

EINSATZ DER BIOFUMIGATION IN ACKERBAUSYSTEMEN – VERSUCHE ZUR WIRKUNG GEGEN PFLANZENPARASITÄRE NEMATODEN

MATTHIAS DAUB¹, WOLFGANG SCHÜTZE², MICHAELA SCHLATHÖLTER³, RITA GROSCH⁴, JOHANNES HALLMANN⁵; ¹Julius Kühn-Institut (JKI), Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland, Dürener Straße 71, 50189 Elsdorf; ²JKI, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg; ³P. H. Petersen Saatzucht Lundsgaard GmbH, 24977 Grundhof; ⁴Leibniz-Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V. (IGZ), Echtermeyer Weg 1, 14979 Großbeeren; ⁵JKI, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik, Toppheideweg 88, 48161 Münster; E-Mail: matthias.daub@jki.bund.de

Einleitung

Pflanzenparasitäre Nematoden spielen in Ackerbaukulturen eine weitestgehend unterschätzte Rolle. Schäden durch Nematoden, die durch Symptome begleitet werden, sind häufig unspezifisch und an weniger beachteten Pflanzenorganen wie Wurzeln vorzufinden. Für *Heterodera schachtii* wurde der jährliche Schaden in Zuckerrüben innerhalb der EU auf ca. 90 Mio. € geschätzt (Müller 1999). Die Zahl der Meldungen durch die Pflanzenschutzdienste der Länder und Beratungsorganisationen von Schäden in Ackerkulturen wie Kartoffeln, Zuckerrüben und Getreide durch nicht-sedentäre Nematoden wie *Pratylenchus* spp., *Ditylenchus* spp., *Trichodorus* spp. und *Paratylenchus* nehmen in den letzten Jahren deutlich zu. Bis auf einige Ausnahmeregelungen sind Nematizide zur chemischen Bekämpfung von Nematoden in Deutschland nicht zugelassen.

Für Ackerbausysteme ist die Biofumigation in Deutschland ein bislang weitgehend neues Verfahren, das aber im Wesentlichen auf den bereits etablierten Zwischenfruchtbau aufbaut. Im Gegensatz zum Zwischenfruchtanbau wird der Pflanzenbestand zur Blüte gehäckselt, dann in den Boden eingearbeitet und schließlich wird die Bodenoberfläche verschlossen. Im Ackerbau können diese Arbeitsschritte mit einem Gerät in einem kombinierten Arbeitsgang durchgeführt werden. Zur prinzipiellen Wirkungsweise der Biofumigation sei an dieser Stelle auf den Beitrag von Schütze et al. in diesem Heft verwiesen.

Die Wirkung der Biofumigation gegen pflanzenparasitäre Nematoden ist vor allem für *Meloidogyne* gut dokumentiert, wobei Versuche hierzu häufiger unter kontrollierten

Bedingungen als im Feldversuch durchgeführt wurden (Ploeg 2007). Vor dem Hintergrund der pflanzen- und ackerbaulichen Möglichkeiten hatten die vorliegenden Untersuchungen zum Ziel, die Biofumigation für die Bedingungen des gemäßigten Klimas in Deutschland soweit zu optimieren, dass pflanzenparasitäre Nematoden effektiv bekämpft bzw. Schäden durch pflanzenparasitäre Nematoden verhindert werden können.

