

**Investigations on rhizosphere management for
a better Mn and Zn acquisition and
disease resistance in crop plants in the
model system of take-all disease in wheat**

Zafrin Akter

VERLAG GRAUER · Beuren · Stuttgart · 2007

Investigations on rhizosphere management for a better Mn and Zn acquisition and disease resistance in crop plants in the model system of take-all disease in wheat

Soil-borne microbial diseases result in tremendous economic losses to agricultural production and most of the diseases cannot be controlled effectively by present chemically prevention practices. Therefore, scientific research is required to achieve an alternative to chemical methods with perspectives for bio-control strategies by exploitation of various microbial populations in the rhizosphere and their succession during plant development or by crop rotation.

Take-all, caused by the soil-borne fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) is the most devastating root rot disease of cereals worldwide. Manganese-deficient wheat plants are more susceptible to take-all disease, because manganese (Mn) is a co-factor for biosynthesis of phenolic compounds involved in the formation of mechanical barriers by lignification and the production of antibiotics (phytoalexins) produced in response to pathogen infections. However, no resistant wheat variety is available and frequently the application of Mn fertilizers is also not effective because of the rapid immobilization of Mn by rhizosphere microorganisms. The plant availability of Mn in soils depends on pH, redox potential and microbial activity in the rhizosphere. The activity of Mn-reducing microorganisms (e.g. *Trichoderma* sp.) in the rhizosphere increases Mn solubility, while Mn can be immobilized by Mn oxidizing microbes (e.g. *Ggt*).

However, little information is available on interactions of microbial activity with the Mn status of plants as related with suppression of soil-borne pathogens. A better understanding of rhizosphere processes determining plant availability of Mn may offer perspectives for alternative disease management strategies reducing environmental risks of pesticide applications. Therefore, the aim of the present study was to investigate perspectives for an improved plant micronutrient (Mn and Zn) acquisition and disease resistance by manipulations of the rhizosphere microflora using take-all in wheat as model system.

In an initial rapid screening experiment, potential effectiveness of different commercial biofertilizers (*Trichoderma* and *Bacillus*) was evaluated by bio-indication with cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings on the basis of increasing seed germination, promoting plant

growth, pathogen suppression and mobilizing mineral nutrients under controlled laboratory conditions. The results clearly showed a significantly higher germination rate, root dry weight, shoot dry weight, and leaf area of cucumber plants by application of different commercial biofertilizers (T-50, Biomex, BioHealth-WSG, BioHealth-G and SP-11), while significantly higher root length was found only in T-50 and BioHealth-G-treated seeds compared to the control. Additionally, in vitro antagonistic activity against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*), as causal agent of take-all in wheat and phosphate solubilizing activity was demonstrated for the *Trichoderma* biofertilizer (T-50), but in vitro solubilization of Mn was not detected. However, no effects of different biofertilizers were observed with garden cress (*Lepidium sativum* L.) seeds. The results suggested that the activity potential of different *Trichoderma*-based biofertilizers could be easily screened within several days with the described rapid bio-test by increasing cucumber seed germination and improving growth and growth related parameters of cucumber seedlings grown in a nutrient solution under controlled culture system.

Similarly, in the second experiment significantly higher seed germination rate and subsequent seedling growth efficiency was also observed by the treatment with different *Trichoderma* based biofertilizers (T-50, BioHealth and BioHealth-G) in artificially aged cucumber seeds. These results indicate that the stimulation of seed germination and plant growth by *Trichoderma* inoculation might be due to the general beneficial characteristic of *Trichoderma*-based biofertilizers. The beneficial effects on germination of cucumber seeds after artificial ageing treatments may offer perspectives for improvement of seed quality problems by prophylactic seed inoculation with *Trichoderma*.

