

## Effekte von Apfelanbau auf Bodenmikroorganismen und Wurzelendophyten

Diese Artikelserie beschäftigt sich mit der Nachbaukrankheit bei Apfel, die häufig auch Bodenmüdigkeit genannt wird und den Baumschulen, die Unterlagen oder Veredelungen kultivieren, und den Apfelbauern weltweit Probleme bereitet. In dem vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen der Ausschreibung BonaRes geförderten Projekt ORDIAmur arbeiten seit 2015 Wissenschaftler/innen unterschiedlicher Disziplinen und Betriebe zusammen, um die Nachbaukrankheit besser zu verstehen und um Gegenmaßnahmen zu entwickeln ([www.ordiamur.de](http://www.ordiamur.de)). Während es im letzten Artikel um die Reaktion von Apfelpflanzen auf nachbaukranke Böden ging, wird hier der Fokus auf den Mikroorganismen liegen, denen eine entscheidende Bedeutung zukommt. Dies kann aus der Tatsache geschlossen werden, dass Bodendesinfektion die Nachbaukrankheit aufhebt – sei es durch Dämpfung, den Einsatz von Basamid® Granulat (wie bisher oft in der gärtnerischen Praxis üblich) oder durch Gammabestrahlung für Forschungszwecke. Es muss also biologische Ursachen für die Nachbaukrankheit geben. Die Veränderungen, die ORDIAmur bezüglich der Mikroorganismen im Boden und in Apfelwurzeln im Zusammenhang mit der Nachbaukrankheit identifiziert hat, werden im Folgenden beleuchtet.

### 1. Effekt der Nachbaukrankheit auf das Bodenmikrobiom

#### 1.1 Was ist das Bodenmikrobiom

Böden gehören zu den wichtigsten Biodiversitätshotspots auf der Erde. In nur einem Gramm Boden leben mehr als eine Milliarde Kleinstlebewesen. Hierzu zählen neben Bakterien, Pilzen, Oomyceten (Eipilzen), Archaea (= Einzeller ohne echten Zellkern) auch Protisten (= Einzeller mit echtem Zellkern) und Nematoden. Alle diese Organismen sind sehr klein sind (<5 µm) und viele können nur durch molekulare Verfahren entdeckt werden, da sie sich nicht kultivieren lassen. Die Vielfalt an Mikroorganismen ist auch die Basis für wichtige Ökosystemdienstleistungen, die von Böden erbracht werden und ohne die ein Leben insbesondere von uns Menschen auf der Erde unmöglich wäre. Hierzu zählen neben der Nutzung von Böden als Produktionsstandort für pflanzliche Biomasse und pflanzliche Produkte auch die Fähigkeit von Böden Kohlenstoff zu speichern, Schadstoffe abzubauen oder Nährstoffe umzusetzen. Um die Multifunktionalität von Böden zu nutzen und zu erhalten, ist es erforderlich, dass zukünftige Managementstrategien das Potential von Mikroorganismen berücksichtigen, da viele Bodenleistungen erst durch Mikroorganismen möglich sind. Das gesamte genetische Potential zusammen mit der organismischen Vielfalt an Mikroorganismen wird als Mikrobiom des Bodens bezeichnet.

#### 1.2 Apfelnachbau führt zum Ungleichgewicht des Bodenmikrobioms

Da die verfügbare Anbaufläche für Äpfel und verwandte (Obst-)Gehölze begrenzt ist, wird weltweit üblicherweise Apfel auf Flächen nachgebaut, auf denen bereits zuvor Apfel kultiviert wurde. Durch diesen wiederholten Anbau bildet sich die sogenannte Bodenmüdigkeit, auf

## Serie „Müde Böden beim Nachbau von Äpfeln“ – Teil 5

- Berichte für die Praxis aus dem Projekt ORDIAmur -

Englisch „Apple Replant Disease“ (ARD) aus, bei der sich die Zusammensetzung des Mikrobioms der Wurzeln und des angrenzenden Bodens ändern. Dabei kommt es zu einer Verschiebung in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft hin zu potentiell für die Apfelpflanzen schädlichen Mikroorganismen bzw. zu einer Abnahme von pflanzenwachstumsfördernden Organismen. Je öfter der Nachbau von Apfelpflanzen erfolgt, desto ausgeprägter wird dieses Ungleichgewicht und gleichzeitig nimmt die Vielfalt an Mikroorganismen im Boden ab. Dieses Ungleichgewicht der mikrobiellen Gemeinschaft wird als Dysbiose bezeichnet. Obwohl ARD in Baumschul- und Apfelanbauregionen weltweit auftritt, unterscheiden sich die Veränderungen im Bodenmikrobiom von Standort zu Standort, was es erschwert, Krankheitsauslöser zweifelsfrei zu identifizieren. Es wird vermutet, dass die Krankheit an der Kontaktstelle zwischen Pflanze und im von der Pflanze beeinflussten Boden ausgelöst wird und in dieser sogenannten Rhizosphäre die Veränderungen im Mikrobiom induziert werden.

