

Reaktion von Apfelpflanzen auf die Bodenmüdigkeit

Diese Artikelreihe stellt Schlüsselergebnisse des BMBF-Projekts ORDIAmur vor, das mit der Nachbaukrankheit beim Apfel (engl. Apple Replant Disease = ARD) befasst ist. ARD ist zunehmend ein Problem in Obstbaumschulen und im Apfelanbau. Die hierzulande häufig als Bodenmüdigkeit bezeichnete Krankheit äußert sich in einer Störung der Wuchsform und des Stoffwechsels von Apfelpflanzen auf Böden, deren mikrobielle Lebensgemeinschaft aufgrund der vorausgehenden Kultur von Apfel verändert ist. Der letzte Artikel (Teil 3) in dieser Serie beschrieb, wie sich verschiedene Apfelunterlagen und ausgewählte Varianten verschiedener Apfelwildarten in ihrer Reaktion auf nachbaukranke Böden unterscheiden. Ziel war es, gegebenenfalls Toleranzen zu identifizieren. Der vorliegende Teil 4 befasst sich mit den drastischen Veränderungen in Apfelwurzeln, wenn sie in nachbaukranken Böden wachsen, und beleuchtet diese Vorgänge auf morphologisch/anatomischer und biochemisch/molekularer Ebene.

Morphologisch-anatomische Veränderungen in nachbaukranken Wurzeln

Die Erkennung von Frühsymptomen an Wurzeln soll eine schnelle Diagnose möglich machen. Verglichen mit Wurzeln aus ARD-unbelastetem Boden zeigen Feinwurzeln sowohl der Apfelunterlage M26 aus Gewächshausbiotests als auch der Unterlage 'Bittenfelder Sämling' aus Feldparzellen deutliche Unterschiede. Schon mit bloßem Auge ist an den Wurzelsystemen aus ARD-Boden eine Beeinträchtigung des Wuchses und eine verminderte Wurzelanzahl zu erkennen. Hinzu kommen Schwarzfärbungen und Verbräunungen, insbesondere an Feinwurzeln und Wurzelspitzen (Abb. 1 a). Für die mikroskopische Untersuchung wurden Wurzelsysteme in fließendem Leitungswasser von Bodenpartikeln gereinigt und Feinwurzeln von ca. 1 cm Länge zufällig entnommen. Im Gegensatz zu den gesunden, hellen Wurzeln zeigen viele Feinwurzeln aus ARD-Boden ein typisches Muster von dunkelbraun bis schwarz verfärbten Rindenzellen. Einzelnen oder in größeren Zellverbänden vorkommend liefern sie das Diagnose-Merkmal „Schwärze“ (Abb. 1 b). Weitere Zellschäden im Abschlussgewebe sind Nekrosen, braunschwarz gefärbte zelluläre Einschlüsse und Infektionsherde, die der Pilzfamilie *Nectriaceae* zugeordnet werden konnten (Abb. 1 c). Die mikroskopische Frühdiagnose von ARD beruht folglich auf dem Nachweis der „Schwärze“ und der pilzlichen Infektionsstrukturen. Bei genügend hoher Probenzahl ist auch eine Quantifizierung der Schädigung möglich.

Bildung und Ausscheidung von Abwehrstoffen durch nachbaukranke Wurzeln

Im ARD-Boden ist die Zusammensetzung der Mikroorganismen stark verändert (Teile 5 und 6 der Serie). Wird eine Apfelpflanze in ARD-Boden eingebracht, bilden ihre Wurzeln antimikrobielle Abwehrstoffe, sogenannte Phytoalexine (Abb. 2a). Verschiedene Pflanzenarten produzieren unter Stressbedingungen unterschiedliche Phytoalexine. Der Apfel bildet Biphenyle und Dibenzofurane. Bisher wurden in Apfelwurzeln etwa 35 abgewandelte Biphenyle und Dibenzofurane nachgewiesen. Angereichert sind sie nur in jenen Wurzeln, die direkt mit ARD-Boden in Kontakt stehen. Wird zum Beispiel eine Apfelpflanze so angezogen, dass die eine Hälfte des Wurzelsystems in ARD-Boden und die andere Hälfte in ARD-unbelasteten Boden einwächst, so bilden nur die Wurzeln im ARD-Boden die Phytoalexine. Es handelt sich also um eine auf die Wurzeln beschränkte Abwehrreaktion, die sich nicht auf



die ganze Pflanze ausbreitet und folglich auch nicht oberirdisch in den Blättern nachweisbar ist. Daher können Phytoalexine in den Wurzeln als Anzeiger von ARD gesehen werden. Das Spektrum der gebildeten Biphenyle und Dibenzofurane in den Wurzeln ist allerdings nicht konstant. Es variiert in der Zusammensetzung und den Mengen der individuellen Phytoalexine je nach Typ der Unterlage und Herkunft des ARD-Bodens. Andere Stresssituationen wie zum Beispiel Hitze oder Salz führen nicht zu einem deutlichen Anstieg dieser Abwehrstoffe.

