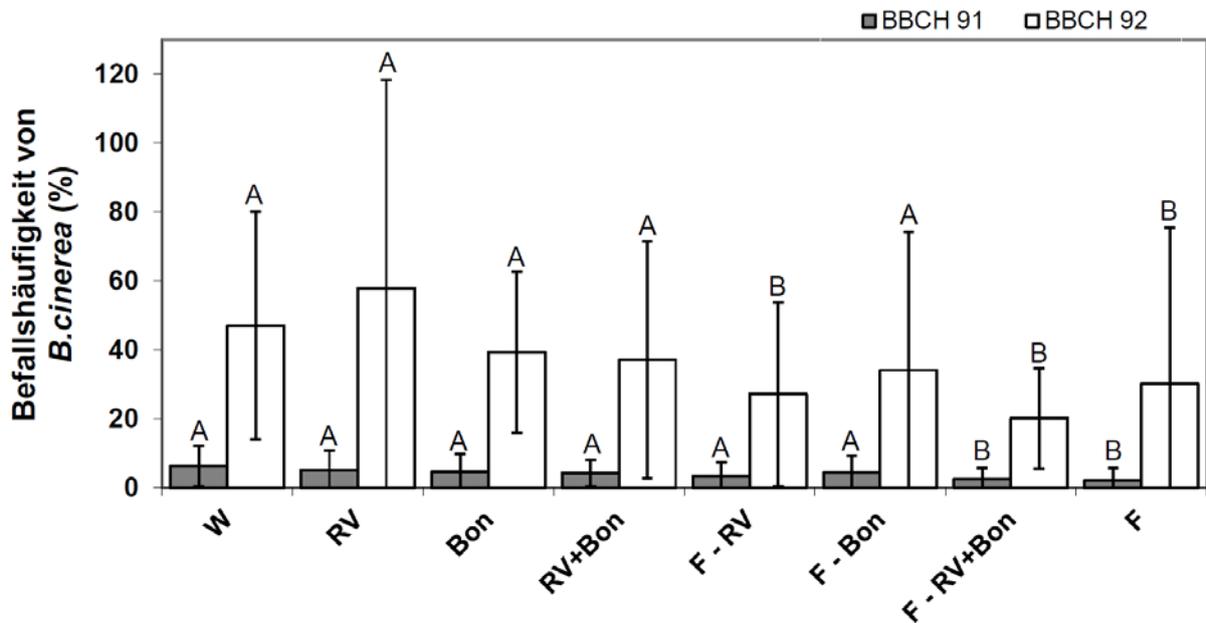


Abb. 22: Einfluss von Behandlungen mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden mit anschließenden BCA-Behandlungen auf die Befallshäufigkeit von *B. cinerea* an der Pflanze. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Versuchsglieder, die einen anderen Buchstaben als die Wasserbehandlung aufweisen, unterscheiden sich zum entsprechenden BBCH-Stadium signifikant von der Wasserkontrolle (Kruskal-Wallis-Test, jeweils $\alpha = 5\%$).

Bestimmung des Graufäulebefalls während der Lagerung

Im ersten Lagerversuch des Freilandversuches 2013 lag der Graufäulebefall nach einer zweitägigen Lagerung der Erdbeeren zwischen 0 % und 2,5 % (Abb. 23). Nach vier bzw. sechs Tagen Lagerung waren bereits 18,3 % bis 34,2 % bzw. 33,3 % bis 51,7 % der gelagerten Früchte mit *B. cinerea* befallen. Nach einer siebentägigen Lagerung reichte der Graufäulebefall von 39,2 % bis 52,5 %. An allen Auswertungszeitpunkten lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungen hinsichtlich der Graufäuleentwicklung vor.

Im zweiten Lagerversuch erreichte der Botrytisbefall an gelagerten Früchten nach zwei Tagen Lagerung 0,0% bis 5,0 % und nach vier Tagen Lagerung 5,0 % bis 38,3 % (Abb. 24). Nach sechs- bzw. siebentägiger Lagerung der Früchte lag der Graufäulebefall zwischen 43,3 % und 70,0 bzw. zwischen 55,0 % und 79,2 %. Auch bei diesem Lagerversuch konnten keinerlei Behandlungseffekte nachgewiesen werden.

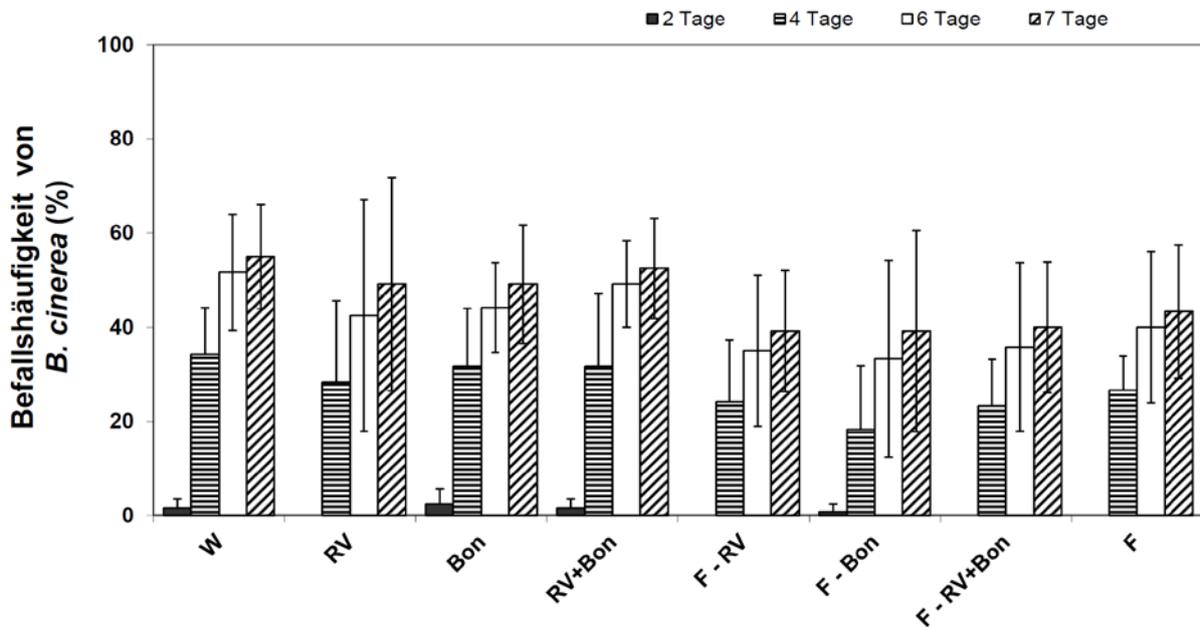


Abb. 23: Einfluss von Behandlungen mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden mit anschließenden BCA-Behandlungen auf den Graufäulebefall von Früchten während der Lagerung (1. Lagerversuch). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (ANOVA oder Kruskal-Wallis ANOVA, jeweils $\alpha = 5\%$).

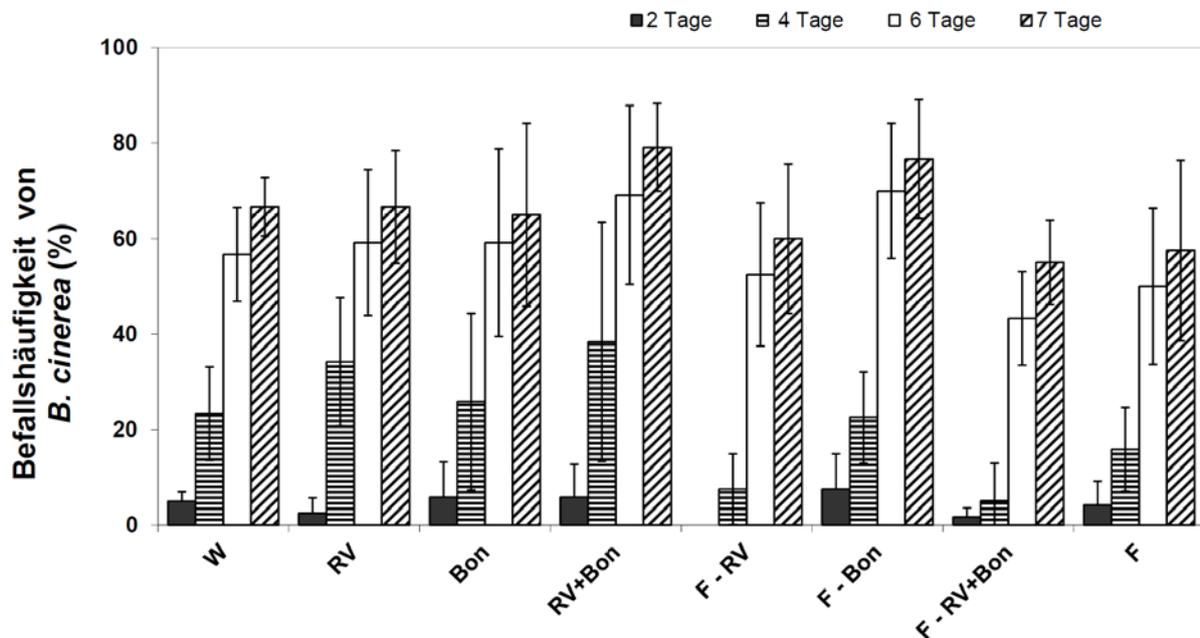


Abb. 24: Einfluss von Behandlungen mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden mit anschließenden BCA-Behandlungen auf den Graufäulebefall von Früchten während der Lagerung (2. Lagerversuch). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (ANOVA jeweils $\alpha = 5\%$).

Lebendkeimzahlbestimmungen

Die Lebendkeimzahlbestimmungen im Freilandversuch 2013 wurden im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt und ausgewertet (Pauli 2013). Die wichtigsten Ergebnisse daraus sind den Abb. 25 bis 28 zu entnehmen.

Nach insgesamt vier Behandlungen (BBCH 67-71) traten keine signifikanten Behandlungsunterschiede in den Gesamtkeimzahlen von Bakterien (Abb. 25) und Pilzen (Abb. 26) auf den Blättern auf. Hingegen waren die Lebendkeimzahlen von Endosporenformenden Bakterien (einschließlich Bacilli) auf Blättern, die mit RhizoVital[®]42 fl. behandelt waren, im Vergleich zur Wasserkontrolle und zu allen Blattproben, die nicht mit RhizoVital[®]42 fl. behandelt waren, signifikant erhöht (Abb. 27). Zwischen den Versuchsgliedern mit RhizoVital[®] fl.-Behandlungen traten dabei keine signifikanten Unterschiede in den Lebendkeimzahlen von Endosporenformenden Bakterien auf, obwohl die Ausbringung von RhizoVital[®]42 fl. bei den Versuchsgliedern mit Fungiziden und anschließender BCA-Behandlung nur einmal und nicht viermal (wie bei ausschließlicher BCA-Applikation) erfolgte. Überraschenderweise waren die Lebendkeimzahlen von Endosporenformenden Bakterien auch auf Blättern, die mit Fungiziden und anschließend mit BoniProtect[®] forte behandelt wurden und damit nicht mit RhizoVital[®]42 fl. behandelt wurden, signifikant höher als auf wasserbehandelten Blättern (Abb. 27).

Obwohl BoniProtect[®] forte in einigen Versuchsgliedern ausgebracht wurde, waren die Lebendkeimzahlen von *Aureobasidium* nach vier Behandlungsterminen nicht nur in den unbehandelten, sondern auch in den entsprechend behandelten Versuchsgliedern sehr gering (Abb. 28). Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgliedern hinsichtlich der *Aureobasidium*-Keimzahlen lagen nicht vor.