Statt den Boden zu desinfizieren und alle Mikroorganismen abzutöten, sollte der Fokus allerdings bevorzugt darauf liegen, die mikrobielle und pflanzliche Biodiversität auf den Anbauflächen möglichst hoch zu halten. Immer mehr Untersuchungen weisen darauf hin, dass für den Erhalt gesunder und ertragreicher Böden das Mikrobiom eine ausschlaggebende Rolle spielt und dass sich gesunde Böden durch eine hohe Vielfalt an Mikroorganismen auszeichnen.

Potentielle Pathogene, die häufig in nachbaukranken Böden gefunden wurden, gehören zu Pilzen, Oomyceten und Bakterien (**Abb. 1**). Die Tatsache, dass diese Organismen in erhöhter Anzahl in ARD-Böden vorkommen, bedeutet allerdings nicht, dass diese auch die Krankheit auslösen. Einige der genannten Pilz-, Oomyceten- und Bakteriengattungen enthalten Arten, die zur Ausbildung der Nachbaukrankheit beitragen könnten, aber auch Arten, die nützlich für die Pflanzen sind, und solche, die womöglich nur das veränderte Nahrungsangebot im Boden nutzen. Es gilt herauszufinden, welche der genannten Mikroorganismen zu welcher der drei Gruppen gehören. Möglicherweise kann die Bodenmüdigkeit verringert oder überwunden werden, wenn die mikrobielle Diversität im Boden wieder erhöht und so das Bodenmikrobiom zurück ins Gleichgewicht gebracht wird. Der Anbau von Zwischenfrüchten oder Untersaaten oder der Einsatz pflanzenwachstumsfördernder Bakterien und Pilze, sogenannter Biostimulanzien, wären Maßnahmen, um dies zu erreichen.

In einem Topfversuch konnte gezeigt werden, dass der Anbau und die Einarbeitung von einer Zwischenfruchtmischung vor der Pflanzung von Apfel in ARD-Böden dazu führte, dass die mikrobielle Aktivität im Boden signifikant erhöht wurde. Außerdem konnte durch die Einarbeitung der Zwischenfrüchte das Wurzelwachstum der Apfelpflanzen deutlich verbessert werden. Erste Ergebnisse aus Versuchen mit Biostimulanzien weisen darauf hin, dass die Zugabe einer Mischung aus nützlichen Bakterien und Pilzen weitaus effektiver ist als die Applikation der jeweiligen einzelnen Stämme. Die Anwendung der Biostimulanzien als Konsortium aus Pilzen und Bakterien wie auch die Einarbeitung der Zwischenfruchtmischung führten dazu, dass sich das Mikrobiom in seiner Zusammensetzung deutlich vom unbehandelten ARD-Boden unterschied und die Anzahl von potentiell nützlichen Bakterien wie *Bradyrhizobium*, *Sphingomonas* oder *Pseudathrobacter* erhöht wurde.

Diese Unterschiede in der Zusammensetzung des Boden-Mikrobioms wurden auch in sogenannten Split-Root-Versuchen nachgewiesen. In diesen waren einzelne Pflanzen mit ihrem Wurzelsystem sowohl ARD-Böden als auch nicht nachbaukranken Boden vom gleichen Standort ausgesetzt (**Abb. 2**). Beobachtungen zeigten, dass nur die Apfelwurzeln in direktem

Kontakt mit ARD-Böden stark betroffen waren von i) einem stark reduzierten Wurzelwachstum, ii) einer hohen Pflanzenabwehr-Reaktion und iii) einem dysbiotischen Mikrobiom. Dieses Mikrobiom zeichnete sich unter anderem besonders durch ein erhöhtes Vorkommen von Bakterien der Gattungen *Streptomyces* und *Variovorax* aus. Im Gegensatz dazu zeigten die Wurzeln der gleichen Pflanze auf der anderen Seite der Split-Root Kammer keine ARD-Symptome.