Die Phytoalexine werden von den Wurzeln auch in den umgebenden Boden abgegeben und kommen direkt mit der hier vorliegenden mikrobiellen Lebensgemeinschaft in Kontakt. Verschiedene Biphenyle und Dibenzofurane werden verschieden stark ausgeschieden. Sie hemmen das Wachstum von Bakterien und Pilzen, die mit ARD in Verbindung stehen, unterschiedlich stark (Abb. 2 b, c). Interessanterweise sind die Gemische der Phytoalexine, wie sie von den Wurzeln gebildet und ausgeschieden werden, effektiver als die Einzelstoffe. Es ist anzunehmen, dass die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaft im Boden durch die Abwehrstoffe beeinflusst wird.

Veränderung der Aktivität von Genen in nachbaukranken Pflanzen

In Pflanzen auf ARD-Boden ist der grundlegende Stoffwechsel eingeschränkt. Viele Gene dieses Stoffwechsels sind nur schwach aktiv. Damit einher gehen deutliche Wachstumseinschränkungen, wie in Abb. 3a für Pflanzen in ARD-Böden von drei verschiedenen Standorten im Vergleich zu solchen in desinfizierten Böden zu sehen ist. Der Phytoalexin-Gehalt ist in den nachbaukranken Wurzeln aus den ARD-Böden stets hoch, während die Wurzeln aus den desinfizierten Böden nur geringe Mengen der Abwehrstoffe enthalten (Abb. 3b). An der Bildung der Phytoalexine sind eine Reihe von Genen beteiligt. Wie erwartet, ist die Aktivität dieser Gene in Wurzeln in ARD-Böden hoch. In vier Apfelunterlagen (M9, M26, B63 und MAL0595) wurde die Aktivität von 108 bedeutsamen Genen untersucht. Im Vergleich zu Wurzeln aus Boden ohne ARD waren 16 Gene in den Wurzeln aus Boden mit ARD deutlich aktiver, was darauf hinweist, dass sie eine Rolle in der pflanzlichen Antwort auf ARD spielen. Hierzu zählen die Gene der Phytoalexin-Bildung, die deshalb nützlich sind, um frühzeitig ARD nachzuweisen. Ein gutes Beispiel ist das Gen für die Biphenyl-Synthase, die das Grundgerüst der Abwehrstoffe bildet. Die Aktivität dieses Gens wird, wie auch die der anderen 16 Gene, schnell und stark heraufgesetzt, wenn Apfelpflanzen in ARD-Böden eingebracht werden (Abb. 3c). Zu den weiteren angeschalteten Genen zählen ein Chitinase-Gen, das mit der Pilzabwehr zu tun hat, und Gene eines Signalwegs, der bei Stress aktiviert wird. Die Aktivität der 16 Gene war in den Wurzeln deutlich höher als in den Blättern, was wiederum zeigt, dass die pflanzliche Antwort auf ARD auf die Wurzeln begrenzt ist. Wie schon bei den Phytoalexin-Mengen beobachtet, gibt es auch in der Stärke der Genaktivität deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Unterlagen-Typen und den Böden, in denen sie wachsen. Andere Stress-Situationen als ARD beeinflussten wiederum nicht die Genaktivität. Die Identifikation von Genen, die zur Toleranz beziehungsweise zur Empfindlichkeit von Unterlagen-Typen gegenüber ARD beitragen, könnte für die Züchtung von weniger ARD-anfälligen Unterlagen hilfreich sein. Dafür wurde die Aktivität von Genen in der ARD-empfindlichen Unterlage M9 mit der in dem ARD-toleranten Wildapfel *Malus x robusta* 5 (Mr5) verglichen. Unterschiede in der Aktivität ergaben sich für mehr als 1200 Gene, wobei viele bekanntermaßen eine Rolle bei Stressreaktionen spielen. Im ARD-toleranteren Wildapfel Mr5 waren zum Beispiel die Gene der Gibberellinsäure- und Lignin-Biosynthese, die zur Stabilisierung der Zellwand beitragen, sowie Gene, die mit Entgiftungsprozessen und dem kontrollierten Absterben von Zellen zu tun haben, deutlich aktiver als in der anfälligen



Unterlage M9. Dies lässt vermuten, dass die Toleranz gegenüber ARD nicht auf einem einzelnen, sondern auf mehreren Mechanismen beruht.

