

# Das Mycoinsektizid *Metarhizium*: Eine endophytische Pilzassoziation zum Nutzen der Rübenpflanze *Beta vulgaris*

## *The mycoinsecticide Metarhizium: an endophytic fungal association for the benefit of the beet plant Beta vulgaris*

Chiara Cattani, Maria Zottele, Hermann Strasser\*

### **Einleitung**

Die kommerzielle Nutzung von entomopathogenen Pilzen als Bioinsektizide ist ein wichtiger Forschungsschwerpunkt, aber nur wenige Studien befassen sich mit der endophytischen Lebensweise dieser Organismen (VEGA et al. 2008). Entomopathogene zeigen verschiedene Interaktionen mit Pflanzen sowohl als Endophyten als auch in der Rhizosphäre- wodurch sie eine wichtige ökologische Rolle spielen, unter anderem durch die Bereitstellung von Pflanzennährstoffen, durch die Förderung des Pflanzenwachstums und die Kontrolle von Pflanzenpathogenen (QUESADA-MORAGA et al. 2020). Diese neu entdeckte ökologische Funktion des endophytischen Wachstums stellt eine weitere Möglichkeit für integrierte Pflanzenschutzstrategien dar. Der Rübenderbrüssler (*Asproparthenis punctiventris*) ist ein wichtiger Pflanzenschädling in Europa, der schwere Schäden an Zuckerrübenkulturen verursachen kann. Da chemische Wirkstoffe durch Zulassungseinschränkungen vom Markt verschwinden sind biologische Alternativen gefragt. Der Einsatz von *Metarhizium* in der Zuckerrübe (*Beta vulgaris*)- sowohl direkt als auch endophytisch- soll nun als zusätzliche Maßnahme getestet werden.

### **Material und Methoden**

Applikation: Für die Applikationen wurde das Produkt Granmet™-WP (Agrifutur s.r.l, Alfianello) auf Basis von *Metarhizium brunneum* Ma 43 in 0,1% Tween® 80 eingewogen und mit Antischiuma (Cifo Srl, Bologna) und NeoWett (Kwizda Holding GmbH, Wien) versetzt (laut Dosierempfehlung). Für die Kontrolle wurden Pflanzen mit 0,1% Tween® 80 behandelt. Die Sporensuspension wurde entweder durch eine Sprühapplikation auf die Blätter von Zuckerrübenpflanzen (BBCH 12; n=50 pro Behandlung; Sprühvolumen pro Pflanze: 2 ml;  $5 \cdot 10^7$  Sporen/ml) aufgetragen oder durch eine Inokulation des Bodens im Wurzelfußbereich unter Zuhilfenahme einer Pipette eingebracht (BBCH 12; n=50 pro Behandlung; Injektionsvolumen pro Pflanze: 100 µl; Sporenkonzentration:  $5 \cdot 10^7$  Sporen/ml).

Probennahme / *Metarhizium*- Monitoring: Nach 7, 14, 21 und 28 Tagen wurden jeweils 10 Pflanzen aus dem Gewächshaus entnommen und die gesamte Pflanzenbiomasse oberflächensterilisiert. Dafür wurden die Pflanzen 2 Minuten in 1,5% Natriumhypochlorit (NaClO), 2 Minuten in 70% Ethanol und dreimal 2 Minuten in sterilem destilliertem Wasser getaucht und anschließend in Wurzel-, Stamm- und Blattsegmente unterteilt. Aus diesen Teilen wurden je 10 Unterproben steril entnommen, auf selektives Sabouraud- 2%-Glukose- Agarmedium überführt und bei 25°C bis zu zwei Wochen inkubiert. Pilzliches Wachstum aus den Pflanzenteilen wurde makro- sowie mikroskopisch beurteilt. *Metarhizium* spp. Kolonien wurden vereinzelt und für eine nachfolgende genetische Analyse auf Genotypen- Niveau gesichert. Zusätzlich wurde die *Metarhizium* Abundanz im Bodensubstrat der Topfpflanzen nach LA-ENGLE et al. (2010) bestimmt.

Beurteilung Pflanzenwachstum: Um die Auswirkung der Behandlungen auf das Pflanzenwachstum beurteilen zu können, wurde ab Beginn der Behandlung bis zum Ende zweimal wöchentlich der TraitFinder (Phenospex B.V., The Netherlands) verwendet um Parameter wie Größe, Biomasse und Grünanteil zu beurteilen.