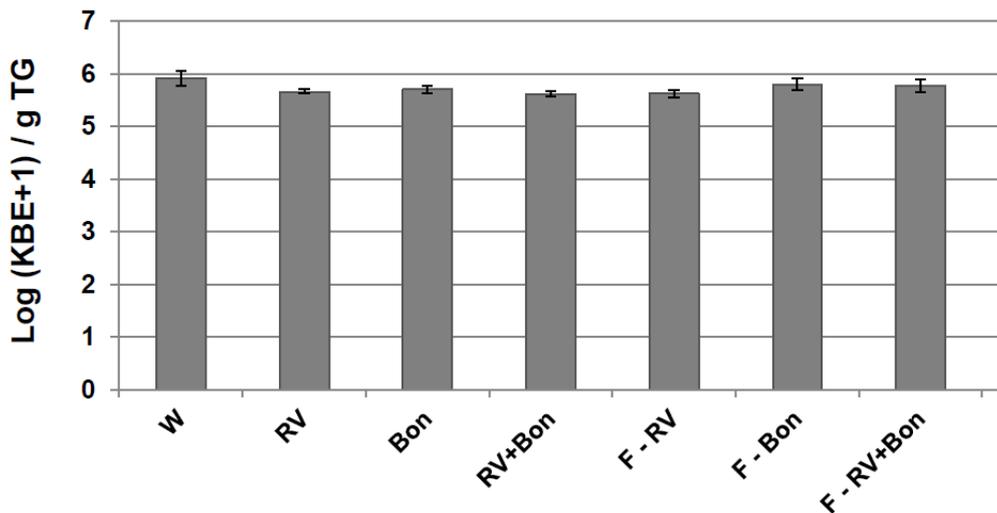


Abb. 25: Einfluss von Behandlungen mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden mit anschließenden BCA-Behandlungen auf die Gesamtkeimzahlen von Bakterien auf Blättern unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen nach vier Behandlungsterminen (BBCH 67-71). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=Boni-Protect[®] forte und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (ANOVA, $\alpha = 5\%$). Quelle: Pauli 2013 (modifiziert).

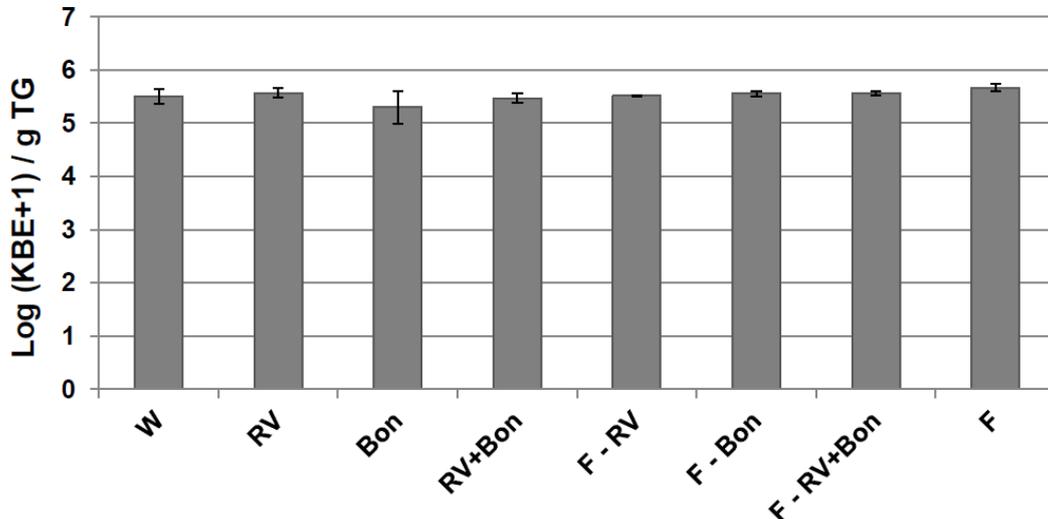


Abb. 26: Einfluss von Behandlungen mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden mit anschließenden BCA-Behandlungen auf die Gesamtkeimzahlen von Pilzen auf Blättern unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen nach vier Behandlungsterminen (BBCH 67-71). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=Boni-Protect[®] forte und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (ANOVA, $\alpha = 5\%$). Quelle: Pauli 2013 (modifiziert).

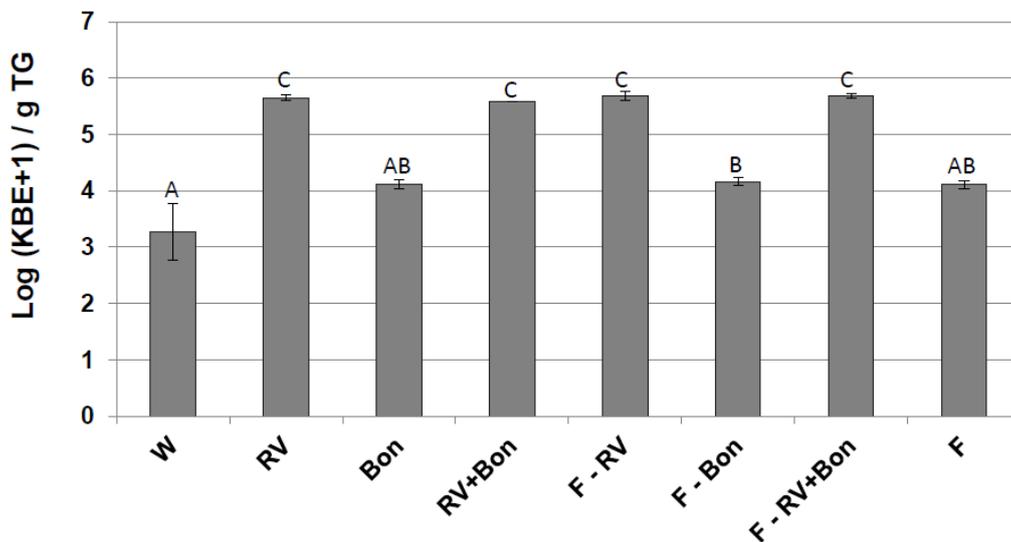


Abb. 27: Einfluss von Behandlungen mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden mit anschließenden BCA-Behandlungen auf die Lebendkeimzahlen von Endosporen-formenden Bakterien unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen nach vier Behandlungsterminen (BBCH 67-71). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Versuchsglieder mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (Tukey-Test, $\alpha = 5\%$). Quelle: Pauli 2013 (modifiziert).

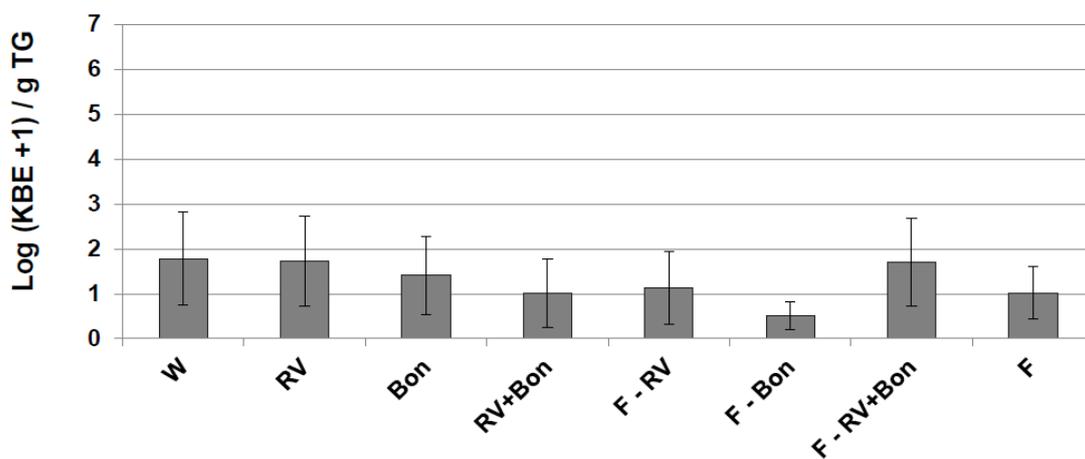


Abb. 28: Einfluss von Behandlungen mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden mit anschließenden BCA-Behandlungen auf die Lebendkeimzahlen von *Aureobasidium* unterschiedlich behandelter Erdbeerpflanzen nach vier Behandlungsterminen (BBCH 67-71). Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital® 42 fl., Bon=BoniProtect® forte und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen traten nicht auf (ANOVA, $\alpha = 5\%$). Quelle: Pauli 2013 (modifiziert).

3.5. Ergebnisse der 454 Pyrosequenzierung

3.5.1. Freilandversuche 2011 und 2012

Die ausführlichen Ergebnisse der 454 Pyrosequenzierung aus den Freilandversuchen 2011 und 2012 sind Sylla et al. (2013) zu entnehmen. Im vorliegenden Bericht sind die entsprechenden Ergebnisse zusammengefasst.

Die Durchführung der 454 Pyrosequenzierung hat ergeben, dass die Zusammensetzung der natürlich vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaften zwischen den Versuchsjahren 2011 und 2012 variierte, z.B. vor Beginn der BCA-Behandlungen (BBCH 60). Im Versuchsjahr 2011 repräsentierten beispielsweise die Gattungen *Cryptococcus* und *Cystofilobasidium* zu BBCH 60 die am häufigsten, natürlich vorkommenden Pilze in der Erdbeerphyllosphäre, dagegen war 2012 die relative Abundanz dieser Gattungen zum gleichen Wachstumsstadium geringer als 2011 (siehe Abb. 3 in Sylla et al. 2013). Zum Stadium BBCH 60 war bei den Bakterien die Gattung *Hymenobacter* im Jahr 2011 in der Erdbeerphyllosphäre dominant, während die relative Häufigkeit von *Hymenobacter* zum selben Wachstumsstadium im Jahr 2012 geringer war (siehe Abb. 5 in Sylla et al. 2013). Auch innerhalb der Vegetationsperiode traten Schwankungen in der Zusammensetzung der natürlich vorkommenden Mikroorganismen auf (Sylla et al. 2013).

Im Jahr 2011 führten die Behandlungen der Erdbeerpflanzen mit *A. pullulans* (BoniProtect[®] forte) allein oder in Kombination mit *B. bassiana* (Naturalis[®]) nach vier BCA-Behandlungsterminen (BBCH 73) zu einer im Vergleich zur Wasserkontrolle signifikanten unterschiedlichen Zusammensetzung der pilzlichen Gemeinschaften in der Phyllosphäre (ANOSIM: beide p-Werte < 0,027). Einzelapplikationen mit *A. pullulans* führten im Hinblick auf langfristige BCA-Effekte, d.h. auch vier Wochen nach der letzten Behandlung (BBCH 93), ebenfalls zu einer Veränderung in der Zusammensetzung der Pilzgemeinschaften (ANOSIM: p = 0,029). In den mit den BCAs behandelten Versuchsgliedern, die signifikante Effekte zeigten, war die mittlere relative Häufigkeit der Ordnung Dothideales im Vergleich zur Wasserkontrolle entsprechend erhöht (Tabelle 11). Gleichzeitig war die Abundanz der anderen Pilzordnungen in diesen Versuchsgliedern nicht wesentlich verringert, jedoch der Anteil an Gattungen mit einer relativen Häufigkeit von weniger als 1 % oder an OTUs, die nicht klassifiziert werden konnten, reduziert. Entsprechend war in den mit den BCAs

behandelten Versuchsgliedern die relative Abundanz von *Aureobasidium* (einer Gattung der Ordnung Dothideales) im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (Tukey-Test: alle p-Werte < 0,029). Zudem war zu BBCH 73 die pilzliche Diversität auf den mit *A. pullulans* bzw. *A. pullulans* + *B. bassiana* behandelten Blättern im Vergleich zur Wasserkontrolle signifikant reduziert (Tukey-Test: beide p-Werte < 0,027).

Tabelle 11: Relative Häufigkeit von Pilzordnungen in der Erdbeerphyllosphäre bestimmt durch die 454 Pyrosequenzierung nach BCA-Behandlungen an zwei verschiedenen Terminen (BBCH 73, BBCH 93) im Freilandversuch 2011. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, AP= *Aureobasidium pullulans* (Boniprotect® forte), AP/BB=*A. pullulans* + *Beauveria bassiana* (Naturalis®). Auszug aus Tabelle 2 (modifiziert) in Sylla et al. (2013).