Zusammenfassung

Als Indikatoren für ARD stellen sich sowohl morphologische Veränderungen wie Schwärze und Infektionsherde als auch biochemische Veränderungen wie die schnelle Aktivierung der Phytoalexin-Gene und die nachfolgende Anreicherung der Phytoalexin-Substanzen heraus. Diese Abwehrstoffe hemmen nachweislich das Wachstum von ARD-relevanten Bakterien und Pilzen. Allerdings müssen die Wechselwirkungen noch besser verstanden werden, um darauf aufbauend ARD-Gegenmaßnahmen zu entwickeln. Unklar ist zudem noch, inwieweit die Phytoalexine auch die produzierenden Wurzeln selbst schädigen können, zum Beispiel im Falle einer überschießenden Anreicherung. Die Untersuchungen zur Aktivierung von Genen haben gezeigt, dass für die Toleranz gegenüber ARD weitere Gene und Mechanismen eine Rolle spielen. Offensichtlich müssen die Pflanzen als Antwort auf ARD verschiedene Strategien kontrolliert kombinieren.

Belnaser Busnena, Susan Schröpfer, Luisa Baader, Annmarie-Deetja Rohr, Gisela Grunewaldt-Stöcker, Traud Winkelmann, Andreas Wrede, Benye Liu, Ludger Beerhues

Literatur:

- Busnena, B.A., Beuerle, T., Mahnkopp-Dirks, F., Winkelmann, T., Beerhues, L., Liu, B. 2021. Formation and exudation of biphenyl and dibenzofuran phytoalexins by roots of the apple rootstock M26 grown in apple replant disease soil. *Phytochemistry* 192, 112972. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112972>
- Grunewaldt-Stöcker, G., Mahnkopp, F., Popp, C., Maiss, E., Winkelmann, T. 2019. Diagnosis of apple replant disease (ARD): Microscopic evidence of early symptoms in fine roots of different apple rootstock genotypes. *Scientia Horticulturae* 243, 583-594. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.014>
- Reim, S., Winkelmann, T., Cestaro, A., Rohr, A.D., Flachowsky, H. 2022. Identification of candidate genes associated with tolerance to apple replant disease by genome-wide transcriptome analysis. *Frontiers in Microbiology* 13, 888908. <https://10.3389/fmicb.2022.888908>
- Rohr, A.-D., Schimmel, J., Liu, B., Beerhues, L., Guggenberger, G., Winkelmann, T. 2020. Identification and validation of early genetic biomarkers for apple replant disease. *PLoS ONE* 15(9), e0238876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238876>
- Weiss, S., Bartsch, M., Winkelmann, T. 2017. Transcriptomic analysis of molecular responses in *Malus domestica* 'M26' roots affected by apple replant disease. *Plant Molecular Biology* 94, 303-318. <https://10.1007/s11103-017-0608-6>