### 1.3 Apfelnachbau stört die Funktion des Mikrobioms

Nicht nur die bloße Anwesenheit von Mikroorganismen im Boden, sondern auch die von ihnen ausgeübten Funktionen sind wichtig zu erforschen. In einem weiteren Experiment mit M26 Apfelunterlagen wurde ein nachbaukranker Boden mit einem nicht nachbaukranken Boden verglichen. Was die Proben unterschied, war eine Reihe funktioneller (genetischer) Unterschiede des Bodenmikrobioms (Abb. 3): Unter anderem war in nachbaukranken Böden ein Anstieg bei Genen der Stressantwort zu erkennen, während in nicht nachbaukranken Böden Gene für die Wahrnehmung und die Aufnahme von Nährstoffen dominierten. Zudem kamen Gene, die für den Abbau aromatischer Verbindungen wichtig sind, in ARD-Böden deutlich weniger vor. Das ist besonders interessant, da Apfelunterlagen viele phenolische (aromatische) Verbindungen produzieren, darunter auch Phytoalexine, die mit Abwehrreaktionen zusammenhängen und mit dem Auftreten von ARD in Verbindung gebracht wurden (s. auch Teil 3 dieser Serie). Diese Ergebnisse bedeuten, dass mögliche Bekämpfungsmaßnahmen von ARD auch diese Verschiebungen in der Funktionalität des Bodenmikrobioms miteinschließen müssen und Inokulationsstrategien mit „Probiotika“ darauf abzielen sollten, die funktionelle Vielfalt des gesunden Bodenmikrobioms wiederherzustellen.

## **2. Effekte der Nachbaukrankheit auf die Endophyten-Gemeinschaft**

Doch nicht nur die Mikroorganismen im wurzelnahen Raum sind von der Nachbaukrankheit betroffen, sondern auch solche innerhalb der Wurzeln, sogenannte Endophyten.

### 2.1 Was sind Endophyten

Heutzutage geht man davon aus, dass jede Pflanze von Mikroorganismen besiedelt ist. Diese Mikroorganismen, die ihr ganzes Leben oder zeitweise das Pflanzeninnere bewohnen, werden Endophyten genannt. Es gibt mehrere Wege, wie Endophyten Pflanzen kolonisieren können, der Wichtigste ist jedoch die Rhizosphäre. Von hier aus können beispielsweise Bakterien, Pilze oder Oomyceten durch natürliche Öffnungen oder Wunden der Wurzeln in die Pflanze gelangen. Innerhalb der Pflanze können Endophyten unterschiedliche Wirkungen auf die Pflanze haben. Ein Großteil der Endophyten sind solche, die keinerlei Effekte auf die Pflanze haben. Bekannt sind aber auch Endophyten, die einen positiven Effekt auf die Pflanze haben und als „pflanzenwachstumsfördernd“ bezeichnet werden. Neben diesen positiven Effekten können Endophyten allerdings auch negative Effekte auf die Pflanze haben und beispielsweise Nekrosen auslösen, Toxine produzieren oder das Pflanzenwachstum negativ beeinflussen. Ob ein Endophyt einen positiven oder negativen Effekt hat, ist abhängig von diversen Faktoren wie z.B. verschiedenen Umwelteinflüssen, dem Entwicklungsstand von Endophyt oder Pflanze oder auch Pflanzenabwehrreaktionen. Aufgrund dieser vielfältigen Effekte von Endophyten auf die Pflanze ist es wichtig, die Rolle von Endophyten in der Nachbaukrankheit zu klären.

### 2.2 Veränderte bakterielle Endophyten-Gemeinschaften in nachbaukranken Apfelwurzeln

In Versuchen wurden Apfelwurzeln sowohl aus nachbaukranken als auch nicht nachbaukranken Böden untersucht, um Unterschiede in deren endophytischen Gemeinschaften aufzuzeigen. Als nicht nachbaukranken Böden dienten hierbei Böden vom gleichen Ort ohne Apfelanbauhistorie oder mittels Gammabestahlung desinfizierte ARD-Böden. Die Oberfläche der Wurzeln wurde im Labor desinfiziert, sodass für die folgenden Analysen nur die noch innerhalb der Wurzel befindlichen Mikroorganismen berücksichtigt wurden. Mit modernen Sequenzierungsverfahren wurden die Gattungen der Mikroorganismen sowie deren prozentualer Anteil am gesamten Endophyten-Biom bestimmt.