Ordnung	BBCH 73 ^a						BBCH 93 ^b					
	W		AP		AP/BB		W		AP		AP/BB	
	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE	MW	SE
Filobasidiales	0,088	0,013	0,088	0,023	0,050	0,009	0,389	0,026	0,270	0,036	0,311	0,021
Dothideales	0,093	0,008	0,297	0,080	0,519	0,024	0,049	0,021	0,234	0,029	0,139	0,028
Capnodiales	0,080	0,012	0,035	0,007	0,024	0,005	0,224	0,026	0,198	0,028	0,138	0,044
Cystofilobasidiales	0,016	0,002	0,009	0,003	0,007	0,004	0,044	0,046	0,011	0,003	0,006	0,002
Pleosporales	0,096	0,010	0,103	0,035	0,040	0,004	0,047	0,020	0,076	0,022	0,114	0,034
Sporidiobolales	0,017	0,003	0,005	0,003	0,011	0,000	0,031	0,008	0,033	0,013	0,032	0,005
Chaetothyriales	0,068	0,012	0,036	0,003	0,037	0,010	0,003	0,003	0,004	0,001	0,006	0,002
Helotiales	0,010	0,001	0,004	0,002	0,020	0,006	0,053	0,021	0,017	0,008	0,041	0,007
Hypocreales	0,011	0,004	0,010	0,002	0,008	0,003	0,020	0,012	0,013	0,006	0,016	0,008
Tremellales	0,003	0,001	0,008	0,003	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,002	0,001
Lecanorales	0,034	0,004	0,013	0,005	0,023	0,006	0,000	0,000	0,003	0,002	0,002	0,002
Agaricales	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002	0,001	0,043	0,047	0,016	0,002	0,041	0,009
Taphrinales	0,007	0,002	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001	0,012	0,003	0,013	0,004
Teloschistales	0,027	0,004	0,016	0,001	0,006	0,002	0,000	0,001	0,000	0,000	0,003	0,001
Erysiphales	0,017	0,001	0,016	0,005	0,002	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,004	0,002
Xylariales	0,008	0,002	0,011	0,007	0,009	0,002	0,000	0,000	0,002	0,001	0,000	0,000
Pucciniales	0,017	0,003	0,010	0,005	0,009	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Andere ^b	0,408	0,023	0,335	0,055	0,228	0,031	0,094	0,047	0,108	0,020	0,131	0,040

^a nach 4 BCA-Behandlungen; BBCH 73 repräsentiert damit kurzfristige Effekte

^b vier Wochen nach der letzten BCA-Behandlung; BBCH 93 repräsentiert damit langfristige Effekte

^c enthält Ordnungen mit weniger als 1% sowie OTUs, die keiner Ordnung zugeordnet werden konnten

Im Freilandversuch 2011 konnten weiterhin keine signifikanten Effekte der BCA-Behandlungen auf die Zusammensetzung der bakteriellen Phyllosphäregemeinschaften nachgewiesen werden (ANOSIM: alle p-Werte > 0,682).

Für das Versuchsjahr 2012 konnten keine Schlussfolgerungen zu möglichen Effekten der eingesetzten BCAs auf die natürlichen Mikroorganismengemeinschaften in der Phyllosphäre getroffen werden, da sich weder *A. pullulans* noch *B. bassiana* in der Phyllosphäre etabliert haben (siehe auch Kapitel 3.3).

3.5.1. Freilandversuch 2013

Die 454 Pyrosequenzierung der Proben des Versuchsjahres 2013 wurde im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt (Pauli 2013). Gleichfalls erfolgte ein Großteil der Auswertung der 16S rRNA-Sequenzen im Rahmen derselben Arbeit. Die Auswertungen wurden für diesen Bericht z.T. durch statistische Analysen (z.B. ANOSIM) ergänzt. Die Auswertung der ITS rRNA-Sequenzen erfolgte unabhängig von dieser Masterarbeit.

Die Gesamtanzahl der ITS rRNA-Sequenzen betrug 71.042, die insgesamt 1.034 OTUs zugeordnet wurden. Für die erste Probenahme vor Behandlungsbeginn (BBCH 55-57) konnten durchschnittlich 1.313 ± 508 und für die zweite Probenahme nach vier Behandlungen (BBCH 67-71) durchschnittlich 1.250 ± 450 ITS rRNA-Sequenzen je Probe ermittelt werden. Von insgesamt 68.643 16S rRNA-Sequenzen konnten nach Bereinigung der Daten um Chloroplasten-Sequenzen etwa 28% aller Sequenzen (19.550) Bakterien zugeordnet werden. Die Anzahl der OTUs betrug insgesamt 2098. Die mittlere Anzahl an 16S rRNA-Sequenzen je Probe entsprach 266 ± 204 für die erste Probenahme (BBCH 55-57) und 456 ± 205 für die zweite Probenahme (BBCH 67-71).

Pilzliche Gemeinschaften in der Erdbeerphyllosphäre

In allen, noch unbehandelten Versuchsgliedern gehörten Vertreter der Klassen Dothideomycetes, Tremellomycetes und Leotiomycetes zu den am häufigsten, natürlich vorkommenden Pilzen der Erdbeerphyllosphäre zum Wachstumsstadium BBCH 55-57 (Tabelle 12).

Tabelle 12: Relative Häufigkeit von Pilzklassen in der Erdbeerphyllosphäre bestimmt durch die 454 Pyrosequenzierung vor Behandlungen (BBCH 55-57) mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden plus anschließenden BCA-Applikationen. Die vorgesehenen Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital®42 fl., Bon=BoniProtect®forte und F=Fungizide.

Klasse	Mittlere relative Häufigkeit (%) ^a							
	W	RV	Bon	RV+Bon	F - RV	F - Bon	F - RV+Bon	F
Dothideomycetes	33,9	40,7	35,4	32,4	29,7	32,7	36,6	33,8
Tremellomycetes	26,3	24,9	25,7	25,5	29,0	34,8	23,9	22,8
Leotiomycetes	17,9	20,2	20,3	26,6	20,4	17,5	25,0	25,8
Sordariomycetes	5,5	3,2	4,5	3,2	5,1	3,6	3,3	3,4
Agaricomycetes	3,9	2,3	3,9	3,1	2,2	1,9	2,0	2,3
Microbotryomycetes	0,7	0,7	1,0	0,8	0,7	0,6	0,6	0,3
Andere ^b	11,8	8,1	9,3	8,3	12,8	8,8	8,6	11,7

^a Mittelwert für jedes Versuchsglied wurde berechnet aus 4 Einzelwerten (n = 4)

^b enthält Klassen mit weniger als 1% sowie OTUs, die keiner Klasse zugeordnet werden konnten

Auf Gattungsebene repräsentierten *Cryptococcus* und *Davidiella* die am häufigsten, natürlich vorkommenden Pilze auf Erdbeerblättern, gefolgt von *Cladosporium* und *Cystofilobasidium* (Tabelle 13). Die relative Häufigkeit von *Aureobasidium*, einem an die Phyllosphäre angepassten hefeähnlichen Pilz, lag auf den noch unbehandelten Blattproben zwischen 1,7 % und 3,9 %.

Die Diversitätsindizes unterschieden sich nicht deutlich bei den verschiedenen, noch unbehandelten Blattproben und lagen zwischen 2,593 und 3,038 (Tabelle 13). Auch die Zusammensetzung der pilzlichen Gattungen unterschied sich auf den noch unbehandelten Blättern nicht (ANOSIM: alle p-Werte > 0,120).

Tabelle 13: Relative Häufigkeit von Pilzgattungen in der Erdbeerphyllosphäre bestimmt durch die 454 Pyrosequenzierung vor Behandlungen (BBCH 55-57) mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden plus anschließenden BCA-Applikationen. Die vorgesehenen Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital®42 fl., Bon=BoniProtect® forte und F=Fungizide.

Gattung	Mittlere relative Häufigkeit (%) ^a							
	W	RV	Bon	RV+Bon	F - RV	F - Bon	F - RV+Bon	F
<i>Cryptococcus</i>	18,8	17,3	15,1	15,8	18,9	23,0	15,6	14,0
<i>Davidiella</i>	13,7	16,4	12,6	14,2	11,5	15,5	16,0	14,9
<i>Cladosporium</i>	6,7	9,9	10,0	8,5	7,3	7,0	7,7	6,4
<i>Cystofilobasidium</i>	2,2	2,3	4,1	2,8	6,4	4,7	3,4	4,0
<i>Aureobasidium</i>	2,9	3,6	2,4	1,7	3,2	2,9	3,8	3,9
<i>Udeniomyces</i>	2,5	2,7	3,0	4,9	1,9	3,7	2,2	2,0
<i>Alternaria</i>	2,1	2,5	3,3	2,2	1,7	1,6	2,6	1,8
<i>Epicoccum</i>	1,6	2,0	1,9	0,9	1,1	1,1	1,4	1,9
<i>Fusarium</i>	1,4	0,9	2,2	1,2	1,8	0,9	0,9	0,9
<i>Lewia</i>	1,0	1,4	1,6	1,1	1,0	1,3	1,4	1,0
<i>Vuilleminia</i>	0,8	0,4	0,9	0,7	0,4	0,3	0,3	0,8
<i>Bjerkandera</i>	0,7	0,3	0,8	0,7	0,5	0,5	0,6	0,4
<i>Sporormia</i>	0,9	0,3	0,3	0,4	1,3	0,3	0,2	0,3
<i>Verticillium</i>	0,7	0,2	0,3	0,3	1,3	0,3	0,3	0,3
<i>Fomes</i>	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,2	0,3	0,5
<i>Truncatella</i>	0,7	0,5	0,1	0,1	0,2	0,5	0,3	0,4
<i>Cadophora</i>	0,5	0,2	0,9	0,4	0,3	0,3	0,0	0,0
<i>Discostroma</i>	0,4	0,3	0,0	0,2	0,3	0,3	0,2	0,4
<i>Pleospora</i>	0,3	0,4	0,2	0,2	0,0	0,1	0,4	0,4
<i>Hormonema</i>	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Phoma</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,3
Andere ^b	41,6	37,0	39,9	43,2	40,4	35,4	42,2	45,4
Shannon-Diversity Index	3,038	2,764	3,005	2,639	2,678	2,648	2,618	2,593

^a Mittelwert für jedes Versuchsglied wurde berechnet aus 4 Einzelwerten (n=4)

^b enthält Gattungen mit weniger als 1% sowie OTUs, die keiner Gattung zugeordnet werden konnten

Nach vier Behandlungen der Pflanzen mit den BCAs, BCA-Kombinationen oder mit den Fungiziden plus anschließenden BCA-Behandlungen (BBCH 61-71), waren Pilze der Klassen Tremellomycetes und Dothideomycetes in allen Blattproben am häufigsten vertreten, wobei die relative Häufigkeit der Dothideomycetes in allen mit BoniProtect® forte-behandelten Versuchsgliedern etwa 1,7 bis 2,3-fach höher war als in den mit Wasser behandelten Blattproben (Tabelle 14).

Tabelle 14: Relative Häufigkeit von Pilzklassen in der Erdbeerphyllosphäre bestimmt durch die 454 Pyrosequenzierung nach Behandlungen (BBCH 67-71) mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden plus anschließenden BCA-Applikationen. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®]42 fl., Bon=BoniProtect[®]forte und F=Fungizide.