Methodik

Feldversuche. Von 2007 bis 2009 liefen auf verschiedenen Versuchsstandorten in der Voreifelregion Feldversuche zur Wirkung der Biofumigation auf konventionell bewirtschafteten Betrieben mit erhöhtem Auftreten durch den Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii* und dem Verursacher der Rübenkopffäule, *Ditylenchus dipsaci*. Auf zwei Flächen (A und B) in Rübenbaubetrieben wurden zweijährige Feldversuche durchgeführt. Im ersten Jahr wurde auf Fläche A als Zwischenfrüchte *Brassica juncea* (BJ) cv. Terraplus, Terrafit, Energy, *Raphanus sativus* (RS) cv. Defender, Adagio und die Saatmischungen Terraprotect RB (Sareptasenf cv. Energy + Ölrettich cv. Defender) und Terraprotect MB (Sareptasenf cv. Energy + Gelbsenf cv. Luna) eingesät, auf Fläche B *Brassica juncea* (BJ) cv. Terraplus, *Raphanus sativus* (RS) cv. Defender, Commodore, Contra, Dacapo und die Saatmischungen Terraprotect RB 1:1 oder 1:8 (Ölrettich cv. Defender + Sareptasenf cv. Terraplus). Im Spätsommer wurde mit den Zwischenfrüchten eine Biofumigation durchgeführt. Die Versuchsanlage bestand aus sieben Zwischenfrüchten plus Schwarzbrache als Kontrolle und wurde in Form eines lateinischen Rechtecks angelegt. Im zweiten Jahr erfolgte auf den Versuchsflächen der Anbau von Zuckerrübe cv. Pauletta, einer Sorte mit Toleranz gegen *H. schachtii* und Empfindlichkeit gegen *Ditylenchus dipsaci*. Im ersten Jahr wurde die Besatzdichte von *H. schachtii* und *D. dipsaci* vor der Saat (Pi) und zwei Wochen nach Biofumigation (Pf) sowie am Tag der Biofumigation die pflanzliche Biomasse und der Gehalt bzw. das Spektrum der Glucosinolate (GSL) bestimmt. Im zweiten Jahr wurden neben der Aufnahme der Nematodendichten der Rübenenertrag erfasst und die durch *D. dipsaci* verursachte Rübenkopffäule bonitiert.

Auf der Fläche A erfolgte eine Startdüngung im ersten Jahr mit 50-60 kg N/ha und die Biofumigation wurde im abgesetzten Verfahren in drei Arbeitsgängen durchgeführt. Auf der Fläche B wurde eine Startgabe von 50–60 kg N/ha und 20–30 kg S/ha über ASS gedüngt und die Biofumigation erfolgte in einem Arbeitsgang. Die Flächen wiesen eine schluffig, lehmige Bodentextur mit Humusgehalten von 2,0% auf.

In-vitro Test. Die Wirkung der in Glucosinolaten enthaltenen Isothiocyanate (ITC) auf frei bewegliche Stadien von *Meloidogyne hapla* wurde *in-vitro* untersucht. Hierzu wurden ca. 1000 Juvenile von *M. hapla* über 3 Stunden in Isothiocyanatlösungen mit Konzentrationen zwischen 0,001 µmol und 10 µmol inkubiert. Untersucht wurden Allylisothiocyanat, Benzylisothiocyanat, Butylisothiocyanat, Ethylisothiocyanat, Methylisothiocyanat, Phenylisothiocyanat, 2-Phenylethylisothiocyanat. Nach 24 Stunden Regeneration in Leitungswasser wurde die Aktivität/Inaktivität der Nematoden bestimmt.

Topfversuche. In einem zwei-faktoriellen Versuch wurde die Wirkung der Biofumigation mit Ölrettich (OR) cv. Contra und Sareptasenf (BJ) cv. Terrafit bei unterschiedlichen Temperaturen (10°C, 15°C, 20°C, 25°C) auf *M. hapla* untersucht. Dazu wurden 5000 Juvenile pro 1 L-Topf in gedämpfte Felderde gegeben. Danach wurden 15 g pflanzlicher Frischmasse in den Topf eingemischt und für 7 Tage bei entsprechend eingestellter Temperatur inkubiert. Danach wurde in jeden Topf eine vorgezogene Tomate cv. Moneymaker gepflanzt und alle Töpfe unter gleichen Bedingungen ins Gewächshaus gestellt. Achtundsechzig Tage nach dem Pflanzen wurde der Gallindex ermittelt.

Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe des Shapiro-Wilk W Tests auf Normalverteilung geprüft und die Varianzhomogenität mit dem Leven Test festgestellt. Bei Erfüllung der notwendigen Voraussetzung wurden Unterschiede zwischen Hauptprüffaktoren mit dem T-test analysiert. Nicht parametrische Verfahren (Kruskal-Wallis ANOVA und Mann Whitney U-test) kamen bei nicht normalverteilten Daten zur Anwendung. Die Berechnungen erfolgten mit der Software STATISTICA 6.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

Ergebnisse

Feldversuche. Die Wirkung der Biofumigation auf *H. schachtii* und *D. dipsaci* ist in der Abbildung 1 dargestellt. In beiden Jahren wurde eine signifikant höhere Vermehrung von *H. schachtii* durch den Anbau der Sareptasensorten Terraplus und Terrafit festgestellt. In 2007 lagen die Saatmischungen auf statistisch gleichem Niveau zur Kontrolle. Die Biofumigation mit den verwendeten Ölrettichsorten führte zu einem Rückgang von *H. schachtii* vergleichbar mit dem natürlichen Populationsrückgang der Schwarzbrache.

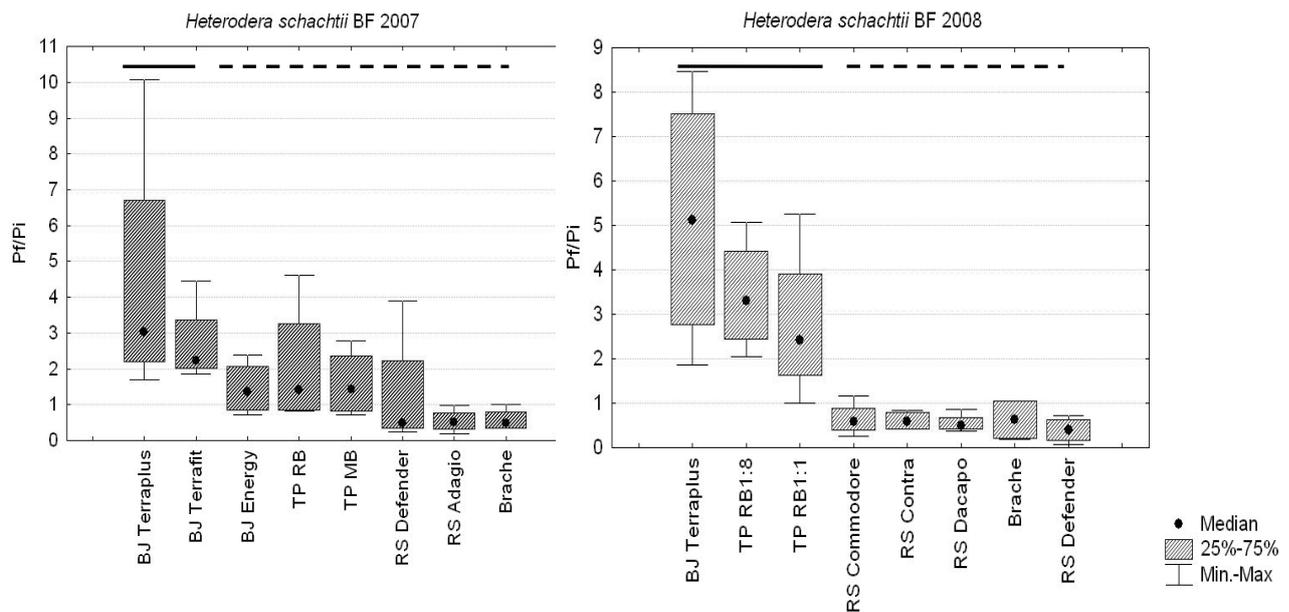


Abb. 1: Vermehrungsraten Pf/Pi von *Heterodera schachtii* nach Biofumigation mit *Brassica juncea* (BJ) cv. Terraplus, Terrafit, Energy, *Raphanus sativus* (RS) cv. Defender, Adagio, Commodore, Contra, Dacapo und den Saatmischungen Terraprotect RB (Sareptasenf cv. Energy + Ölrettich cv. Defender) und Terraprotect MB (Sareptasenf cv. Energy + Gelbsenf cv. Luna) und Terraprotect RB 1:1 oder 1:8 im Vergleich zur unkrautfreien Kontrolle (Brache) im Feldversuch 2007 und 2008; Werte unter dem gleichen Balken (— —) sind statistisch nicht signifikant unterschiedlich; Kruskal-Wallis ANOVA ($\alpha=0,05$).