Bei den bakteriellen Endophyten stachen vor allem drei Gattungen heraus, deren relativer Anteil in Wurzeln aus nachbaukranken Boden gegenüber nicht nachbaukranken Boden deutlich erhöht war: *Rhizobium*, *Pseudomonas* und *Streptomyces*. Die Gattung *Streptomyces* steht auch mit wachstumsfördernden Effekten an Pflanzen in Verbindung durch die Abwehr von Pathogenen. Allerdings sind in dieser Gattung auch Pflanzenpathogene bekannt wie *S. scabies*, der Erreger des Kartoffelschorfs. Besonders für *Streptomyces* wurde eine starke Erhöhung des relativen Anteils in nachbaukranken Wurzeln beobachtet. Diese Erhöhung konnte bisher in allen untersuchten ARD-Böden und Apfelunterlagen bestätigt werden (**Abb. 4**).

Der wiederholte, lückenlose Befund erhöhter relativer Häufigkeiten von *Streptomyces* innerhalb nachbaukranker Apfelwurzeln macht diese Gattung zu einem interessanten Kandidaten im Krankheitskomplex von ARD. Außerdem konnte mittels Mikroskopie gezeigt werden, dass Aktinobakterien, die Bakteriengruppe, zu der *Streptomyces* gehört, hauptsächlich die symptomatischen Bereiche nachbaukranker Wurzeln besiedeln (**Abb. 5**). Allerdings sind die bisherigen Daten nicht ausreichend, um Aussagen über die Effekte dieser Bakteriengattung auf die Pflanze zu treffen: Sie könnten als Schadorganismen auftreten oder lediglich die phenolischen Stoffwechselprodukte der Apfelwurzeln abbauen. Auch ist es möglich, dass sie als „Türöffner“ anderen Schadorganismen Zutritt zur Pflanze verschaffen. Um der Antwort auf diese Frage näher zu kommen, sind Isolate einzelner Stämme und die anschließende Beimpfung von Pflanzen nötig. Aktuell laufen Versuche, endophytische *Streptomyces* Stämme aus kranken Apfelwurzeln zu isolieren.

### 2.3 Einfluss von der Nachbaukrankheit auf die pilzliche Endophyten-Gemeinschaft

Neben bakteriellen Endophyten wird auch die Rolle der pilzlichen Endophyten in der Nachbaukrankheit untersucht. Hier zeigte sich, dass es Gruppen von endophytischen Pilzen und Oomyceten gibt, die mit Apfelwurzeln und der Nachbaukrankheit assoziiert sind: Pilze aus der Ordnung Helotiales und der Familie Nectriaceae, hier v.a. *Fusarium* sowie *Ilyonectria* und *Dactylonectria*. In Isolationsversuchen im Rahmen dieses Projektes war vor allem der Anteil der Nectriaceae deutlich größer in Apfelwurzeln, die in nachbaukranken Boden wuchsen, im Vergleich zu Apfelwurzeln aus nicht nachbaukranken Boden des gleichen Standorts. Mikroskopische Untersuchungen von Dünnschnitten nachbaukranker Wurzeln wiesen diese Gruppe von Pilzen ebenfalls in Zusammenhang mit Gewebeveränderungen nach.

Zudem konnte mittels moderner Sequenzierverfahren gezeigt werden, dass es zu einer Verschiebung der Häufigkeit unterschiedlicher Pilze kommt. Dabei sind in erster Linie die Familie der Nectriaceae und die Ordnung Helotiales zu nennen, in Übereinstimmung mit

## Serie „Müde Böden beim Nachbau von Äpfeln“ – Teil 5

- Berichte für die Praxis aus dem Projekt ORDIAmur -



unseren vorherigen Ergebnissen der Pilzisolierung und den Untersuchungen zur Pilz-Gemeinschaft der Rhizosphäre. Viele dieser Pilze sind mögliche Schaderreger. Ein interessanter Aspekt dieser Betrachtung ist die Frage, ob die Verschiebung des endophytischen Pilz-Mikrobioms Ursache oder Folge der Krankheit ist.