Klasse	Mittlere relative Häufigkeit (%) ^a							
	W	RV	Bon	RV+Bon	F - RV	F - Bon	F - RV+Bon	F
Tremellomycetes	57,9	55,1	45,3	48,0	45,7	36,8	26,3	40,6
Dothideomycetes	22,0	19,7	41,3	38,6	24,7	42,2	51,7	28,5
Leotiomycetes	2,6	4,0	1,7	2,0	4,4	2,7	2,6	2,8
Sordariomycetes	1,7	1,7	1,9	1,6	2,9	1,7	1,8	7,8
Microbotryomycetes	2,2	0,6	1,0	1,0	3,4	1,8	2,6	3,2
Agaricomycetes	0,4	0,5	0,2	0,3	1,1	0,9	0,7	0,4
Eurotiomycetes	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,4	0,1	0,4
Wallemiomycetes	0,0	0,2	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0
Andere ^b	13,0	18,1	8,5	8,3	16,8	13,4	14,1	16,2

^a Mittelwert für jedes Versuchsglied wurde berechnet aus 4 Einzelwerten (n=4)

^b enthält Klassen mit weniger als 1% sowie OTUs, die keiner Klasse zugeordnet werden konnten

Cryptococcus war zu BBCH 67-71 in allen Versuchsgliedern die am häufigsten vertretene Gattung (Tabelle 15). Die mittlere relative Häufigkeit von *Aureobasidium*-Sequenzen betrug in wasserbehandelten Blattproben nur 1,0 %, erreichte hingegen in allen mit BoniProtect[®]-forte behandelten Blattproben Werte von 23,8 % bis 29,8 % (Tabelle 15 und Abb. 29). Die relative Abundanz von *Aureobasidium* war in allen mit BoniProtect[®]forte-behandelten Blattproben signifikant höher als in der Wasserkontrolle (Dunnett-Test: alle p-Werte < 0,001). In den mit BoniProtect[®]forte und RhizoVital[®]42 fl. + BoniProtect[®]forte behandelten Versuchsgliedern war gleichzeitig die relative Häufigkeit der dominanten Gattung *Cryptococcus* sowie anderer Gattungen im Vergleich zur Wasserkontrolle nur unwesentlich verringert. Hingegen war die relative Häufigkeit von *Cryptococcus* in Versuchsgliedern, die mit einer klassischen Fungizidbehandlung plus BoniProtect[®]forte bzw. mit einer klassischen Fungizidbehandlung plus RhizoVital[®]42 fl. + BoniProtect[®]forte behandelt wurden, im Vergleich zu mit Wasser behandelten Versuchsgliedern um das 1,4- bzw. 2,3-fache reduziert. Die Diversitätsindizes waren dennoch in allen Blattproben ähnlich hoch (Tabelle 15). Hingegen unterschieden sich alle behandelten Versuchsglieder hinsichtlich ihrer Zusammensetzung der pilzlichen Gemeinschaften signifikant von der Wasserkontrolle (ANOSIM: alle p-Werte < 0,032).

Tabelle 15: Relative Häufigkeit von Pilzgattungen in der Erdbeerphyllosphäre bestimmt durch die 454 Pyrosequenzierung nach Behandlungen (BBCH 67-71) mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden plus anschließenden BCA-Applikationen. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital®42 fl., Bon=BoniProtect®forte und F=Fungizide.

Gattung	Mittlere relative Häufigkeit der Pilzgattungen (%) ^a							
	W	RV	Bon	RV+Bon	F - RV	F - Bon	F - RV+Bon	F
<i>Cryptococcus</i>	41,5	40,3	35,4	34,7	35,2	28,4	17,6	30,1
<i>Aureobasidium</i>	1,0	2,4	28,9	25,2	2,9	23,8	29,8	4,7
<i>Davidiella</i>	10,5	6,4	5,3	5,5	7,0	4,0	11,8	9,2
<i>Epicoccum</i>	4,4	3,9	3,4	2,7	8,6	8,2	5,7	10,3
<i>Sporobolomyces</i>	2,2	0,5	0,9	1,0	3,1	1,6	2,4	3,2
<i>Cystofilobasidium</i>	2,5	3,7	1,8	2,6	0,9	1,1	0,4	0,2
<i>Monographella</i>	1,1	1,1	1,2	0,9	1,9	0,9	1,0	2,7
<i>Cladosporium</i>	2,0	2,5	1,3	2,1	0,6	0,9	0,6	0,6
<i>Lewia</i>	1,2	1,2	0,6	0,7	1,1	0,8	0,7	0,7
<i>Pyrenophora</i>	0,6	0,7	0,2	0,5	1,1	2,3	0,6	0,8
<i>Udeniomyces</i>	1,0	1,6	1,2	1,3	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Alternaria</i>	0,5	0,6	0,4	0,5	0,8	0,3	0,8	0,4
<i>Verticillium</i>	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2	0,2	0,1	0,4
<i>Eurotium</i>	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,4
<i>Capnobotryella</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,5	0,0	0,0
<i>Wallemia</i>	0,0	0,2	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0
Andere ^b	31,4	34,9	19,2	22,0	35,7	26,6	28,3	36,2
Shannon-Diversity Index	2,385	2,435	2,137	2,238	2,498	2,335	2,375	2,458

^a Mittelwert für jedes Versuchsglied wurde berechnet aus 4 Einzelwerten (n=4)

^b enthält Gattungen mit weniger als 1% sowie OTUs, die keiner Gattung zugeordnet werden konnten

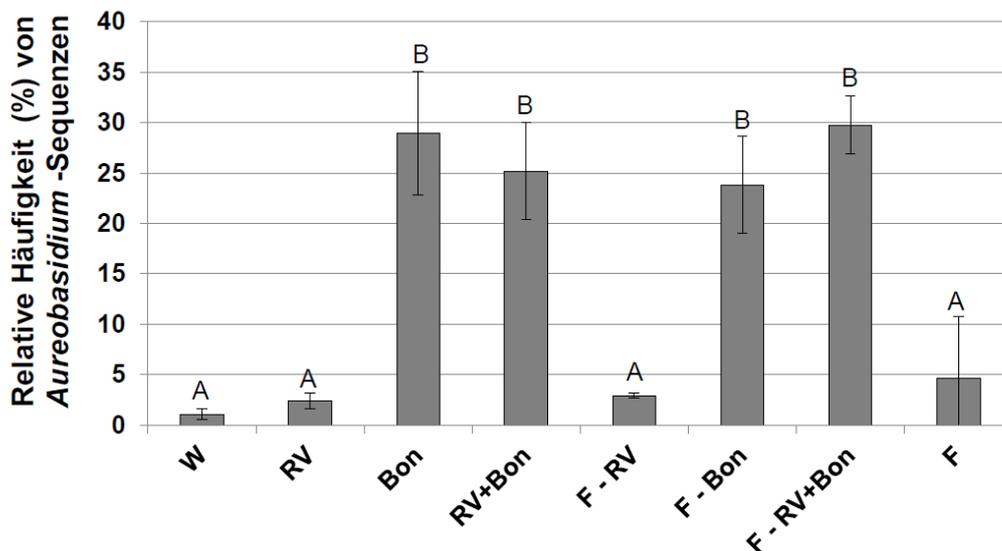


Abb. 29: Relative Häufigkeit von *Aureobasidium* in der Erdbeerphyllosphäre nach Behandlungen (BBCH 67-71) mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden mit anschließenden BCA-Behandlungen im Freilandversuch 2013. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital[®] 42 fl., Bon=BoniProtect[®] forte und F=Fungizide. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Versuchsglieder, die einen anderen Buchstaben als die Wasserbehandlung aufweisen, unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle (Dunnnett-Test, $\alpha = 5 \%$).

Bakterielle Gemeinschaften in der Erdbeerphyllosphäre

Bakterien der Klassen Gammaproteobacteria und Alphaproteobacteria repräsentierten die am häufigsten, natürlich vorkommenden Bakterien der Erdbeerphyllosphäre vor Beginn der Behandlungen (BBCH 55-57) (Tabelle 16). Interessanterweise betrug die relative Häufigkeit der Alphaproteobacteria in zwei der noch unbehandelten Blattproben (spätere Behandlung mit BoniProtect[®] forte und Fungizide plus RhizoVital[®] 42 fl.) mindestens 45,7 % und die relative Häufigkeit der Gammaproteobacteria in denselben Proben maximal 12,9 %, während das Verhältnis der relativen Häufigkeit beider Klassen in den anderen sechs, noch unbehandelten Proben gegensätzlich war, d.h. hier dominierten Vertreter der Gammaproteobacteria die Erdbeerphyllosphäre.

Im Durchschnitt konnten zu BBCH 55-57 etwa 54,0 % der bakteriellen Sequenzen keiner Gattung zugeordnet werden, so dass in diesem Bericht davon abgesehen wird, die Daten für diesen Termin auf Gattungsebene darzustellen. Die Werte des Shannon-Wiener Index schwankten an diesem Termin zwischen 2,292 und 1,362. Damit war die bakterielle Diversität bei den noch unbehandelten Blattproben an diesem Termin uneinheitlich.

Tabelle 16: Relative Häufigkeit von bakteriellen Klassen in der Erdbeerphyllosphäre bestimmt durch die 454 Pyrosequenzierung vor Behandlungen (BBCH 55-57) mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden plus anschließenden BCA-Applikationen. Die vorgesehenen Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital®42 fl., Bon=Boni-Protect® forte und F=Fungizide. Quelle: Pauli 2013 (modifiziert).

Klasse	Mittlere relative Häufigkeit (%) ^a							
	W	RV	Bon	RV+Bon	F - RV	F - Bon	F - RV+Bon	F
Gammaproteobacteria	50,2	62,5	1,5	38,4	12,9	49,2	44,7	53,9
Alphaproteobacteria	10,6	9,8	50,4	25,3	45,7	11,4	9,7	20,8
Rubrobacteria	8,2	2,5	3,7	3,0	2,9	6,5	10,8	2,5
Betaproteobacteria	5,0	4,9	11,5	5,6	10,0	11,8	4,4	3,7
Bacilli	2,8	3,7	0,7	0,4	0,0	1,8	15,9	1,3
Solibacteres	0,7	0,4	0,0	0,2	0,0	0,0	0,6	0,0
Flavobacteriia	0,2	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,6	0,2
Oscillatoriothycideae	0,0	0,2	0,5	0,2	0,0	0,0	0,6	0,4
Acidimicrobiia	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
Actinobacteria	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Nostocophycideae	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0
Andere ^b	21,7	15,9	31,4	24,8	28,6	19,2	12,7	16,8

^a Mittelwert für jedes Versuchsglied wurde berechnet aus 4 Einzelwerten (n=4)

^b enthält Klassen mit weniger als 1% sowie OTUs, die keiner Klasse zugeordnet werden konnten

Auch wenn vor Behandlungsbeginn die Diversität sowie die Häufigkeitsverteilung der Klassen Gammaproteobacteria und Alphaproteobacteria in den verschiedenen Blattproben nicht immer gleichmäßig war, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung der bakteriellen OTUs auf Gattungsebene im Vergleich zur Wasserbehandlung festgestellt werden (ANOSIM: alle p-Werte > 0,344).

Nach Behandlung der Pflanzen mit den BCAs, BCA-Kombinationen oder mit den Fungiziden plus BCAs (BBCH 61-71) waren Bakterien der Klassen Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria und Gammaproteobacteria in allen Versuchsgliedern häufig vertreten (Tabelle 17). Die relative Häufigkeit von Vertretern der Klasse Bacilli in der Erdbeerphyllosphäre war gering, unabhängig davon, ob die Blätter zuvor mit RhizoVital®42 fl. behandelt wurden.

Tabelle 17: Relative Häufigkeit von bakteriellen Klassen in der Erdbeerphyllosphäre bestimmt durch die 454 Pyrosequenzierung nach Behandlungen (BBCH 67-71) mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie Fungiziden plus anschließenden BCA-Applikationen. Die vorgesehenen Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital®42 fl., Bon=BoniProtect® forte und F=Fungizide. Quelle: Pauli 2013 (modifiziert).

Klasse	Mittlere relative Häufigkeit (%) ^a							
	W	RV	Bon	RV+Bon	F - RV	F - Bon	F - RV+Bon	F
Alphaproteobacteria	28,6	28,6	24,8	25,3	25,7	32,1	34,0	25,9
Betaproteobacteria	24,3	30,6	23,8	16,6	26,5	30,2	26,5	28,0
Gammaproteobacteria	17,0	9,5	24,1	30,1	29,8	13,6	27,9	24,7
Rubrobacteria	3,6	4,4	3,4	4,7	3,0	4,6	4,8	8,0
Bacilli	1,1	3,5	4,2	2,5	5,7	4,7	2,7	1,2
Mollicutes	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sphingobacteriia	0,3	0,5	0,2	0,6	0,1	0,2	0,0	0,2
Solibacteres	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,0	0,1
Oscillatoriothricaceae	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Nostocophycidae	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
Andere ^b	24,4	22,3	19,5	20,1	9,1	14,1	4,1	12,0

^a Mittelwert für jedes Versuchsglied wurde berechnet aus 4 Einzelwerten (n=4)

^b enthält Klassen mit weniger als 1% sowie OTUs, die keiner Klasse zugeordnet werden konnten

Die Gattung *Sphingomonas* war nach insgesamt vier Behandlungsterminen in allen Versuchsgliedern am häufigsten vertreten (Tabelle 18). Die relative Häufigkeit der Gattungen *Hymenobacter*, *Pseudomonas* und *Variovorax* in der Erdbeerphyllosphäre war zu diesem Zeitpunkt ebenfalls hoch, jedoch nicht in allen Versuchsgliedern. Z.B. war die Gattung *Hymenobacter* nur in Versuchsgliedern häufig vertreten, die zuvor mit Wasser oder ausschließlich mit den BCA-Präparaten behandelt wurden, während sie in Versuchsgliedern, in denen Fungizide appliziert worden waren, deutlich seltener vorkam. Im Vergleich zur Wasserkontrolle war die relative Häufigkeit von *Bacillus* in RhizoVital®42 fl.-behandelten Blattproben nicht erhöht.