Die Auswertung der Populationsdichten vor und nach Biofumigation von *D. dipsaci* war nur für die Fläche A im Jahr 2007 möglich. Eine statistisch signifikante Verringerung der Biofumigationsvarianten gegenüber der Kontrolle konnte nicht festgestellt werden. Eine Vermehrung der Population wurde nicht gefunden.

Im Vergleich zur Fläche A lagen die Glucosinolaterträge der Biofumigationspflanzen auf Fläche B deutlich höher, was möglicherweise auf die zusätzliche Düngung mit Schwefel zurückzuführen ist (Abb. 2). Insgesamt erreichten die Ölrettichsorten etwas höhere Glucosinolaterträge als Sareptasenf cv. Terraplus. Das wird auch im Vergleich der höheren Glucosinolaterträge zwischen der Saatmischung Terraprotect RB (Ölrettich cv. Defender + Sareptasenf cv. Terraplus) im Verhältnis Ölrettich zur Sareptasenf 1:1 und 1:8 deutlich.

Auf den Flächen A und B konnten nach Biofumigation mit den Ölrettichsorten Adagio, Commodore und Dacapo sowie Sareptasenf Terrafit signifikant höhere Erträge mit

Zuckerrübe cv. Pauletta erzielt werden als in der Kontrolle (Tab. 1) Die Unterschiede zwischen der ertragsreichsten und ertragsärmste Variante (Sortenniveau) betragen 13%–14%.

Trotz 100% Befallshäufigkeit der Zuckerrüben mit *D. dipsaci* auf beiden Rübenflächen konnten deutliche Unterschiede in der Ausprägung der durch *D. dipsaci* verursachten Rübenkopffäule beobachtet werden. Auf Fläche A schwankte die Rübenkopffäule zwischen 18% in der Brache und 14% nach Sareptasenf cv. Terrafit und auf Fläche B zwischen 22% in der Brache und 12% nach der 1:1 Saatmischung von Sareptasenf cv. Terraplus mit Ölrettich cv. Defender.