Neben den zuvor beschriebenen schädlichen Pilzen gibt es aber auch pilzliche Endophyten, die einen positiven Effekt auf die Pflanzengesundheit haben und somit einen Beitrag zur Minderung der Nachbaukrankheit leisten könnten, dazu gehören Mykorrhiza-Pilze. Die Mykorrhiza entwickelt sich in Feinwurzeln (**Abb. 6**) und wirkt in Form einer Biofertilisation: Der Pilz liefert der Pflanze wichtige Nährstoffe und verbessert die Wasseraufnahme im Austausch von Zuckern aus dem Pflanzenstoffwechsel. Zusätzlich besitzt die Mykorrhiza das Potential zum Schutz vor Schaderregern unter anderen dadurch, dass durch die Besiedlung der Wurzelzellen die Fläche reduziert wird, welche Wurzelpathogenen für Infektionen zur Verfügung steht, und durch induzierte Abwehr. In Gewächshausversuchen konnte ein positiver Effekt von applizierten Mykorrhiza-Pilzen auf Apfelpflanzen in nachbaukrankem Boden festgestellt werden.

### 4. Fazit

Der Anbau und der Nachbau von Apfel führt aufgrund der Wurzelausscheidungen und im Nachbau ggf. auch aufgrund von sich zersetzenden Wurzelresten zu Verschiebungen der mikrobiellen Gemeinschaften im Boden und in den Wurzeln selbst. Auch freilebende Nematoden (siehe Teil 6 der Serie) könnten zu diesen Verschiebungen beitragen. Diese neuen Gemeinschaften stellen einen dysbiotischen Zustand dar, der vermutlich die Folgekultur negativ beeinflusst. Gegenmaßnahmen gegen die Nachbaukrankheit sollten darauf abzielen, eines diverseres, „gesundes“ Bodenmikrobiom wiederherzustellen, von dem die im ARD-Boden fehlenden Funktionen übernommen werden können. ORDIAmur testet daher Zwischenfruchtanbau und Inokulationen von Wurzeln und Böden in enger Zusammenarbeit mit Betrieben, für deren Entgegenkommen wir sehr dankbar sind.

### Autoren:

Felix Mahnkopp-Dirks, Michael Schloter, Sarah Benning, Kristin Hauschild, Kornelia Smalla, Nils Orth, Alicia Balbín-Suárez, Tom Pielhop, Carolin Popp, Gisela Grunewaldt-Stöcker, Edgar Maiß, Traud Winkelmann, Andreas Wrede

### Literatur:

Balbín-Suárez, A., Jacquiod, S., Rohr, A.D., Liu, B., Flachowsky, H., Winkelmann, T., Beerhues, L., Nesme, J., Sørensen, S.J., Vetterlein, D., And K. Smalla (2021): Root exposure to apple replant disease soil triggers local defense response and rhizoplane microbiota dysbiosis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2021; Volume 97, Issue 4, April 2021. fiab031 <https://doi.org/10.1093/femsec/fiab031>

Mahnkopp-Dirks, F., Winkelmann, T. (2022): Welche Rolle spielen Bakterien der Gattung *Streptomyces* in der Nachbaukrankheit bei Apfel? *Versuchsberichte Baumschule und Obstbau* Jahrgang 2021; S. 26 - 31