Anders als vor Behandlungsbeginn unterschied sich die bakterielle Diversität in den meisten behandelten Versuchsgliedern nicht deutlich von der Diversität der mit Wasser behandelten Blattproben (Tabelle 18). Lediglich die Blattproben, die mit einer klassischen Fungizid-spritzfolge plus der BCA-Kombination RhizoVital®42 fl. + BoniProtect® forte behandelt wurden, wiesen einen im Vergleich zur Wasserkontrolle etwas geringeren Diversitätsindex auf. Signifikante Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung zwischen den behandelten Versuchsgliedern zu den mit Wasser behandelten Blattproben traten nicht auf (ANOSIM: alle p-Werte > 0,116).

Tabelle 18: Relative Häufigkeit von bakteriellen Gattungen in der Erdbeerphyllosphäre bestimmt durch die 454 Pyrosequenzierung nach Behandlungen (BBCH 67-71) mit BCAs, BCA-Kombinationen sowie mit Fungiziden plus anschließenden BCA-Applikationen. Die Behandlungen wurden abgekürzt durch W=Wasser, RV=RhizoVital®42 fl., Bon=Boni-Protect® forte und F=Fungizide. Quelle: Pauli 2013 (modifiziert).

Gattung	Mittlere relative Häufigkeit der Bakterien auf Gattungsebene (%) ^a							
	W	RV	Bon	RV+Bon	F - RV	F - Bon	F - RV+Bon	F
<i>Sphingomonas</i>	20,5	19,5	19,3	20,0	20,0	22,6	31,3	19,0
<i>Hymenobacter</i>	16,4	12,8	14,1	12,4	1,6	3,5	1,4	4,1
<i>Pseudomonas</i>	11,6	4,5	12,1	14,6	20,9	10,4	1,4	21,7
<i>Variovorax</i>	11,5	13,1	7,6	7,4	10,0	13,3	10,9	12,5
<i>Buchnera</i>	2,0	1,7	4,6	6,0	4,7	0,4	24,5	1,0
<i>Methylobacterium</i>	1,7	1,8	2,0	1,9	1,3	2,6	1,4	2,5
<i>Agrobacterium</i>	1,4	1,3	0,2	0,3	1,2	1,6	0,0	0,8
<i>Lactobacillus</i>	1,1	1,5	4,2	1,1	5,3	4,3	2,7	1,2
<i>Rhodococcus</i>	1,0	0,8	0,9	0,9	0,5	0,7	1,4	2,7
<i>Janthinobacterium</i>	0,7	1,3	0,7	2,3	4,2	2,6	0,0	0,9
<i>Dyadobacter</i>	0,7	0,8	0,4	0,3	0,6	1,0	0,0	0,7
<i>Wolbachia</i>	0,5	0,0	0,1	0,2	0,2	0,5	0,0	0,0
<i>Candidatus hamiltonella</i>	0,5	0,0	2,7	4,2	0,4	0,2	0,7	0,5
<i>Pigmentiphaga</i>	0,4	0,5	3,1	0,1	1,7	0,1	0,0	0,8
<i>Pedobacter</i>	0,4	1,6	0,3	0,7	1,0	0,8	0,0	0,4
<i>Bifidobacterium</i>	0,3	1,1	0,8	0,8	1,0	0,9	2,0	0,8
<i>Rathayibacter</i>	0,2	0,4	0,2	0,9	0,4	0,4	0,0	1,3
<i>Chryseobacterium</i>	0,2	0,5	0,0	0,6	0,0	0,1	0,0	0,2
<i>Acidovorax</i>	0,1	0,1	0,0	0,0	0,4	0,1	0,0	0,0
<i>Mycetocola</i>	0,1	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	1,4	0,2
<i>Bacillus</i>	0,0	1,9	0,0	1,4	0,4	0,4	0,0	0,0
<i>Microcoleus</i>	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Sanguibacter</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0
<i>Rickettsiella</i>	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Andere ^b	28,6	33,9	26,7	23,0	24,2	33,0	21,1	28,6
Shannon-Diversity Index	2,776	2,822	2,835	2,905	2,779	2,881	2,153	2,624

^a Mittelwert für jedes Versuchsglied wurde berechnet aus 4 Einzelwerten (n=4)

^b enthält Gattungen mit weniger als 1% sowie OTUs, die keiner Gattung zugeordnet werden konnten

3.6. Diskussion der Ergebnisse

Ziel des Projektes war die Entwicklung von Applikationssystemen bzw. Behandlungsstrategien für eine optimierte Regulierung von Graufäule und Echten Mehltau durch mikrobiologische Präparate (BCAs) bei ökologisch angebauten Erdbeeren. Im vorliegenden Projekt wurde hierbei der Fokus auf einen kombinierten Einsatz von BCAs zur biologischen Kontrolle beider Schaderreger gelegt. Im Rahmen der Projektverlängerung konnten verschiedene Untersuchungen aus dem vorangegangenen Projekt FZK 06OE354 wiederholt werden.

Unter Gewächshausbedingungen konnte *B. cinerea* nicht effektiv durch die getesteten mikrobiologischen Präparate RhizoVital[®] 42 fl. (*Bacillus amyloliquefaciens*), BoniProtect[®] forte (*Aureobasidium pullulans*) und Naturalis[®] (*Beauveria bassiana*) reguliert werden, unabhängig davon, ob diese einzeln oder kombiniert eingesetzt wurden. Bereits im Gewächshausversuch des vorangegangenen Projektes FZK 06OE354 konnten keine Behandlungseffekte der o.g. BCAs und BCA-Kombinationen gegenüber *B. cinerea* an der Pflanze festgestellt werden. Ursache für die fehlenden Behandlungserfolge der BCAs und BCA-Kombinationen könnte sein, dass die Graufäule-Gewächshausversuche des vorliegenden Projektes im Spätsommer/Herbst stattfinden mussten und das Pflanzenmaterial zu diesem Zeitpunkt bereits an Vitalität verloren hatte. Folge waren zu geringe Erträge für eindeutige Behandlungsunterschiede. Es wird daher für zukünftige Untersuchungen empfohlen, Gewächshausversuche, die eine Fruchtreife erfordern, mit nicht zu lang gelagerten Pflanzen (z.B. Frigo-, Wartebeet- oder Traypflanzen) im Frühjahr durchzuführen.

Wie bereits im Freilandversuch 2011 (Projekt: FZK 06OE354), führte auch im Freilandversuch 2012 der kombinierte BCA-Einsatz im Vergleich zu den BCA-Einzelapplikationen zu verbesserten Wirkungen hinsichtlich der Regulierung von *B. cinerea* an der Pflanze. Ähnlich vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich eines kombinierten Einsatzes von BCAs gegenüber *B. cinerea* an Erbeeren wurden bereits in anderen Untersuchungen, jedoch nur unter kontrollierten Bedingungen, gezeigt (z.B. Guetsky et al. 2001, Guetsky et al. 2002b). In diesen Untersuchungen konnten die verbesserten Wirkungen der BCA-Kombination *P. guilermundii* und *B. pumilis* auf verschiedene Wirkmechanismen beider BCAs (Guetsky et al. 2002a; Guetsky et al. 2002b) sowie verschiedene Anforderungen der BCAs an die Umweltbedingungen (Guetsky et al. 2001) zurückgeführt werden. Im vorliegenden Projekt jedoch wurden die Wirkmechanismen oder die Umweltansprüche der eingesetzten BCAs

nicht genauer untersucht, so dass keine sicheren Aussagen über die verantwortlichen Mechanismen für die verbesserten Wirkungen gegenüber der Graufäule getroffen werden können. Diese gilt es in weiteren Untersuchungen zu identifizieren.

Die in dem Freilandversuch 2012 gegen *B. cinerea* (an der Pflanze) wirksamen BCA-Kombinationen RhizoVital® 42 fl. + BoniProtect® forte und RhizoVital42® fl + Naturalis® waren jedoch nicht im Freilandversuch 2011 (Projekt: FZK 06OE354) wirksam, während die damals wirksamen BCA-Kombinationen BoniProtect® forte + Naturalis® sowie RhizoVital® 42 fl. + BoniProtect® forte + Naturalis® im Freilandversuch 2012 nicht im Bestand (d.h. gegen *B. cinerea* an der Pflanze) wirkten. Auch konnten 2012 keinerlei Behandlungseffekte während der Lagerung beobachtet werden, während solche im Freilandversuch des vorangegangenen Projektes FKZ 06OE354 in einem der zwei Lagerversuche durchaus beobachtet werden konnten (Sylla et al. 2012). Damit ist der Einsatz von BCA-Kombinationen im Hinblick auf verschiedene Vegetationsperioden nicht beständig. Diese in dem Projekt gewonnenen Erkenntnisse bestätigen bereits veröffentlichte Untersuchungen an Erdbeeren, in denen BCAs ebenfalls nicht zuverlässig gegen *B. cinerea* wirksam waren (Prokkola and Kivijärvi 2007; Helbig and Bochow 2001; Hjeljord et al. 2000).

Der antagonistische, hefeähnliche Pilz *A. pullulans*, der in den Freilandversuchen 2011 (Projekt: FZK 06OE354) und 2012 in Form des BCA-Präparates BoniProtect® forte u.a. gegen *B. cinerea* eingesetzt wurde, etablierte sich in den Versuchsjahren unterschiedlich erfolgreich. Dies wird auch als Ursache der schwankenden Behandlungserfolge der BCA-Kombinationen in den Freilandversuchen 2011 und 2012 hinsichtlich der Regulierung von *B. cinerea* angesehen. *A. pullulans* ist ein an die Phyllosphäre angepasster Mikroorganismus (Blakeman and Fokkema 1982; Chi et al. 2009). Seine gute Wirkung gegenüber Graufäule an Erdbeeren wurde auch in verschiedenen anderen Untersuchungen beobachtet (Lima et al. 1997; Adikaram et al. 2002). Es wird angenommen, dass ungünstige Witterungsbedingungen im Versuchsjahr 2012 (d.h. häufige Regenfälle) die erfolgreiche Etablierung des ausgebrachten BCAs *A. pullulans* in der Erdbeerphyllosphäre verhindert haben (Sylla et al. 2013). In Freilandversuchen von Strømeng et al. (2005) war *A. pullulans* im Jahr 2004 gegen *B. cinerea* an Erdbeeren wirksam, während der gleiche Antagonist im darauffolgenden Jahr, welches durch starke Regenfälle während der Blüte geprägt war, nicht mehr wirksam war. Als Ursache für die fehlenden Effekte von *A. pullulans* in 2005 nannten Strømeng et al. (2005) u.a. auch eine mögliche Abwaschung des BCAs von der Pflanzenoberfläche aufgrund der starken Regenfälle.

Die Ergebnisse dieses und des vorangegangenen Projektes FZK 06OE354 weisen außerdem darauf hin, dass die 2011 und 2012 mit Hilfe der 454 Pyrosequenzierung nachgewiesenen unterschiedlichen natürlichen Mikroorganismengemeinschaften, ebenfalls einen Einfluss auf die unterschiedliche Etablierung von *A. pullulans* hatten (Sylla et al. 2013).