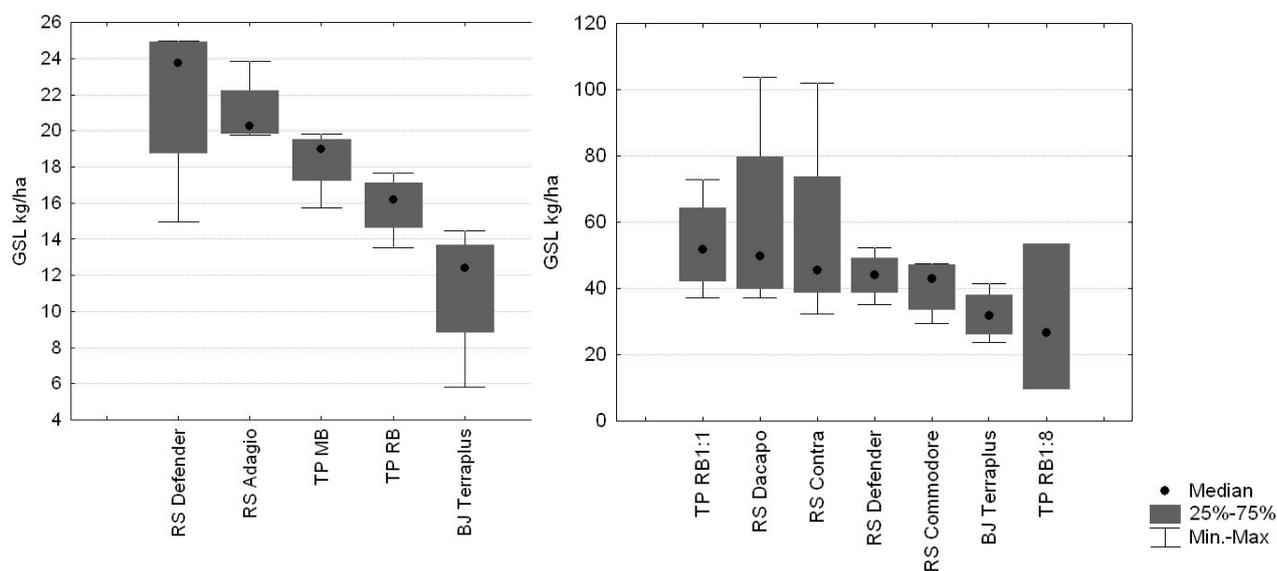


Abb. 2: Glucosinolaterträge in kg/ha verschiedener Sorten von *Brassica juncea* (BJ), *Raphanus sativus* (RS) sowie den Saatmischungen Terraprotect RB und Terraprotect MB im Feldversuch 2007 und 2008.

Tabelle 1: Relative Erträge der Zuckerrübensorte Pauletta im Vergleich zur Kontrolle (= 100%) nach Biofumigation mit Ölrettich, Sareptasenf und den Saadmischung Terraprotect (Sareptasenf und Ölrettich) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf Betrieb A und B

	2008 (A)	2009 (B)
Ölrettich	111	112
Sareptasenf	101	111
Terraprotect	103	108
Kontrolle	100	100

In-vitro Test. In der niedrigsten Konzentrationsstufe von 0,01 μmol lag die Mortalität der *M. hapla*-Juvenilen mit 100% bei Behandlung mit Allylisothiocyanat signifikant über der Mortalität bei Behandlung mit Benzylisothiocyanat (Abb. 3). Alle übrigen Isothiocyanate führten zu signifikant geringeren Mortalitäten und lagen damit auf dem Niveau der beiden Kontrollen. Bei hohen Konzentrationen von 10 μmol konnten bei allen getesteten Varianten maximale Mortalitäten erreicht werden.