The objective of the third experiment was an assessment of the ability of *Trichoderma* biofertilizers to enhance Mn and Zn acquisition in wheat plants, cultivated in minirhizotrons (rhizoboxes) on a Mn-deficient soil, pre-inoculated with *Ggt* in the field. However, no take-all infection was found in wheat roots for all treatments. The infection potential of the fungus was probably suppressed by high root zone temperatures as a consequence of high ambient temperatures of the greenhouse culture during the summer months. Shoot growth of wheat was not affected by *Trichoderma* inoculation, while root biomass increased by approximately 20% in the T-50 and Biohealth-G inoculated variants, associated with a strong promotion of root elongation (40-80%) particularly in the first two weeks of seedling development.

The bulk soil pH (5.9-6.2) was not influenced by *Trichoderma* based biofertilizers while the pH in the rhizosphere and at the rhizoplane pH declined slightly by 0.3-0.4 units in BioHealth-G and T-50+SP-11 inoculated plants. Shoot concentrations of Mn and Zn were in the sufficiency range for all treatments. Application of Biohealth-G and T-50+SP-11 increased the shoot concentrations of Zn but not of Mn demonstrating a selective stimulation of micronutrient acquisition by the biofertilizer treatments.

To elucidate the role of crop rotations with oat as a pre-crop in improving the Mn-status and suppressing the take-all severity in wheat, a pot experiment was conducted in greenhouse culture with oat and wheat pre-cropped field soil with proven differences of the *Ggt* infection potential. Based on the experiences of the preceding experiment, the root zone temperature was adjusted to 10-15°C by using a cooling system to promote *Ggt* infection of the test plants under greenhouse conditions. The results demonstrated that oat pre-cropped soil enhanced plant growth, reduced the take-all infection severity and improved the Mn status in wheat plants. A microbiological characterization revealed a higher proportion of Mn-reducing rhizosphere microorganisms in the oat pre-cropped soil, which obviously increased the plant availability of Mn and resulted in an improved Mn acquisition of wheat. In contrary, a higher proportion of Mn-oxidizers in the wheat pre-cropped soil increased Mn immobilization and reduced Mn acquisition of wheat plants, resulting in a higher susceptibility to *Ggt* infection. Both Mn and Zn concentrations in the shoot tissue of wheat were significantly increased on oat pre-cropped soil compared to wheat pre-cropped soil.

A further pot experiment was conducted to address the question whether different pre-crops exert differential effects on disease severity of take-all in wheat production. The pot experiment established with two wheat cultivars (Mn-efficient and Mn-inefficient) grown in soils with different pre-crop histories. The pre-cropped soil was collected from a field site with pre-cultivation of four crops (oat, black oat, mustard and rape). A higher number of Mn-reducing microbes was present in the bulk pre-cropped soils compared to a control without crop. The results from the pot experiment revealed that all tested pre-cropped soils increased the population density of Mn-reducers in the rhizosphere soil as well as Mn-reduction potential in the bulk soil, suppressed take-all severity and improved Mn and Zn status in shoot of both wheat cultivars. Root growth was stimulated in black oat- and oat-cultivated soil, possibly as a prerequisite for the achieved better micronutrient acquisition.

Based on the above-discussed experiments it can be concluded that *Trichoderma* biofertilizers effectively promote the growth efficiency of plant in terms of germination rate and root growth, nutrient availability and antagonistic effects on pathogens such as *Ggt*. However, other factors such as cropping history also have a significant impact on disease resistance of crop plants by improving the nutritional status of micronutrients.

Rhizosphere management by using different pre-crops (oat, black oat and mustard) promoting Mn-reducing rhizosphere microbes can potentially suppress the take-all disease and increase the Mn and Zn status in wheat. The increasing Mn reduction potential in soils with suitable pre-crops caused by Mn-reducing microorganisms may be one of the mechanisms underlying the disease suppression of take-all in wheat. Therefore, the results of this study emphasize the importance of rhizosphere microorganisms and of the Mn-nutritional status in suppressing the take-all disease in wheat. A better understanding on microbe-plant-soil nutrient interactions may result in a further improvement of the strategies for rhizosphere management towards sustainable, economically feasible and environmentally friendly agricultural production systems.