## Serie „Müde Böden beim Nachbau von Äpfeln“ – Teil 5

- Berichte für die Praxis aus dem Projekt ORDIAmur -



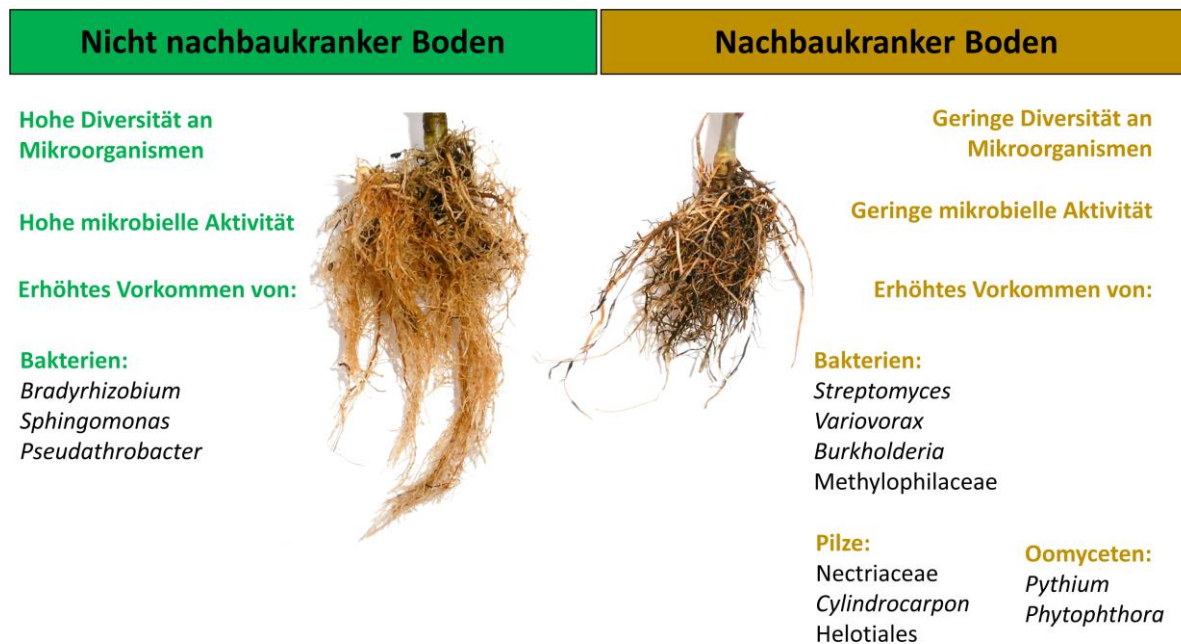
Mahnkopp-Dirks, F., Radl, V., Kublik, S., Gschwendtner, S., Schloter, M. And Winkelmann, T. (2021): Molecular barcoding reveals the genus *Streptomyces* as associated root endophytes of apple (*Malus domestica*) plants grown in soils affected by apple replant disease. *Phytobiomes Journal* 2021 5:2, 177-189

<https://doi.org/10.1094/PBIOMES-07-20-0053-R>

<https://doi.org/10.1094/PBIOMES-07-20-0053-R>

Popp, C., Wamhoff, D., Winkelmann, T., Maiss, E. And G. Grunewaldt-Stöcker (2020): Molecular identification of Nectriaceae in infections of apple replant disease affected roots collected by Harris Uni-Core punching or laser microdissection. *J Plant Dis Prot* 127, 571–582 (2020). <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00333-x>

Radl, V., Winkler, J.B., Kublik, S., Yang, L., Winkelmann, T., Vestergaard, G., Schröder, P. And Schloter, M. (2019): Reduced microbial potential for the degradation of phenolic compounds in the rhizosphere of apples seedlings grown in soils affected by replant disease. *Environmental Microbiome* 14, 8 (2019) <https://doi.org/10.1186/s40793-019-0346-2>



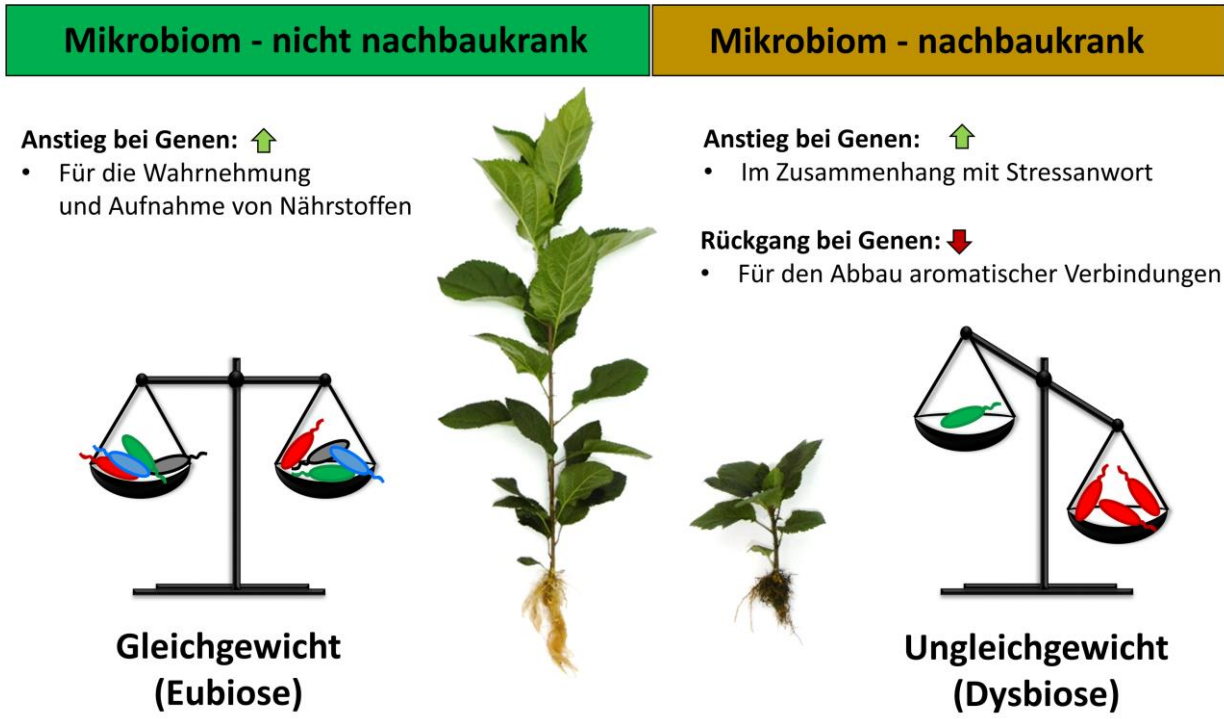
**Abb. 1:** Vergleich des Mikrobioms zwischen nachbaukranker und nicht nachbaukranker Boden.