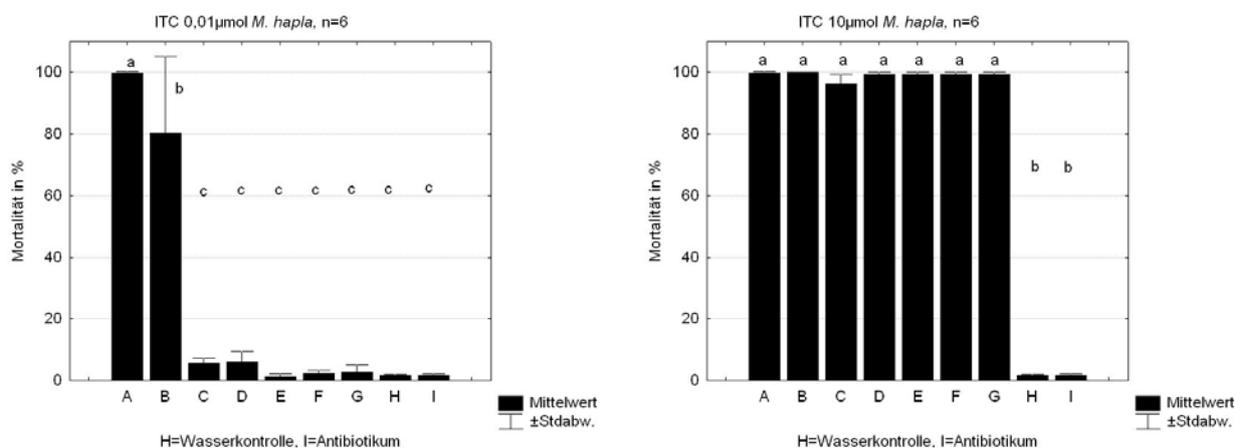


Abb. 3: Mortalität von *Meloidogyne hapla*-Juvenilen nach Behandlung für 3 Stunden mit 0,01 μmol (I) bzw. 10 μmol (II) von A) Allylisothiocyanat, B) Benzylisothiocyanat, C) Butylisothiocyanat, D) Ethylisothiocyanat, E) Methylisothiocyanat, F) Phenylisothiocyanat, G) 2-Phenyylethylisothiocyanat und nachfolgender Regeneration in Leitungswasser für 24 h. Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede an; Mann Whitney U-Test ($\alpha=0,05$).

Topfversuche. In beiden Experimenten konnte durch Biofumigation mit Pflanzenfrischmasse ein signifikant niedrigerer Gallindex gegenüber der Kontrolle erreicht werden (Abb. 4).

Innerhalb der Behandlungen zeigte sich bei *B. juncea* zusätzlich ein signifikanter Einfluss der Temperatur; bei 20°C und 25°C war der Gallindex geringer als bei 10°C bzw. 15°C.

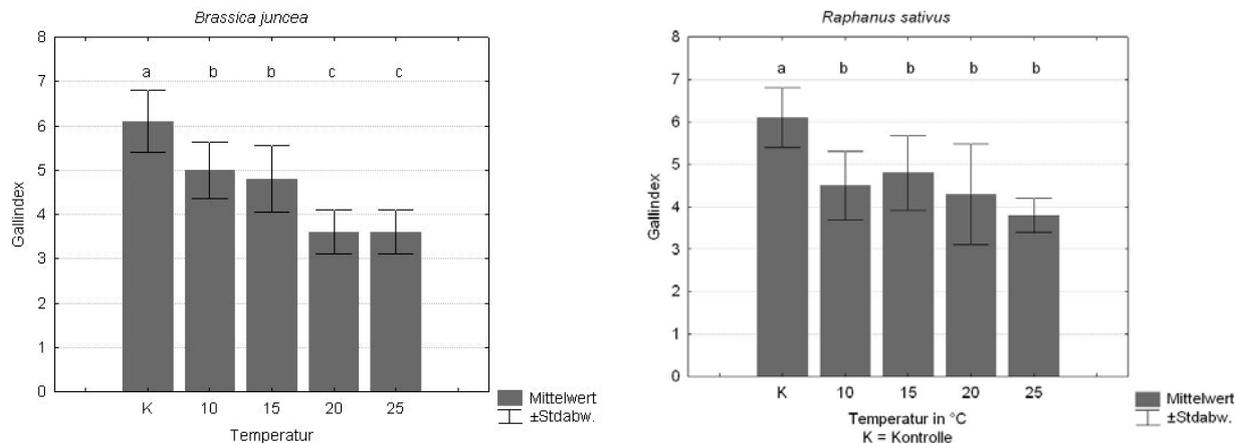


Abb. 4: Gallindex an Tomate cv. Moneymaker nach Biofumigation mit Frischmasse von *Brassica juncea* cv. Terrafit (I) und *Raphanus sativus* cv. Contra (II) bei unterschiedlichen Temperaturen sowie der Kontrolle ohne Biofumigation. Verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede an; T-Test ($\alpha=0,05$).