Untersuchungen zum Rhizosphärenmanagement für eine Verbesserung der Mn- und Zn-Aneignung und Verminderung der Krankheitsanfälligkeit am Modellsystem „Schwarzbeinigkeit“ (take-all) bei Weizen

Zusammenfassung

Bodenbürtige, mikrobielle Krankheitserreger sind für enorme wirtschaftliche Verluste in landwirtschaftlichen Produktionssystemen verantwortlich und viele dieser Fußkrankheiten sind mit den derzeit zur Verfügung stehenden Mitteln des chemischen Pflanzenschutzes nicht effizient kontrollierbar. Daher besteht ein Untersuchungsbedarf in der Rhizosphärenforschung im Hinblick auf alternative Ansätze aus dem Bereich des biologischen Pflanzenschutzes oder durch den Einsatz geeigneter Rotationen.

Schwarzbeinigkeit bzw. „Take-all“, hervorgerufen durch den bodenbürtigen Pilz *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) gehört zu den weltweit verbreitetsten Fußkrankheiten im Getreideanbau. Manganmangel begünstigt die „Take-all“-Anfälligkeit bei Weizen, da Mangan als Co-Faktor für die Biosynthese phenolischer Verbindungen benötigt wird, die als Vorstufen an der Ausbildung mechanischer Infektionsbarrieren durch Lignifizierung und an der Produktion antimikrobieller Substanzen (Phytoalexine) als Antwort auf die Pathogeninfektion beteiligt sind. Es sind jedoch keine Sortenresistenzen gegen „take-all“ bei Weizen bekannt und auch eine Mangandüngung bleibt infolge rascher Manganimmobilisierung in der Rhizosphäre häufig wirkungslos. Die Manganverfügbarkeit in Böden wird durch den Boden-pH Wert, das Redoxpotential und durch die mikrobielle Aktivität bestimmt. Dies deutet auf die Bedeutung der Rhizosphäre und ihre Beeinflussung durch ein geeignetes management in der Praxis hin. Mangan-reduzierende Rhizosphären-Mikroorganismen wie z.B. *Trichoderma* sp. können die Pflanzenverfügbarkeit von Mn erhöhen, während Mangan-Oxidierer (z.B. *Ggt*) zu einer Manganimmobilisierung beitragen.

Über die Interaktionen der mikrobiellen Aktivität in Böden im Hinblick auf die pflanzliche Manganernährung ist im Zusammenhang mit der Unterdrückung von Wurzelkrankheiten noch wenig bekannt. Ein besseres Verständnis der Rhizosphärenprozesse, welche die Pflanzenverfügbarkeit von Mangan beeinflussen, könnte daher zur Entwicklung von alternativen, umweltfreundlicheren Strategien im Pflanzenschutz mit einem verminderten Einsatz von Pestiziden beitragen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Perspektiven für

eine gezielte Beeinflussung der Rhizosphärenmikroflora im Hinblick auf eine verbesserte pflanzliche Mikronährstoffaneignung und eine damit verbundene Erhöhung der Krankheitsresistenz am Modellsystem „take-all“ bei Weizen zu untersuchen.

In einem einleitenden Vorversuch wurde unter Verwendung eines schnellen Screeningtests, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelt worden war, über Bioindikation mit Gurkenkeimlingen (*Cucumis sativus* L.) zunächst die prinzipielle Wirksamkeit verschiedener, kommerziell erhältlicher Biofertilizerpräparate auf der Basis von *Trichoderma* und *Bacillus* im Hinblick auf Keimung, Wachstumsförderung, sowie die Mineralstoff-mobilisierende und Pathogen-suppressive Aktivität der Präparate unter kontrollierten Laborbedingungen getestet. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung der Keimrate, der Spross-, und Wurzel trockenmasse und der Blattfläche bei Gurkenkeimlingen nach Behandlung mit den Biofertilizerpräparaten T-50, Biomex, BioHealth-WSG, BioHealth-G, und SP-11. Eine Stimulierung des Wurzellängenwachstums war nur nach Saatgutinokulation mit T-50 und BioHealth-G nachweisbar. Für den *Trichoderma*-Biofertilizer T-50 war über *in vitro* Tests auch eine antagonistische Wirkung gegenüber dem „take-all“ Erreger *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*), und die Mobilisierung von schwerlöslichem Calciumphosphat, jedoch nicht von Manganoxid nachweisbar. Dagegen ergab die Bioindikation mit Keimlingen der Gartenkresse (*Lepidium sativum* L.) keine Effekte. Mit Hilfe des beschriebenen schnellen Biotests konnte also das Aktivitätspotenzial verschiedener Biofertilizer auf *Trichoderma*-Basis, innerhalb weniger Tage durch Erhöhung der Keimrate und Wachstumsstimulierung bei Gurkenkeimlingen in einem Nährlösungskultursystem nachgewiesen werden.