Trotz der immer noch unzuverlässigen Ergebnisse von ausschließlichen BCA-Behandlungen im Ökologischen Erdbeeranbau, kann ein Einsatz von BCAs im Konventionellen Erdbeeranbau von Bedeutung sein und z.B. den Einsatz von Fungiziden zu reduzieren (Elad and Shtienberg 1995). Eine mögliche Strategie ist der Einsatz von BCAs nach einer klassischen Behandlungsfolge von Fungiziden. Damit könnten Sekundärinfektionen im Bestand, die unter ungünstigen Bedingungen (z.B. bei starken Regenfällen) verstärkt nach der Blüte auftreten und aufgrund der einzuhaltenden Wartezeiten nicht mehr mit Fungiziden bekämpft werden können, reduziert werden.

Die Ergebnisse des Freilandversuches 2013 zeigten, dass weder die Einzelapplikationen der mikrobiologischen Präparate RhizoVital[®]42 fl. (*B. amyloliquefaciens*) und BoniProtect[®]forte (*A. pullulans*) noch deren kombinierte Applikation gegen *B. cinerea* wirksam waren. Somit brachten Behandlungen mit mikrobiologischen Präparaten nach einer vorangegangenen klassischen Fungizidspritzfolge, d.h. nach der Blüte, auch keine deutlichen zusätzlichen Wirkungen gegen *B. cinerea* hervor.

Die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmungen weisen darauf hin, dass *A. pullulans* sich im Freilandversuch 2013 nicht in der Phyllosphäre etabliert hat, was eine mögliche Erklärung für die fehlenden Behandlungserfolge dieses BCAs wäre. Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen der 454 Pyrosequenzierung. Mit dieser Methode konnten in allen Versuchsgliedern, die zuvor mit BoniProtect[®]forte behandelt wurden, signifikant erhöhte Abundanzen an *Aureobasidium*-Sequenzen festgestellt werden, was auf eine erfolgreiche Etablierung von *Aureobasidium* in der Phyllosphäre hinweist. Es kann nicht eindeutig geklärt werden, weshalb es zu den widersprüchlichen Ergebnissen hinsichtlich der Etablierung von *Aureobasidium* gekommen ist. Deshalb können auch keine eindeutigen Aussagen darüber getroffen werden, ob die fehlenden BCA-Wirkungen im Freilandversuch 2013 mit einer gescheiterten Etablierung von *Aureobasidium* im Zusammenhang stehen, oder ob die Wirkmechanismen des durchaus etablierten BCAs gegenüber *B. cinerea* in diesem Jahr nicht effektiv genug waren.

Kenntnisse über mögliche negative Effekte von Pestiziden auf mikrobielle BCAs sind von großer Bedeutung, wenn diese im Konventionellen Erdbeeranbau erfolgreich integriert werden sollen (Elad and Stewart 2004). Die Lebendkeimzahlbestimmungen im Rahmen des Freilandversuches 2013 weisen darauf hin, dass vorangegangene Behandlungen mit Fungiziden keine negativen Effekte auf die Etablierung von *B. amyloliquefaciens* hatten. Mit der gleichen Methode konnte bei *Aureobasidium* jedoch keine Etablierung in der Phyllosphäre festgestellt werden. Daher ist auch eine Aussage hinsichtlich des Einflusses der applizierten Fungizide auf die Etablierung dieses BCAs zunächst nicht möglich. Die Ergebnisse der 454 Pyrosequenzierung deuten allerdings darauf hin, dass die eingesetzten Fungizide die Etablierung von *Aureobasidium* nicht beeinträchtigen. Letzteres Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Walter et al. (2007), die schädigende Effekte von Pestiziden auf *A. pullulans* nachgewiesen haben. In deren Studie wurden jedoch andere Fungizide gegen *A. pullulans* sowie auch andere Isolate des Antagonisten getestet als im vorliegenden Projekt. In einer Studie von Schmid et al. (2011) war die natürliche Abundanz von *A. pullulans* in der Phyllosphäre von konventionell angebauten Reben deutlich geringer als in ökologisch angebauten Reben. Es wurde jedoch nicht vermutet, dass das geringere natürliche Auftreten von *A. pullulans* in konventionell angebauten Reben auf möglicherweise schädigende Fungizidbehandlungen zurückzuführen war. Das Ergebnis ihrer Studie wurde vielmehr auf fördernde Effekte der Behandlungen mit Schwefel und Kupfer in ökologisch angebauten Reben zurückgeführt, da *A. pullulans* in der Lage ist, diese Stoffe zu verwerten (Schmid et al. 2011).

Insgesamt ist eine eindeutige Bewertung des Freilandversuches 2013 aus den o.g. Gründen sehr schwierig und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine zusätzliche BCA-Behandlung nach einer klassischen Fungizidspritzfolge in einer anderen Vegetationsperiode (z.B. unter günstigeren Witterungsbedingungen für die BCAs) zu besseren Wirkungen gegen Graufäule an Erdbeeren geführt hätte. In diesem Zusammenhang sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Ergebnisse, die im Rahmen der vorliegenden Projektverlängerung mittels der 454 Pyrosequenzierung gewonnen wurde, deuten erstmalig darauf hin, dass antagonistische Mikroorganismen andere, natürlich vorkommende Mikroorganismen der Phyllosphäre unter Freilandbedingungen zumindest kurzfristig verdrängen können. Die Zusammensetzung von

Mikroorganismengemeinschaften in der Phyllosphäre wird bereits von vielen anderen Faktoren wesentlich beeinflusst, z.B. durch Witterungsbedingungen (Kadivar und Stapleton 2003; Kinkel 1997; Andrews 1992), das Anbausystem (Schmid et al. 2011; Ottesen et al. 2009) oder den Einsatz von Pestiziden (Zhang et al. 2009; Walter et al. 2007). Damit sind die Mikroorganismengemeinschaften der Phyllosphäre generell als sehr dynamisch zu betrachten und die Erkenntnisse der Projektverlängerung nur mit Vorsicht zu interpretieren. Es wurde außerdem gezeigt, dass bereits der Befall von Pflanzen mit einem Pathogen die Mikroorganismengemeinschaften der Phyllosphäre wesentlich beeinflusst (Suda et al. 2010). Daher stellt sich die Frage, ob ein im Hinblick auf das Pathogen erwünschter „Verdrängungseffekt“ der ausgebrachten BCAs nicht gleichzeitig einen, wenn auch indirekten, Effekt auf die indigenen Mikroorganismengemeinschaften haben muss. Es ist daher fraglich, ob ein erfolgreicher Einsatz der BCAs ohne kurzzeitige direkte oder indirekte Effekte auf die indigene Mikrobiota überhaupt möglich ist.

Insgesamt zeigten die im Projekt gewonnene Ergebnisse, dass der Einsatz von BCAs in der Phyllosphäre weiterhin schwierig bleibt. Ein noch umfangreicheres und tieferes Verständnis der Mikroorganismen-Interaktionen in der Phyllosphäre sowie aller Faktoren, die diese Interaktionen beeinflussen können, ist dringend notwendig, um die Grenzen des Einsatzes mikrobiologischer Präparate in der Phyllosphäre noch besser zu verstehen und gleichzeitig die Chancen für einen erfolgreichen Einsatz von BCAs im Ökologischen oder Integrierten Erdbeeranbau zu identifizieren.

3.7. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse; bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

Die im Rahmen der Projektverlängerung gewonnenen Erkenntnisse können derzeit nicht in die Praxis des Ökologischen Erdbeeranbaus umgesetzt werden. Denn auch wenn eine effektive Regulierung von *B. cinerea* durch kombinierte BCA-Behandlungen grundsätzlich erzielt werden kann, so waren die Behandlungserfolge der BCA-Kombinationen in den Freilandversuchen nicht beständig. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass verschiedene Faktoren (z.B. Wetterbedingungen, indigene Mikrobiota) die Etablierung der ausgebrachten BCAs und damit die Wirksamkeit der BCAs gegenüber den Pathogenen in der Phyllosphäre wesentlich beeinflussen können. Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass der Einsatz von

antagonistischen Mikroorganismen gegen Pflanzenkrankheiten in der Phyllosphäre (z.B. Graufäule) weiterhin eine große Herausforderung darstellt und der kombinierte Einsatz von mikrobiologischen Präparaten die Schwierigkeiten, die eine biologische Kontrolle in der Phyllosphäre mit sich bringt, nicht zuverlässig überwinden kann.

Im Rahmen der Projektverlängerung konnten keine eindeutigen Aussagen darüber getroffen werden, ob ein Einsatz von mikrobiologischen Präparaten im Integrierten Erdbeeranbau zu verbesserten Wirkungen gegen Graufäule an Erdbeeren führen kann. Hierzu wäre die Durchführung weiterer Freilandversuche notwendig.

Die Ergebnisse des vorliegenden Projektes wurden im Rahmen von Vorträgen und Postern auf verschiedenen nationalen und internationalen Tagungen sowie bei Projekttreffen vorgestellt (siehe Kapitel 7). Ein Großteil der Ergebnisse ist außerdem bereits in internationalen Fachzeitschriften publiziert. Es ist geplant, einen weiteren Artikel zu publizieren. Die Hochschule Geisenheim war weiterhin Organisator und Veranstalter der Abschlussagung zum Verbundprojekt „Ökologischer Erdbeeranbau“ mit knapp 80 Teilnehmern (Berater, Versuchsansteller, Verbands- und Firmenvertreter) aus dem In- und Ausland. Im Rahmen dieser Tagung wurden u.a. die Ergebnisse des vorangegangenen Projektes FZK 06OE354 und des vorliegenden Projektes vorgestellt.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen der Projektverlängerung konnten im Projektjahr 2012 ein Gewächshausversuch sowie ein Freilandversuch zur Wirksamkeit von BCAs und BCA-Kombinationen gegen *Botrytis cinerea* durchgeführt werden. Im Gewächshausversuch waren weder an der Pflanze noch im Lagerversuch signifikante Wirkungen der BCAs gegenüber *B. cinerea* nachweisbar. Unter Freilandbedingungen zeigten jedoch Applikationen der BCA-Kombinationen RhizoVital®42 fl. + BoniProtect®forte und RhizoVital®42 fl. + Naturalis® im Gegensatz zur Einzelapplikation der BCAs signifikante Wirkungen gegen *B. cinerea* an der Pflanze. In Lagerversuchen, die im Rahmen des Freilandversuchs 2012 durchgeführt wurden, konnten hingegen keinerlei Behandlungseffekte durch BCAs oder BCA-Kombinationen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmungen weisen darauf hin, dass *Bacillus amyloliquefaciens* sich unmittelbar nach Ausbringung des BCA-Präparates RhizoVital®42 fl. in der Erdbeerphyllosphäre etablierte. Vier Wochen nach Beendigung der RhizoVital®42 fl. - Behandlungen waren die Keimzahlen der Endosporen-formenden Bakterien (u.a. Bacilli) jedoch wieder auf dem Niveau der unbehandelten Blätter. Weiterhin haben die Lebendkeimzahlbestimmungen gezeigt, dass die ausgebrachten BCAs *Aureobasidium pullulans* und *Beauveria bassiana* sich 2012 nicht auf der Blattoberfläche etabliert haben.

Im Jahr 2013 wurden erneut ein Gewächshausversuch und ein Freilandversuch durchgeführt. Der Gewächshausversuch zur Wirkung und Kombinierbarkeit der mikrobiologischen Präparate AQ10®WG, Trichostar® und FZB24®fl. im Hinblick auf die Regulierung von *Podosphaera aphanis* konnte jedoch aufgrund des geringen Befalls der Pflanzen mit Echtem Mehltau nicht bewertet werden.

Im Freilandversuch 2013 wurde die Wirkung von ausgewählten BCAs- und BCA-Kombinationen sowie von zusätzlichen BCA-Behandlungen nach einer klassischen Fungizid-spritzfolge gegen *B. cinerea* untersucht. Keine der BCA-Behandlungen reduzierte den Graufäulebefall an der Pflanze im Vergleich zur Wasserbehandlung. Hingegen zeigten einige Versuchsglieder mit klassischen Fungizidspritzfolgen plus anschließenden BCA-Behandlungen signifikante Wirkungen gegen *B. cinerea* an der Pflanze. Im Vergleich zur alleinigen Fungizidbehandlung konnte die Wirkung gegenüber *B. cinerea* durch einen zusätzlichen BCA-Einsatz allerdings nicht deutlich verbessert werden. Die Lebendkeimzahlbestimmungen zeigten, dass *B. amyloliquefaciens* sich 2013 nach Ausbringung der BCAs in der Erdbeerphyllosphäre etablierte, *A. pullulans* hingegen nicht. Ein negativer Effekt der zuvor

gespritzten Fungizide auf die Lebendkeimzahlen der beiden BCAs konnte im Versuch nicht detektiert werden.