Diskussion

Eine Unterdrückung pflanzenparasitärer Nematoden durch Biofumigation bzw. der daran beteiligten Isothiocyanate wurde sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* für verschiedene Nematodenarten nachgewiesen, darunter *Meloidogyne chitwoodi*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica*, *H. schachtii*, *Caenorhabditis elegans*, *Pratylenchus neglectus*, *Globodera rostochiensis* und *Xiphinema americanum* (Chitwood 2002, Curto et al. 2005). Je nach Isothiocyanat kann die Wirkung um den Faktor 10 bis 400 differenzieren (Lazzeri et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden die höchsten Mortalitätsraten von *M. hapla* mit Allyl- und Benzylisothiocyanat erzielt, wobei bereits Konzentrationen von 0,01 μmol eine vollständige Mortalität der Juvenilen bewirkte. Konzentrationen von 0,01 μmol werden allgemein als ausreichend für eine Wirkung gegen bodenbürtige Schaderreger angesehen (Gimsing und Kirgegaard 2009).

Neben der direkten Wirkung von Isothiocyanaten auf *M. hapla* konnte in Gewächshausversuchen auch eine Wirkung von Biofumigation mit Ölettich und Sareptasenf gegen *M. hapla* beobachtet werden. Eine positive Wirkung von Biofumigation mit Brassica-Arten gegen *Meloidogyne* spp. ist auch aus anderen Gewächshausversuchen bekannt (Zasada und Ferris 2004, Roubtsova et al. 2007). Die Bildung von Isothiocyanaten aus Glucosinolaten wird durch das Enzym Myrosinase katalysiert. Die Aktivität der Myrosinase wiederum ist

temperaturabhängig, so dass bei wärmeren Temperaturen auch eine bessere Wirkung der Biofumigation zu erwarten ist. Dies hat sich in Gewächshausversuchen mit Sareptasenf bestätigt. Bei 20°C und 25°C war die Wirkung der Biofumigation gegen *M. hapla* signifikant höher als bei 10°C und 15°C. Aus Versuchen dieser Art leiteten Ploeg und Stapleton (2001) als optimale Bodentemperatur für Biofumigation 25°C ab.

In Ackerbausystemen kann eine Zwischenfrucht zur Biofumigation im Allgemeinen nur nach einer frühräumenden Vorkultur, wie z. B. Wintergerste, angebaut werden. Die Bodentemperaturen in 10 cm Tiefe liegen aber nur im Zeitraum Ende Juni bis Anfang August oberhalb von 22°C (Durchschnitt 2000-2009, JKI Wetterstation in Elsdorf/Rheinland). Da die Aussaat wie in den hier untersuchten Fällen auf Fläche A und B aber erst im August erfolgen konnte, war die Biofumigation erst Mitte bis Ende September möglich, d. h. bei Bodentemperaturen < 13°C. Dies könnte erklären, weshalb die Biofumigation keine oder nur eine geringe Wirkung auf *H. schachtii* und *D. dipsaci* zeigte. Bei Ölrettich kommt hinzu, dass im Falle von *H. schachtii* nicht immer eindeutig zwischen der möglichen Wirkung der Biofumigation und der Resistenz der Sorte unterschieden werden kann. In beiden Feldversuchen konnten sich mit über 4 t/ha Trockenmasse gute Bestände entwickeln, d. h. Biomasse war reichlich vorhanden. Allerdings war es zum Zeitpunkt der Einarbeitung relativ trocken. Dies könnte ein weiterer Grund für die geringe Wirkung sein, denn für die hydrolytische Spaltung der Glucosinolate ist Wasser erforderlich.