## Serie „Müde Böden beim Nachbau von Äpfeln“ – Teil 5

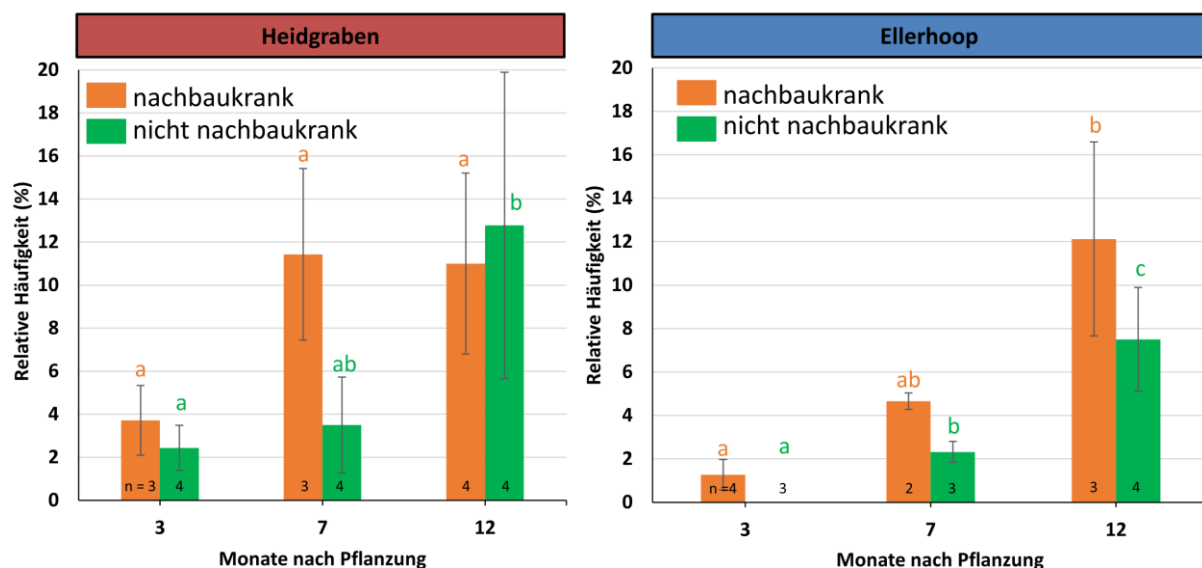
- Berichte für die Praxis aus dem Projekt ORDIAmur -



**Abb. 2:** Splitroot-Versuch mit nicht nachbaukrankem Boden (linke Kammer) und nachbaukrankem Boden (Bild: Lucas et al., 2018)



**Abb. 3:** Funktionelle Unterschiede des Mikrobioms: Nicht nachbaukrank (links), nachbaukrank (rechts). Verschieden farbliche Bakterien repräsentieren das Mikrobiom im Gleichgewicht (Eubiose) bzw. im Ungleichgewicht (Dysbiose).