In ähnlicher Weise wurde in einem Folgeexperiment auch die Stimulierung der Keimung und eine Förderung der Keimlingsentwicklung bei künstlich gealtertem Gurkensaatgut durch verschiedene *Trichoderma*-Biofertilizer (T-50, Biomex, BioHealth and BioHealth-G) nachgewiesen. Diese Ergebnisse weisen möglicherweise auf eine generelle Wirksamkeit von *Trichoderma*-Inokulationen im Hinblick auf eine verbesserte Keimfähigkeit und Keimlingsentwicklung hin. Die fördernde Wirkung bei gealtertem Saatgut könnte die Möglichkeit bieten, eine Verminderung der Saatgutqualität während der Lagerung durch vorbeugende *Trichoderma*-Behandlungen auszugleichen.

Ziel des dritten Experiments war es, die Fähigkeit von *Trichoderma*-Biofertilizern zur Verbesserung der Mangananeignung von Weizen in einem Modellversuch in Minrhizotronen (Wurzelbeobachtungskästen) mit einem, unter Feldbedingungen *Ggt*-vorinfiiziertem Boden zu untersuchen. In keiner der Versuchsvarianten konnten *Ggt*-Wurzelinfektionen bei Weizen nachgewiesen werden. Das Infektionspotenzial des Pilzes wurde wahrscheinlich durch hohe Wurzelraumtemperaturen während der Gewächshausanzucht in den Sommermonaten beeinträchtigt. Das Sprosswachstum wurde durch die *Trichoderma*-Behandlungen nicht beeinflusst, während in den T-50 und BioHealth-G Varianten die Wurzelbiomasse um etwa 20% erhöht wurde, was besonders in den ersten beiden Wochen der Keimlingsentwicklung mit einer starken Förderung des Wurzellängenwachstums (40-80%) verbunden war. Die Biofertilizerbehandlungen beeinflussten nicht den pH-Wert im wurzelfernen Boden (pH 5.9-6.2), während der pH-Wert in der Rhizosphäre und an der Wurzeloberfläche in den BioHealth-G-, und T-50+SP-11- Behandlungen um 0.3-0.4 Einheiten erniedrigt wurde. Sowohl die Mn-, als auch die Zn-Versorgung der Weizenpflanzen war in allen Versuchsvarianten ausreichend. Die Applikation von Biohealth-G and T-50+SP-11 erhöhte die Sproßkonzentrationen von Zn aber nicht von Mn was auf eine selektive Förderung der Mikronährstoffaneignung durch die Biofertilizerbehandlungen schließen lässt.