Auf der Fläche B wurden insgesamt höhere Glucosinolatmengen erzielt als auf Fläche A. Möglicherweise hat die zusätzliche Schwefeldüngung auf Fläche B hierzu mit beigetragen. Die positive Wirkung einer Schwefeldüngung auf die Glucosinolatgehalte in Pflanzen ist jedenfalls gut dokumentiert (Falk et al. 2007, Harding 2008, siehe auch Beitrag von Schütze et al. in diesem Heft). Die teils signifikanten Ertragssteigerungen bei Zuckerrüben nach Biofumigation deuten auf eher unspezifische Effekte hin, da weder Nematodendichten im Boden noch die Rübenkopffäule deutlich reduziert wurde. Effekte der Zwischenfrüchte auf die Bodenfruchtbarkeit oder andere ertragsbeeinflussende Schaderreger wurden hier nicht untersucht, sind aber aus anderen Studien bekannt (Owen et al. 2010, Benson et al. 2009).

Eine Bekämpfung pflanzenparasitärer Nematoden konnte unter kontrollierten Bedingungen mit Isothiocyanaten, als auch im Gewächshausversuch mit Biofumigation nachgewiesen werden. Im Freiland wurden zwar teils höhere Rübenenerträge nach Biofumigation beobachtet,

doch war dieser Effekt unabhängig von einer Reduzierung der Nematodendichten im Boden. Mögliche Ursachen für das schlechte Abschneiden der Biofumigation im Feld könnten die bereits niedrigen Temperaturen zum Zeitpunkt der Einarbeitung bzw. unzureichende Bodenfeuchtigkeit sein. Kann die Biofumigation dagegen in den warmen Sommermonaten erfolgen, oder sogar mit Folienabdeckung (Solarisation) kombiniert werden, ist auch eine bessere Wirkung gegen pflanzenparasitäre Nematoden zu erwarten. In jedem Falle ist auf eine optimale Saatbettbereitung, einen guten Pflanzenaufwuchs, eine optimale Schwefeldüngung sowie eine adäquate Biofumigationstechnik zu achten.

Literatur

- Bensen T.A., Smith R.F., Subbarao K.V., Koike S.T., Fennimore S.A., Shem-Tov S. (2009). Mustard and other cover crop effects vary on lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* and on weeds. *Plant Disease* 93: 1019-1027.
- Chitwood D. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. *Annual Review of Phytopathology* 40: 221-249.
- Curto G., Dallavalle E., Lazzeri L. (2005). Life cycle duration of *Meloidogyne incognita* and host status of Brassicaceae and Capparaceae selected for glucosinolate content. *Nematology* 7: 203-212.
- Falk K. L., Tokuhisa J. G., Gershenzon J. (2007). The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: physiology and molecular mechanisms. *Plant Biology* 9: 573-581.
- Gimsing A.L., Kirgegaard J.A. (2009). Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Reviews* 8: 299-310.
- Lazzeri L., Curto G., Leoni O., Dallavalle E. (2004). Effects of Glucosinolates and their enzymatic hydrolysis products via myrosinase on the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White) Chitw. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 52: 6703-6707.
- Müller J. (1999). The economic importance of *Heterodera schachtii* in Europe. *Helminthologica* 36: 205-213.
- Owen K.J., Clewett T.G., Thompson J.P. (2010). Pre-cropping with canola decreased *Pratylenchus thornei* populations, arbuscular mycorrhizal fungi, and yield of wheat. *Crop and Pasture Science* 61: 399-410.
- Ploeg A. (2007). Biofumigation to manage plant-parasitic nematodes. In: Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops. Eds. Ciancio, A. and Mukerji, K.G., Springer Verlag, 239-248.
- Ploeg A.T., Stapleton J. (2001). Glasshouse studies on the effect time, temperature and amendment of soil with broccoli plant residues on the infestation of melon plants by *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *Nematology* 3: 855-861.

- Roubtsova T., López-Pérez J.A., Edwards S., Ploeg A. (2007). Effect of Broccoli (*Brassica oleracea*) tissue, incorporated at different depths in a soil column, on *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 39: 111-117.
- Zasada I.A., Ferris H. (2004). Nematode suppression with brassicaceous amendments: application based upon glucosinolate profiles. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1017-1024.