**Abb. 4:** Relative Häufigkeit der Gattung *Streptomyces* 3, 7 und 12 Monate nach Pflanzung der Unterlage 'Bittenfelder Sämling' in Wurzeln in nachbaukranken und nicht nachbaukranken Böden der ORDIAmur-Referenzflächen Heidgraben und Ellerhoop. Unterschiedliche

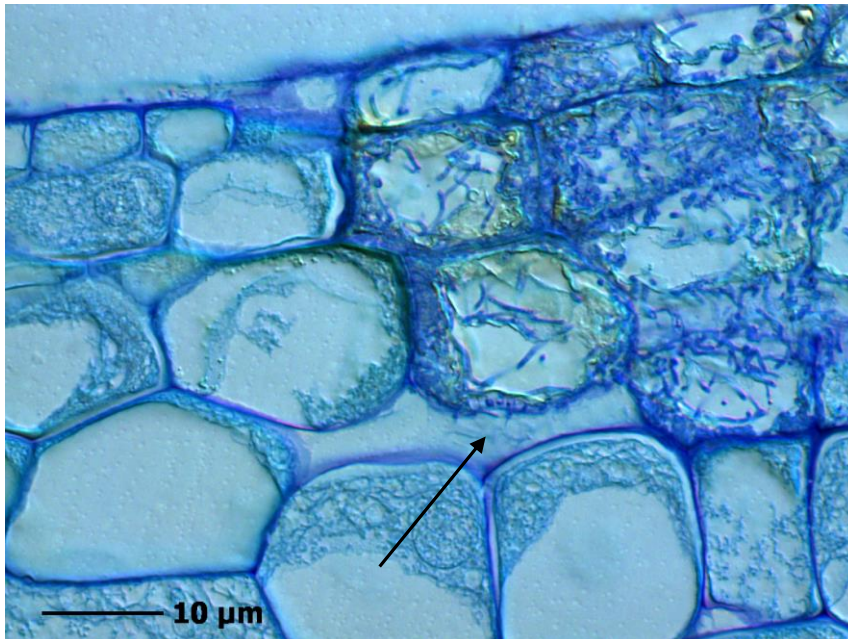


## Serie „Müde Böden beim Nachbau von Äpfeln“ – Teil 5

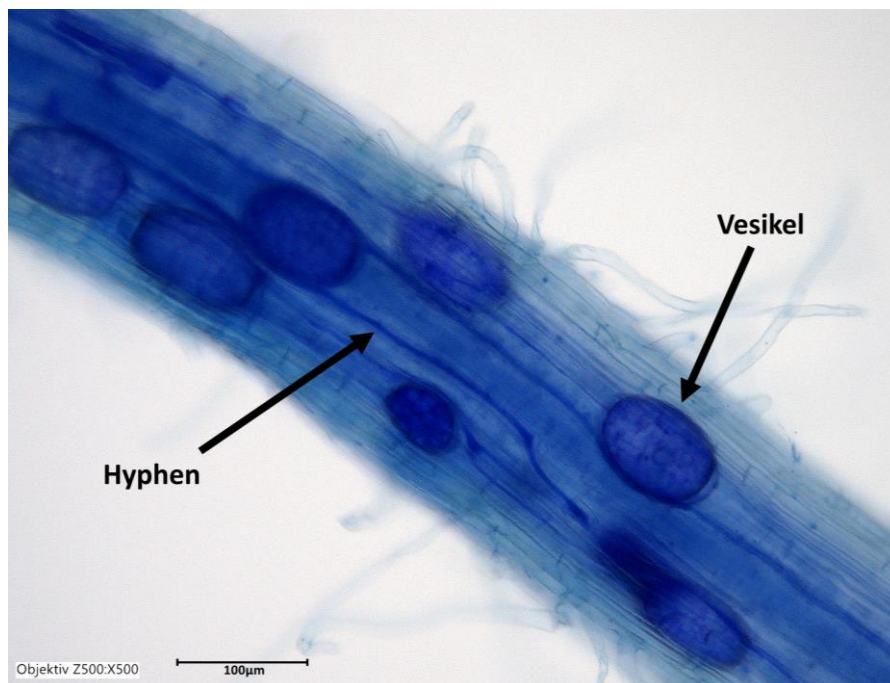
- Berichte für die Praxis aus dem Projekt ORDIAmur -



Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb des nachbaukranken (orange) und nicht nachbaukranken Bodens (grün) des jeweiligen Standortes (Tukey-Test  $p \leq 0.05$ ).



**Abb. 5:** Aktinobakterien mit typischen hyphenartigen Strukturen innerhalb des geschädigten Rindengewebes (rechts oben) einer Apfelwurzel.



**Abb.6:** Von Mykorrhiza besiedelte Tageteswurzel.