Um die Rolle von Rotationssystemen mit Hafer als Vorkultur bei der Verbesserung des Mn-Ernährungsstatus und der Verminderung der Anfälligkeit gegenüber „take-all“-Infektionen in der Weizen-Folgekultur zu untersuchen, wurde ein Gefäßversuch in Gewächshausanzucht mit Böden von einem Feldversuchsstandort, die nach Weizen-, bzw. Hafer Vorkultur, Unterschiede im *Ggt*-Infektionspotenzial aufwiesen. Aufgrund der Erfahrungen des vorangegangenen Experiments, wurde die Wurzelraumtemperatur des Gefäßversuchs mit Hilfe eines Kühlsystems auf 10-15°C eingestellt, um die *Ggt*-Infektion der Versuchspflanzen unter Gewächshausbedingungen zu fördern. Die Ergebnisse zeigten eine Verbesserung des Pflanzenwachstums und des Mn-Ernährungsstatus verbunden mit einer Verminderung der „take-all“-Infektionen im Boden aus der Hafer-Vorkultur. Eine mikrobiologische Charakterisierung ergab eine Erhöhung des Anteils Mn-reduzierender Mikroorganismen in der Rhizosphäre, die offensichtlich an der Erhöhung der Pflanzenverfügbarkeit von Mn im Boden aus der Hafer-Vorkultur beteiligt waren. Im Gegensatz dazu wurde im Rhizosphärenboden aus der Weizenvorkultur ein erhöhter Anteil an Mn-oxidierenden Mikroorganismen nachgewiesen, welche vermutlich durch Immobilisierung (Mn Oxidation) die Mn-Verfügbarkeit herabsetzten und so zu einer verstärkten Anfälligkeit

gegenüber *Ggt*-Infektion beitragen. Sowohl die Mn-, als auch die Zn-Konzentrationen waren im Sproßgewebe der Weizenpflanzen auf dem Boden der Hafervorkultur gegenüber der Weizenvorkultur signifikant erhöht.

Ein weiterer Gefäßversuch wurde zur Klärung der Frage angesetzt, ob unterschiedliche Vorkulturen einen differenziellen Einfluss auf die Krankheitsanfälligkeit gegenüber „take-all“ im Weizenanbau bedingen. Der Gefäßversuch wurde mit je einer Mn-effizienten und einer Mn-ineffizienten Weizensorte durchgeführt, die in Böden mit unterschiedlichen Vorkulturen angezogen wurden. Die Böden stammten von einem Feldversuchsstandort mit Hafer-, Schwarzhafer-, Senf-, und Raps-Vorkulturen. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Vorkulturvarianten den Anteil an Mn-reduzierenden Mikroorganismen in der Rhizosphäre und das Mn-Reduktionspotenzial im wurzelfernen Boden erhöhten, die „take-all“-Infektionen verminderten, und den Mn-, und Zn-Ernährungsstatus bei beiden Weizensorten verbesserten. Das Wurzelwachstum wurde in Böden mit Hafer-, und Schwarzhafer-Vorkultur stimuliert.

Abschließend kann aus den oben beschriebenen Versuchsergebnissen geschlossen werden, daß *Trichoderma*-Biofertilizer einen signifikanten Beitrag zur Stimulierung der Keimung, der Förderung des frühen Pflanzenwachstums, der Mobilisierung von Mineralstoffen leisten und als Pathogen-Antagonisten wirken können. Jedoch können auch andere Faktoren, wie die Verwendung geeigneter Vorkultursysteme, entscheidend zur Krankheitsresistenz durch eine verbesserte Mikronährstoffversorgung beitragen.

Rhizosphärenmanagement durch Verwendung verschiedener Vorkulturen (Hafer, Schwarzhafer, Senf, Raps) kann „take-all“-Infektionen im Weizenanbau vermindern und den Mn-, und Zn-Ernährungsstatus verbessern. Ein erhöhtes, mikrobielles Mn-Reduktionspotenzial im Boden kommt dabei als einer der Mechanismen in Frage, welche die „take-all“ Resistenz erhöhen. Daher unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Bedeutung von Rhizosphärenmikroorganismen und der Mikronährstoffernährung für die Krankheitsresistenz gegen „take-all“ bei Weizen. Ein besseres Verständnis der Wechselbeziehungen zwischen Pflanze, Boden, Rhizosphärenmikroorganismen und Mineralstoffernährung könnte daher zu einer weiteren Verbesserung der Strategien für ein Rhizosphärenmanagement, im Sinne der Entwicklung von ökonomisch und ökologisch nachhaltigen landwirtschaftlichen Produktionssystemen beitragen.