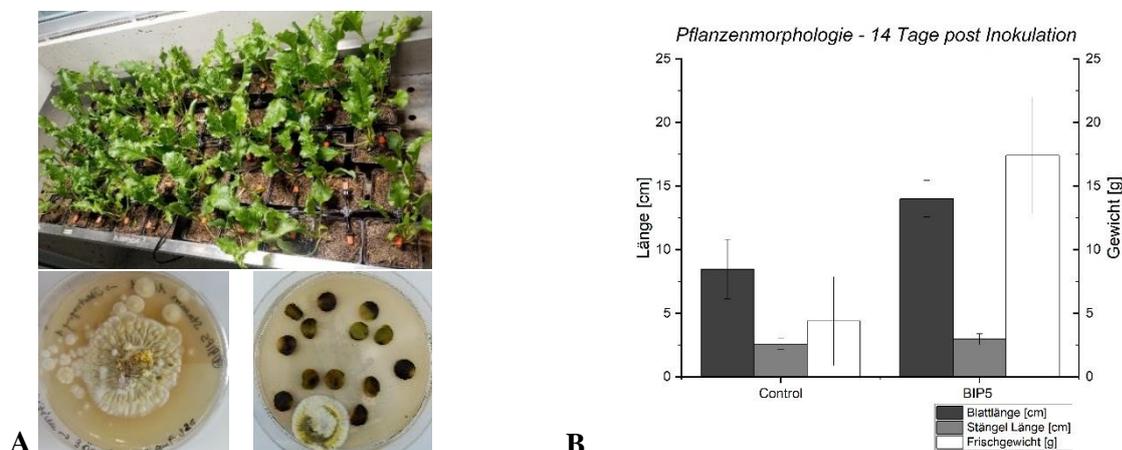
### **Ergebnisse und Diskussion**

Unsere Untersuchung soll mögliche endophytische Interaktionen zwischen dem entomopathogenen Pilz *Metarhizium brunneum* und der Zuckerrübe nachweisen. Wir möchten zeigen, dass durch die Gegenwart des Pilzes *Metarhizium* die Pflanzen geschützt bzw. die Pflanzengesundheit gesichert werden kann. Dies erscheint uns besonders kurz nach dem Auflaufen der Pflanzen als wichtig, da zu diesem Zeitpunkt die Pflanzen besonders empfindlich und anfällig für Angriffe durch Krankheitserreger und Schädlinge sind.

Jüngste Arbeiten konnten bereits zeigen, dass *Metarhizium* spp. aktiv das Gewebe bestimmter Pflanzen besiedeln kann (z.B. BEHIE et al. 2015). Durch unsere *Metarhizium* Bodenapplikation konnten wir bereits erste Kolonisierungen im Wurzelbereich der Zuckerrübe feststellen. Durch die Sprühapplikation der Blattoberflächen konnte auch eine endophytische Besiedelung in den oberirdischen Pflanzenorganen der Zuckerrübe festgestellt werden (Abbildung 1A). Zudem konnte die Persistenz der Endophytisierung von *Metarhizium* nach der Sprühbehandlung der Blätter über einen Zeitraum von über 21 Tagen sichergestellt werden. Erst 28 Tage nach der Inokulation hat diese abgenommen. STONE & BIDOCHKA (2020) weisen darauf hin, dass *Metarhizium* das Pflanzengewebe in Abhängigkeit vom Pilzstamm, den Umweltbedingungen (z. B. ultraviolette Strahlung, Temperatur, Feuchtigkeit), der Wirtsart und der Inokulationsmethode besiedelt. Eine genaue Besiedelungsverteilung je nach Inokulationsmethode muss für die Zuckerrübe noch in weiteren Untersuchungen ausgearbeitet werden. Neben den ersten Hinweisen, dass *M. brunneum* Ma 43 grundsätzlich dazu in der Lage ist die Zuckerrübe endophytisch zu besiedeln, konnten wir mit beiden Inokulationsmethoden nach 14 Tagen eine Zunahme des Höhenwachstums und der Biomasse der behandelten im Vergleich zu den Kontrollpflanzen feststellen (Abbildung 1B).

Um zu testen, inwieweit endophytisches Wachstum von *Metarhizium* in der Zuckerrübenpflanzen das Verhalten und die Vitalität von Rübenderbrüsslern (*A. punctiventris*) beeinflusst, werden in einem Folgeversuch sowohl Choice- als auch Non-Choice Bioassays durchgeführt. Dafür werden entweder mit Pilz behandelte oder unbehandelte Kontrollpflanzen den Käfern als Futterquelle angeboten. Bei allen Pflanzen werden die Fraßschäden bestimmt und die Käfer bis zu ihrem Tod in Quarantäne gehalten. Auftretende Mykosen werden nach ihrer Vereinzlung ausgewertet. In Bioassays soll zusätzlich die direkte Behandlung der Käfer ( $5 \times 10^6$  Sporen pro Individuum; n=20) getestet werden.