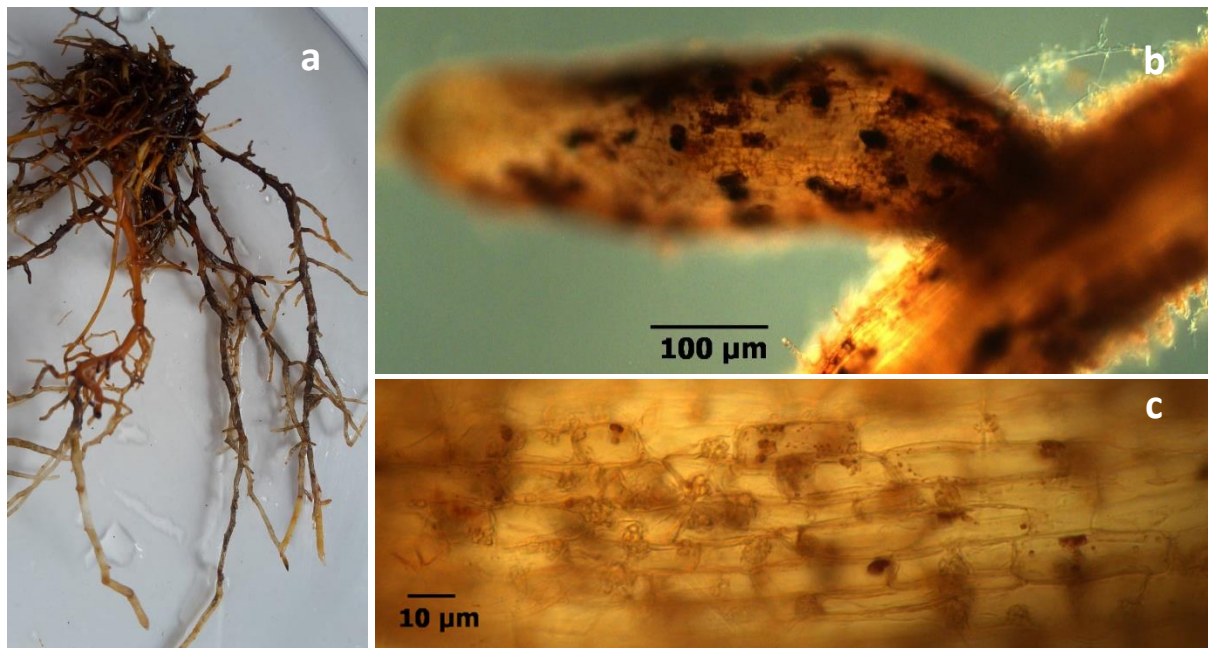


Abb. 1: ARD-Symptome an M26-Feinwurzeln aus ARD-Boden. a) Geschädigtes Wurzelsystem mit Verfärbung und anomalem Wuchs; b) Symptom Schwärze im Rindengewebe; c) Symptom intrazelluläre Pilzstrukturen und Nekrosen im Abschlussgewebe (G. Grunewaldt-Stöcker).

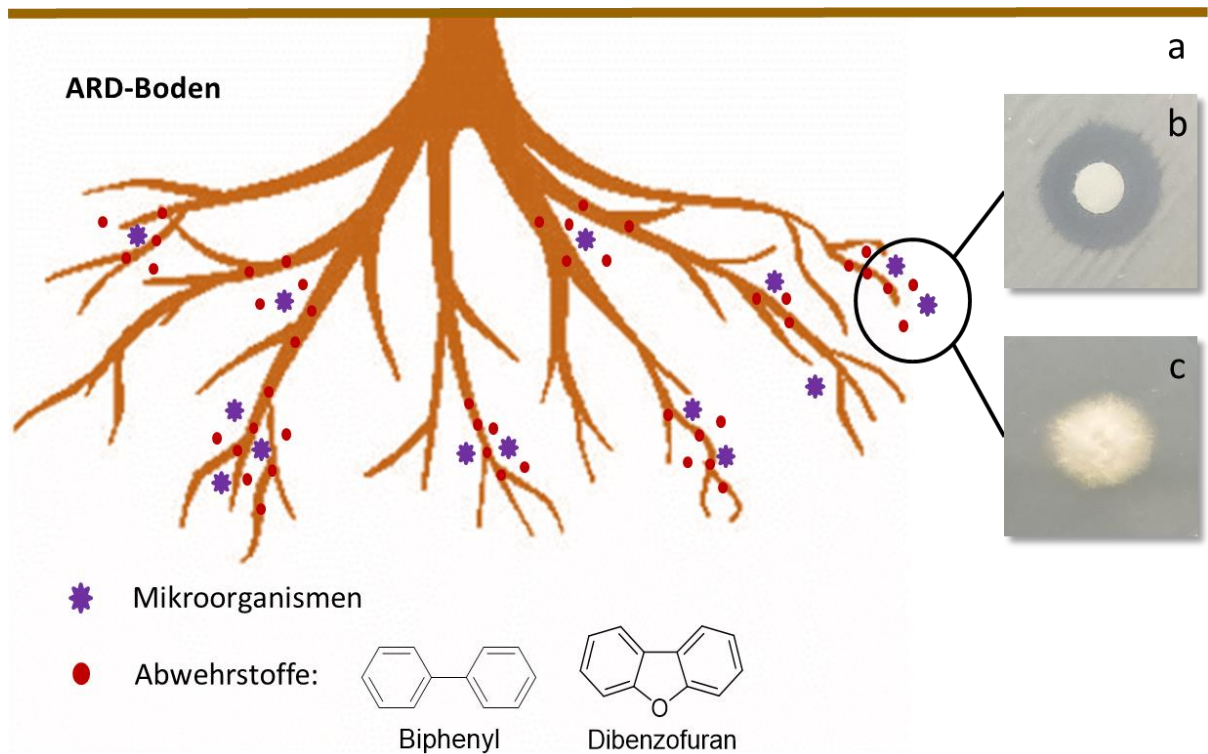


Abb. 2: Bildung von Abwehrstoffen (Phytoalexinen) durch Wurzeln in ARD-Boden. a) Die Abwehrstoffe werden auch in den Boden abgegeben und wirken dort auf Mikroorganismen; b) Im Labor zeigt die Ausbildung eines Hemmhofs die antibakterielle Wirkung an; c) Auch das Wachstum von Pilzen wird gehemmt (BUSNENA et al. 2021)