Mit Hilfe der 454 Pyrosequenzierung konnten wertvolle Erkenntnisse zur Zusammensetzung von mikrobiellen Gemeinschaften in der Erdbeerphylosphäre gewonnen werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass *A. pullulans* indigene Pilze in der Erdbeerphylosphäre verdrängen kann, sofern dieser BCA sich erfolgreich in diesem Habitat etabliert hat. Sie zeigten außerdem, dass die Zusammensetzung der Pilze nicht nur durch *A. pullulans*, sondern auch durch den BCA *B. amyloliquefaciens* sowie durch Fungizide beeinflusst werden können. Die Ergebnisse der 454 Pyrosequenzierung aus dem Versuch 2013 zeigten zudem, dass *Aureobasidium* sich entgegen der Ergebnisse der Lebendkeimzahlbestimmungen womöglich doch in der Phyllosphäre von Erdbeeren etabliert hat.

5 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen und Hinweise auf weiterführende Fragestellungen

Der Gewächshaus- und Freilandversuch zur Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegenüber *B. cinerea* wurden im Rahmen des Zeit- und Arbeitsplans durchgeführt.

Der Gewächshausversuch zur Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate gegenüber *P. aphanis* konnte hingegen nicht wie geplant im Frühjahr 2012 durchgeführt werden, da die Erhaltungszucht des Echten Mehltaus auf Erdbeerpflanzen im Winter 2012 zusammengebrochen war und somit im Frühjahr keine mit *P. aphanis* infizierten Pflanzen vorhanden waren, die als Inokulum hätten verwendet werden können. Der Mehltau-Gewächshausversuch wurde jedoch im Frühjahr 2013 nachträglich durchgeführt.

Es war außerdem geplant, im Anschluss an den Graufäule-Freilandversuch 2012 auf gleicher Fläche einen Freilandversuch zur Wirksamkeit mikrobiologischer Präparate gegen *P. aphanis* durchzuführen, da im Herbst nach dem Mulchen der Pflanzen erfahrungsgemäß verstärkt mit Befall durch Echten Mehltau zu rechnen ist. Im Projektjahr 2012 ist jedoch kein Mehltaubefall aufgetreten und der geplante Mehltau-Freilandversuch konnte nicht durchgeführt werden.

Der Freilandversuch zur Wirksamkeit und Kombinierbarkeit ausgewählter mikrobiologischer Präparate im Integrierten Anbau von Erdbeeren wurden im Rahmen des Zeit- und Arbeitsplans durchgeführt.

Im Rahmen der Projektverlängerung wurden außerdem die molekularbiologischen Arbeiten wie geplant durchgeführt und die Ergebnisse der 454 Pyrosequenzierung ausgewertet.

Im Projektjahr 2012 wurden keine Versuche in Praxisbetrieben durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine sicheren Erkenntnisse zu wirkungsvollen Behandlungsstrategien vorlagen. Da auch die Ergebnisse aus den Freilandversuchen 2011 und 2012 nicht einheitlich waren, d.h. verschiedene BCA-Kombinationen gegenüber *B. cinerea* wirksam waren, konnten auch im Anschluss an diese Versuche keine klaren Handlungsempfehlungen für das Jahr 2013 gegeben werden. Aus diesem Grund wurde auch 2013 davon abgesehen, Versuche in Praxisbetrieben durchzuführen.

6 Literaturverzeichnis

- Adikaram, N., D. Joyce and L. Terry (2002). "Biocontrol activity and induced resistance as a possible mode of action for *Aureobasidium pullulans* against grey mould of strawberry fruit." *Australasian Plant Pathology* 31(3): 223-229.
- Amsalem, L., S. Freeman, D. Rav-David, Y. Nitzani, A. Szejnberg, I. Pertot and Y. Elad (2006). "Effect of climatic factors on powdery mildew caused by *Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae* on strawberry." *European Journal of Plant Pathology* 114(3): 283-292.
- Andrews, J. H. (1992). "Biological control in the phyllosphere." *Annual Review of Phytopathology* 30: 603-635.
- Blakeman, J.P. and N.J. Fokkema (1982). "Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane." *Annual Review of Phytopathology* 20(1): 167-190.
- Boller, E. (1984). "Eine einfache Ausschwemm-Methode zur schnellen Erfassung von Raubmilben, Thrips und anderen Kleinarthropoden im Weinbau." *Schweiz. Zeitschrift für Obst-und Weinbau* 120: 16-17.
- Buée, M., M. Reich, C. Murat, E. Morin, R.H. Nilsson, S. Uroz and F. Martin (2009). "454 pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity." *New Phytologist* 184(2): 449-456.
- Carisse, O. and J. Bouchard (2010). "Age-related susceptibility of strawberry leaves and berries to infection by *Podosphaera aphanis*." *Crop Protection* 29(9): 969-978.
- Chi, Z., F. Wang, Z. Chi, L. Yue, G. Liu and T. Zhang (2009). "Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast." *Applied Microbiology and Biotechnology* 82(5): 793-804.
- Cota, L.V., L.A. Maffia, E.S.G. Mizubuti and P.E.F. Macedo (2009). "Biological control by *Clonostachys rosea* as a key component in the integrated management of strawberry gray mold." *Biological Control* 50: 222-230.
- Daugaard, H. and H. Lindhard (2000). "Strawberry cultivars for organic production." *Gartenbauwissenschaft* 65: 213-217.
- De Cal, A., C. Redondo, A. Szejnberg and P. Melgarejo (2008). "Biocontrol of powdery mildew by *Penicillium oxalicum* in open-field nurseries of strawberries." *Biological Control* 47(1): 103-107.
- Dodgson, J., A. Hall and S. Parker (2008). "Rule based prediction system to optimize fungicide applications for control of *Podosphaera aphanis*." VI International Strawberry Symposium ISHS, Huelva, Spain.
- Elad, Y. and A. Stewart (2004). "Microbial control of *Botrytis* spp." *Botrytis: Biology, pathology and control*. Y. Elad, Williamson, B., Tudzynski, P., and Delen, N. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 223-241.
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (2004). *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.
- Elad, Y. (2000). "Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action." *Crop Protection* 19(8-10): 709-714.

- Elad, Y., B. Kirshner, N. Yehuda and A. Szejnberg (1998). "Management of powdery mildew and gray mold of cucumber by *Trichoderma harzianum* T39 and *Ampelomyces quisqualis* AQ10." *BioControl* 43(2): 241-251.
- Elad, Y., N.E. Malathrakis and A.J. Dik (1996). "Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops." *Crop Protection* 15(3): 229-240.
- Elad, Y. and D. Shtienberg (1995). "*Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration." *Integrated Pest Management Reviews* 1: 15-29.
- Elad, Y., J. Kohl and N.J. Fokkema (1994). "Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* in bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi." *European Journal of Plant Pathology / European Foundation for Plant Pathology* 100(5): 315-336.
- EPPO (1996). PP 1/16(2): Guideline for the efficacy evaluation of fungicides. *Botrytis cinerea* on strawberries. European and Mediterranean Plant Protection Organisation.
- Evenhuis, A. and P.J. Wanten (2006). "Effect of polyethene tunnels and cultivars on grey mould caused by *Botrytis cinerea* in organically grown strawberries." *Agriculturae Conspectus Scientificus* 71: 111-114.
- Fravel, D.R. (2005). "Commercialization and implementation of biocontrol." *Annual Review of Phytopathology* 43: 337-359.
- Freeman, S., D. Minz, I. Kolesnik, O. Barbul, A. Zveibil, M. Maymon, Y. Nitzani, B. Kirshner, D. Rav-David, A. Bilu, A. Dag, S. Shafir and Y. Elad (2004). "*Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry." *European Journal of Plant Pathology* 110(4): 361-370.
- Guetsky, R., D. Shtienberg, Y. Elad and A. Dinoor (2001). "Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control." *Phytopathology* 91(7): 621-627.
- Guetsky, R., D. Shtienberg, A. Dinoor and Y. Elad (2002a). "Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guilhermondii* and *Bacillus mycooides* applied as a mixture on strawberry plants." *Biocontrol Science and Technology* 12(6): 705-714.
- Guetsky, R., D. Shtienberg, Y. Elad, E. Fischer and A. Dinoor (2002b). "Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression." *Phytopathology* 92(9): 976-985.
- Hamp, T.J., W.J. Jones and A.A. Fodor (2009). "Effects of experimental choices and analysis noise on surveys of the "Rare Biosphere"." *Applied and Environmental Microbiology* 75(10): 3263-3270.
- Helbig, J. (2002). "Ability of the antagonistic yeast *Cryptococcus albidus* to control *Botrytis cinerea* in strawberry." *BioControl* 47(1): 85-99.
- Helbig, J. (2001). "Biological control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in strawberry by *Paenibacillus polymyxa* (isolate 18191)." *Journal of Phytopathology* 149: 265-273.
- Helbig, J. and H. Bochow (2001). "Effectiveness of *Bacillus subtilis* (isolate 25021) in controlling *Botrytis cinerea* in strawberry." *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 108(6): 545-559.
- Hjeljord, L.G., A. Stensvand and A. Tronsmo (2000). "Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries." *Biological Control* 19(2): 149-160.

- Jacobsen, B.J. (2006). "Biological control of plant diseases by phyllosphere applied biological control agents." *Microbial ecology of aerial plant surfaces*. M.J. Bailey, Lilley, A.K., Timms-Willson, T.M. and Spencer-Phillips, P.T.N. CABI Publishing: 133-147.
- Jones, W. (2010). "High-throughput sequencing and metagenomics." *Estuaries and Coasts* 33(4): 944-952.
- Kadivar, H. and A.E. Stapleton (2003). "Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity." *Microbial Ecology* 45(4): 353-361.
- Kinkel, L.L. (1997). "Microbial population dynamics on leaves." *Annual Review of Phytopathology* 35(1): 327-347.
- Kiss, L., J.C. Russell, O. Szentiványi, X. Xu and P. Jeffries (2004). "Biology and biocontrol potential of *Ampelomyces* mycoparasites, natural antagonists of powdery mildew fungi." *Biocontrol Science and Technology* 14(7): 635-651.
- Kiss, L. (2003). "A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents." *Pest Management Science* 59(4): 475-483.
- Kovach, J., R. Petzoldt and G.E. Harman (2000). "Use of honey bees and bumble bees to disseminate *Trichoderma harzianum* 1295-22 to strawberries for *Botrytis* control." *Biological Control* 18: 235-242.
- Legard, D.E., C.L. Xiao, J.C. Mertely and C.K. Chandler (2000). "Effects of plant spacing and cultivar on incidence of *Botrytis* fruit rot in annual strawberry." *Plant Disease* 84: 531-538.
- Lima, G., A. Ippolito, F. Nigro and M. Salerno (1997). "Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots." *Postharvest Biology and Technology* 10(2): 169-178.
- Longa, C.M.O., I. Pertot and S. Tosi (2008). "Ecophysiological requirements and survival of a *Trichoderma atroviride* isolate with biocontrol potential." *Journal of Basic Microbiology* 48(4): 269-277.
- Maas, J. L., Ed. (1984). *Compendium of Strawberry Diseases*. The Disease Compendium Series of The American Phytopathological Society. The American Phytopathological Society.
- Magan, N. (2004). "Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents." *Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*. T.M. Butt, Jackson, C. and Magan, N. CABI Publishing: 239-251.
- Moser, R., I. Pertot, Y. Elad and R. Raffaelli (2008). "Farmers' attitudes toward the use of biocontrol agents in IPM strawberry production in three countries." *Biological Control* 47(2): 125-132.
- Ottesen, A.R., J.R. White, D.N. Skaltsas, M.J. Newell and C.S. Walsh (2009). "Impact of organic and conventional management on the phyllosphere microbial ecology of an apple crop." *Journal of Food Protection* 72(11): 2321-2325.
- Parikka, P. (2004). "Disease resistance in strawberry breeding programmes - major pathogens in European strawberry production." *Acta Horticulturae* 649: 49-52.
- Pauli, E. (2013). "Mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungen der Phyllosphäre im integrierten Erdbeeranbau." Masterthesis, Hochschule Geisenheim.