Nun gilt es, die positiven Zusammenhänge zwischen Pflanzenwachstum/ -gesundheit der Zuckerrübe und endophytischer Besiedelung mit *Metarhizium* weiter zu bestätigen und die Mechanismen der Besiedelung genauer zu beleuchten.



**Abbildung 1: Nach Behandlung von Zuckerrübenpflanzen soll ein endophytisches Wachstum des Pilzes *Metarhizium* erfolgen. Der Grad der Kolonisation wird durch Reisolation des Pilzes auf Selektivmedium beurteilt (A). Es gilt herauszufinden, ob Zuckerrüben durch eine Pilzbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen einen Gesundheits- und Ertragsvorteil erfahren (B).**

### Zusammenfassung

Das Entomopathogen *Metarhizium brunneum* kann sich als Endophyt im Pflanzengewebe von Rübenpflanzen ansiedeln. Aufgrund seiner ökologischen Rolle als Endophyt kann sein Anwendungsbereich als Bioinsektizid und Biostimulans somit erweitert werden. Unter Verwendung des Sporenpulverprodukts Granmet™-WP (auf Basis des biologischen Wirkstoffes *M. brunneum* Ma 43) wurde der Grad der

Besiedlung von Zuckerrüben (*B. vulgaris*) untersucht. Darüber hinaus wurden die wachstumsfördernden und -stärkenden Eigenschaften von *Metarhizium* bei der Zuckerrübe analysiert. Diese Studie soll zeigen, ob die mit *M. brunneum* behandelte bzw. besiedelte Zuckerrübe –Pflanze vom Fraßschädling *A. punctiventris* nachhaltig geschützt werden kann. Neben der direkten Infektion soll auch das Verhalten der Käfer bei Anwesenheit des Pilzes beurteilt werden.

### **Abstract**

The entomopathogen *Metarhizium brunneum* can endophytically colonise the plant tissue of sugar beet plants. Due to its ecological role as an endophyte, its scope of application as a bioinsecticide and biostimulant can thus be extended. Using the spore powder product Granmet<sup>TM</sup>-WP (based on the biological agent *M. brunneum* Ma 43), the degree of colonisation of sugar beet (*B. vulgaris*) was investigated. In addition, the growth-promoting and -strengthening properties of *Metarhizium* in sugar beet were analysed. The aim of this study is to show whether sugar beet plants treated or colonised with *M. brunneum* can be sustainably protected from the pest *A. punctiventris*. In addition to direct infection, the behaviour of the beetles in the presence of the fungus will also be assessed.

### **Danksagung**

Die Studie wird mit Mitteln des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft, Regionen und Wasserwirtschaft finanziert (DaFNE Nr. 101749). Die Autoren bedanken sich bei den Firmen Agrifutur s.r.l. (Alfianello, Italien) und Samen Schwarzenberger GmbH (Völs, Österreich) für die Bereitstellung von Sachmitteln.

### **Literatur**

- BEHIE SW, JONES SJ, BIDOCHKA MJ (2015): Plant tissue localization of the endophytic insect pathogenic fungi *Metarhizium* and *Beauveria*. *Fungal Ecology* 13, 112-119.
- LAENGLER T, STRASSER H (2010): Developing a risk indicator to comparatively assess environmental risks posed by microbial and conventional pest control agents. *Biocontrol Science and Technology* 20, 659-681.
- QUESADA-MORAGA E (2020): Entomopathogenic fungi as endophytes: their broader contribution to IPM and crop production. *Biocontrol Science and Technology* 30, 864-877.
- STONE LB, BIDOCHKA MJ (2020): The multifunctional lifestyles of *Metarhizium*: evolution and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 104, 9935-9945.
- VEGA FE (2008): Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 98, 277-279.

### **Adresse der Autoren**

Leopold- Franzens Universität Innsbruck, BIPESCO Team Innsbruck, Institut für Mikrobiologie, Technikerstraße 25, A-6020 Innsbruck.

\*Ansprechpartner: Dr. Hermann Strasser, [hermann.strasser@uibk.ac.at](mailto:hermann.strasser@uibk.ac.at)