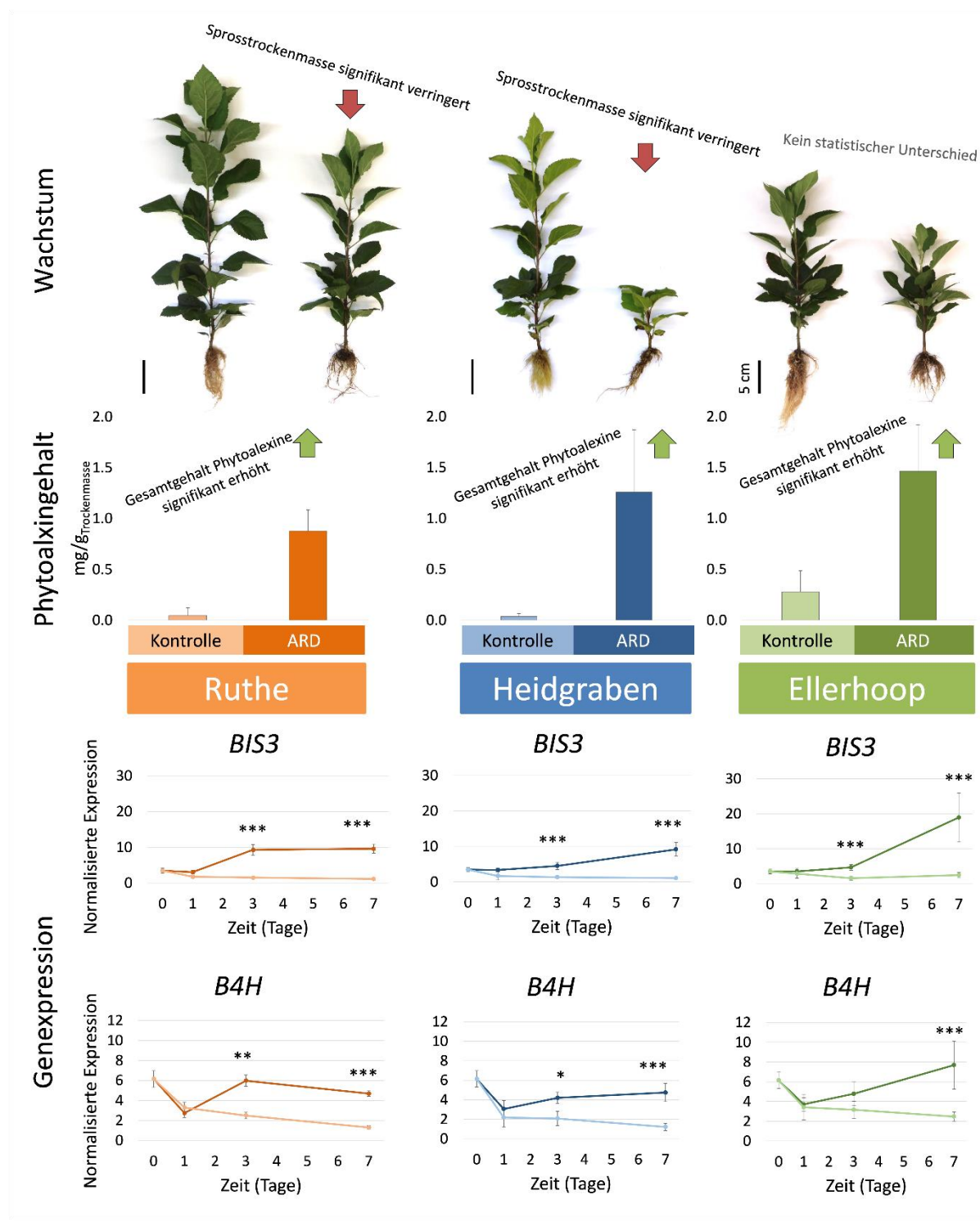


Abb. 3: Korrelation von Wachstumsdepression, Phytoalexingehalt und Genaktivität. a) M26-Pflanzen nach achtwöchiger Kultur in entweder ARD-Boden oder desinfiziertem ARD-Boden der drei ORDIAmur Referenzstandorte Ruthe, Heidgraben und Ellerhoop; b) Unterschiede in den Phytoalexin-Gehalten der Wurzeln; c) Zeitabhängige Veränderungen in der Aktivität des Indikatorgens für die Biphenyl-Synthase, die das Grundgerüst der Abwehrstoffe bildet (ROHR et al. 2020)