- Pertot, I., R. Zasso, L. Amsalem, M. Baldessari, G. Gino Angeli and Y. Elad (2008). "Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems." *Crop Protection* 27: 622-631.
- Pertot, I., F. Fiamingo, L. Amsalem, M. Maymon, S. Freeman, D. Gobbin and Y. Elad (2007). "Sensitivity of two *Podosphaera aphanis* populations to disease control agents." *Journal of Plant Pathology* 89(1): 85-96.
- Prokkola, S. and P. Kivijärvi (2007). "Effect of biological sprays on the incidence of grey mould, fruit yield and fruit quality in organic strawberry production." *Agricultural and Food Science* 16(1): 25-33.
- Robinson-Boyer, L., M.J. Jeger, X.-M. Xu and P. Jeffries (2009). "Management of strawberry grey mould using mixtures of biocontrol agents with different mechanisms of action." *Biocontrol Science and Technology* 19(10): 1051-1065.
- Romero, D., M.E. Rivera, F.M. Cazorla, A. De Vicente and A. Pérez-García (2003). "Effect of mycoparasitic fungi on the development of *Sphaerotheca fusca* in melon leaves." *Mycological Research* 107(1): 64-71.
- Schmid, F., G. Moser, H. Müller and G. Berg (2011). "Functional and structural microbial diversity in organic and conventional viticulture: organic farming benefits natural biocontrol agents." *Applied and Environmental Microbiology* 77(6): 2188-2191.
- Sesan, T. E. (2006). "Integrated control of strawberry diseases." *Phytopathologica Polonia* 39: 133-148.
- Shtienberg, D. and Y. Elad (1997). "Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea*." *Phytopathology* 87: 332-340.
- Strømeng, G.M., L.G. Hjeljord, A. Dobson, A. Stensvand and A. Tronsmo (2005). "Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry: factors influencing interactions between the pathogen and its fungal antagonists." *Proceedings of the International Workshop "Implementation of Biocontrol in Practice in Temperate Regions – Present and Near Future: 255-260.*
- Suda, W., A. Nagasaki and M. Shishido (2009). "Powdery mildew infection changes bacterial community composition in the phyllosphere." *Microbes and Environments* 24(3): 217-223.
- Sylla, J., B.W. Alsanus, E. Krüger, A. Reineke, M. Bischoff-Schaefer and W. Wohanka (2013). "Introduction of *Aureobasidium pullulans* to the phyllosphere of organically grown strawberries with focus on its establishment and interactions with the resident microbiome." *Agronomy* 3(4), 704-731.
- Sylla, J., W. Wohanka and E. Krüger-Steden (2012): "Schlussbericht zum Vorhaben: Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren - Teilprojekt: Graufäule und Echter Mehltau." Schlussbericht zum Projekt FKZ 06OE354.
- Tanovic, B., J. Milivojevic and M. Nikolic (2008). "Biological and chemical control of *Botrytis cinerea* in strawberry cv. 'Clery'." VI International Strawberry Symposium ISHS, Huelva, Spain.
- Trapp, M. (2013). "Pflanzenschutzmittelliste für den ökologischen Beerenobstanbau." http://www.foeko.de/Dokumente/ps_beerenobst.pdf (Stand Januar 2013).
- Vukovitz, G. (1980). *Obstkrankheiten - Teil IV Beerenobst*. Graz, Leopold Stocker Verlag.

- Walter, M., C.M. Frampton, K.S.H. Boyd-Wilson, P. Harris-Virgin and N.W. Waipara (2007). "Agrichemical impact on growth and survival of non-target apple phyllosphere microorganisms." *Canadian Journal of Microbiology* 53(1): 45-55.
- Weber, R. W. S. (2011). "Resistance of *Botrytis cinerea* to multiple fungicides in Northern German small-fruit production." *Plant Disease* 95(10): 1263-1269.
- Wooley, J.C., A. Godzik and I. Friedberg (2010). "A primer on metagenomics." *PLoS Comput Biol* 6(2): e1000667.
- Xiao, C.L., C.K. Chandler, J.F. Price, J.R. Duval, J.C. Mertely and D.E. Legard (2001). "Comparison of epidemics of *Botrytis* fruit rot and powdery mildew of strawberry in large plastic tunnel and field production systems." *Plant Disease* 85: 901-909.
- Xu, X., J. Robinson, M. Jeger and P. Jeffries (2010). "Using combinations of biocontrol agents to control *Botrytis cinerea* on strawberry leaves under fluctuating temperatures." *Biocontrol Science and Technology* 20(4): 359-373.
- Zhang, B., Z. Bai, D. Hoefel, L. Tang, X. Wang, B. Li, Z. Li and G. Zhuang (2009). "The impacts of cypermethrin pesticide application on the nontarget microbial community of the pepper plant phyllosphere." *Science of The Total Environment* 407(6): 1915-1922.
- Zimmer, J. (2008). pers. Mitt. (DLR-Rheinpfalz, Kompetenzzentrum Gartenbau, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Germany).

7 Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt

Internet

Projektinformationen zum "Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren - Teilprojekt: Graufäule und Echter Mehltau unter besonderer Berücksichtigung möglicher Wechselwirkungen" unter:

<http://orgprints.org/20795/>

<http://www.bundesprogramm-oekolandbau.de/forschungsmanagement/projektliste/pflanze/?fkz=11NA013&pos=254>

<http://www.bundesprogramm.de/fkz=06OE354>.

Schriftliche Veröffentlichungen

Justine Sylla, Beatrix W. Alsanius, Erika Krüger, Annette Reineke, Monika Bischoff-Schaefer and Walter Wohanka. 2013. Introduction of *Aureobasidium pullulans* to the phyllosphere of organically grown strawberries with focus on its establishment and interactions with the resident microbiome. *Agronomy* 3 (4): 704-731.

Justine Sylla, Beatrix W. Alsanius, Erika Krüger, Annette Reineke, Stephan Strohmeier and Walter Wohanka. 2013. Leaf microbiota of strawberries as affected by biological control agents. *Phytopathology* 103: 1001-1011.

Justine Sylla, Beatrix W. Alsanius, Erika Krüger, Dorit Becker and Walter Wohanka. 2013. *In vitro* compatibility of microbial agents for simultaneous application to control strawberry powdery mildew (*Podosphaera aphanis*). *Crop Protection* 51: 40-47.

Tagungsbandbeiträge

Justine Sylla, Erika Krüger und Walter Wohanka: Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren - Teilprojekt Graufäule und Echter Mehltau. Abschlussstagung zum Verbundprojektes Ökologischer Erdbeeranbau, Geisenheim, 18.-19. November 2013

Vorträge

Justine Sylla: Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren – Teilprojekt Graufäule und Echter Mehltau. Vorstellung der Projektergebnisse. Abschlussveranstaltung des Verbundprojektes Ökologischer Erdbeeranbau, 18.-19. November 2013, Geisenheim.

Justine Sylla, Beatrix W. Alsanius, Erika Krüger, Annette Reineke und Walter Wohanka. Einfluss von mikrobiellen Antagonisten auf die indigene Mikrobiota von Erdbeerblättern. 48. Gartenbauwissenschaftliche Tagung, 27. Februar - 1. März 2013, Bonn.

Monika Bischoff-Schaefer: Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren – Teilprojekt Graufäule und Echter Mehltau. Vorstellung der Projektergebnisse 2012. BÖL-Treffen, 24. Januar 2013, Geisenheim.

Justine Sylla: Erfahrungen zum experimentellen Einsatz von mikrobiologischen Präparaten gegen *Botrytis cinerea* an Erdbeeren unter Freilandbedingungen. DPG-Arbeitskreistagung Biologischer Pflanzenschutz von Pflanzenkrankheiten, 15.-16. März 2012, Einbeck.

Justine Sylla: Application of biocontrol agents to regulate grey mould and powdery mildew on strawberries. Microbial Horticulture Workshop, Université Laval, Québec, Canada, February 16-17, 2012.

Justine Sylla: Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren – Teilprojekt Graufäule und Echter Mehltau. Vorstellung der Projektergebnisse 2011. BÖL-Treffen, 28. November 2011, Geisenheim.

Justine Sylla, Beatrix W. Alsanius, Erika Krüger, Dorit Becker and Walter Wohanka: Application of biocontrol agents against grey mould on strawberries: interactions between biocontrol agents in the phyllosphere and their effects on the natural microflora. 1st International Symposium on Microbial Horticulture, Alnarp, Sweden, May 15-19, 2011, S13.

Justine Sylla: Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren – Teilprojekt Graufäule und Echter Mehltau. Vorstellung der Projektergebnisse 2010. BÖL-Treffen, 18. Januar 2011, Geisenheim.

Justine Sylla: Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren – Teilprojekt Graufäule und Echter Mehltau. Vorstellung der Projektergebnisse. BÖL-Treffen, 24. November 2009, Darmstadt.

Justine Sylla: Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren - Teilprojekt: Graufäule und Echter Mehltau. Projektvorstellung. Ökologische Beerenobsttagung, 4. März 2009, Weinsberg.

Justine Sylla: Einsatz mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Krankheiten an Erdbeeren. Projektvorstellung. DPG-Arbeitskreistagung Biologischer Pflanzenschutz von Pflanzenkrankheiten, 26.-27. März 2009, Berlin.

Poster

Justine Sylla, Beatrix W. Alsanius, Erika Krüger, Annette Reineke und Walter Wohanka: Leaf microbiota as affected by biological control agents. 10th International Congress of Plant Pathology, Beijing, China, August 25-30, 2013.

Justine Sylla, Erika Krüger, Beatrix W. Alsanius, Dorit Becker und Walter Wohanka. Mikrobiologische Untersuchungen der Erdbeerphyllosphäre nach Applikation von mikrobiologischen Präparaten zur Regulierung von Graufäule unter Freilandbedingungen. 58. Deutsche Pflanzenschutztagung, Braunschweig, 11.-14. September 2012.

Justine Sylla, Erika Krüger, Beatrix W. Alsanius, Dorit Becker and Walter Wohanka: Control of Strawberry Grey Mould by Biocontrol Agents and their Survival in the Phyllosphere. 7th International Strawberry Symposium, Beijing, China, February 18-22, 2012.

Justine Sylla, Erika Krüger, Beatrix W. Alsanius, Dorit Becker and Walter Wohanka: Einsatz und Kompatibilität Mikrobiologischer Präparate zur Regulierung von Graufäule und Echtem Mehltau an Erdbeeren unter Freilandbedingungen. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, Berlin, 6.-9. September 2010.

Justine Sylla, Erika Krüger, Beatrix W. Alsanius, Dorit Becker and Walter Wohanka: Compatibility of Biocontrol Agents With Regard to Their Efficacy Towards Grey Mould and Powdery Mildew on Strawberries. 28th International Horticultural Congress, Lisboa, Portugal, August 22-27, 2010.

Justine Sylla, Erika Krüger, Beatrix Alsanius, Dorit Becker and Walter Wohanka: Compatibility of biocontrol agents with regard to their efficiency towards grey mould and powdery mildew on strawberries. Meeting of the IOBC/WPRS Working Group "Biological control of fungal and bacterial plant pathogens ": Climate change: challenge or threat to biocontrol, Graz, Austria, June 7-10, 2010.

Justine Sylla, Erika Krüger-Steden, Beatrix Alsanius, Dorit Becker and Walter Wohanka: Compatibility of Biocontrol Agents - *in vitro*. μ HORT Research School, SLU Alnarp, Sweden, March 8-19, 2010.

Justine Sylla, Walter Wohanka, Erika Krüger-Steden and Dorit Becker: Application of Biocontrol Agents to Regulate Diseases on Strawberries. Grey Mould (*Botrytis cinerea*) and Powdery Mildew (*Podosphaera aphanis*). μ HORT Research School, SLU Alnarp, Sweden, September 7-18, 2009.