

Screening-Test für bakterielle Antagonisten des südlichen Wurzelgallennematoden

Tobias Stucky¹, Miro Hochstrasser¹, Silvan Meyer¹, Tina Segessemann², Andrea C. Ruthes³, Christian H. Ahrens², Paul Dahlin¹ und Cosima Pelludat³

¹Agroscope, 8820 Wädenswil, Schweiz

²Agroscope, 8046 Zürich, Schweiz

³Agroscope, 1260 Nyon, Schweiz

Auskünfte: Cosima Pelludat, E-mail: cosima.pelludat@agroscope.admin.ch; Paul Dahlin, E-mail: paul.dahlin@agroscope.admin.ch

<https://doi.org/10.34776/afs14-229> Publikationsdatum: 16. November 2023



Abb. 1 | Gesunde Tomatenwurzel (links) und Tomatenwurzel mit Gallenbildung, verursacht durch den Südlichen Wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita* (rechts.).

Foto: Paul Dahlin, Agroscope

Zusammenfassung

Pflanzenparasitische Nematoden sind wichtige Agrarschädlinge, gegen die heute kaum mehr wirksame Bekämpfungsmethoden bestehen. Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit, veröffentlicht in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift MDPI Microorganisms, war daher die Entwicklung eines zuverlässigen Screening-Tests, der die antagonistische Wirkung von Bakterien gegen den südlichen Wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita* beurteilt. Im Gegensatz zur herkömmlichen Praxis wurde im neu entwickelten Screening-Test die antagonistische Aktivität nicht visuell, durch die Lebensfähigkeit der Nematoden, sondern durch die Bildung von Wurzelgallen an einer Indikatorpflanze bewertet. Vierundvierzig Bakterienisolate von Schweizer Randenwurzeln wurden auf Gurke als Indikatorpflanze getestet. Die vielversprechendsten Stämme des Testverfahrens wurden danach auf ihr Potenzial zur Bekämpfung von *M. incognita* in weiterführenden Gewächshausversuchen getestet. Zwei Stämme, *Pseudomonas* spp. 105 und 108, reduzierten die Bildung von Wurzelgallen – unabhängig von der Anwendungsmethode – signifikant. Die vollständige Genomsequenzierung beider Stämme ordnete sie der *Pseudomonas fluorescens*-Gruppe zu, in der sich bereits bekannte Antagonisten von Nematoden- und pflanzenpathogenen Mikroorganismen befinden. Der entwickelte Screening-Test erlaubt zukünftig eine einfachere und zuverlässigere Identifizierung von erfolgsversprechenden nematiziden Bakterien.

Key words: *Meloidogyne incognita*, antagonist, root-knot nematode control, biological nematicide, complete genome.

Einleitung

Der pflanzenparasitische südliche Wurzelgallennematode *Meloidogyne incognita* ist ein weltweit vorkommender Wurzelgallennematode (Wesemael *et al.*, 2011, Dong *et al.*, 2012). Wie der Name sagt, ist der Nematode aufgrund seiner Temperaturbedürfnisse in tropischen und subtropischen Gebieten weit verbreitet, während er in unserer gemässigten Klimazone vorwiegend in Gewächshäusern vorkommt. Im Tessin kann dieser Schädling jedoch auch im Freiland überwintern. Wurzelgallennematoden haben ein breites Wirtsspektrum und verursachen bei mehreren wichtigen Feld- und Gewächshauskulturen erhebliche Schäden (Trudgill *et al.*, 2001, Subedi *et al.*, 2020). Schätzungen der durch pflanzenparasitische Nematoden verursachten ökonomischen Schäden gehen von einem jährlichen Verlust in Milliardenhöhe aus (Bernard *et al.*, 2017, Mesa-Valle *et al.*, 2020). Der Lebenszyklus der Wurzelgallennematoden beginnt mit dem Eindringen der juvenilen Nematoden des zweiten Larvenstadiums (L2) in die Wurzelspitzen. Anschliessend wandern die Nematoden zum Leitgewebe der Pflanzenwurzel. Speichelsekrete aus dem Mundstachel der Nematoden induzieren die Bildung von Riesenzellen, die der Ernährung der sesshaften Nematoden dienen (Caillaud *et al.*, 2008). Als Reaktion der Pflanze auf das Eindringen der Nematoden und die Bildung von Riesenzellen entstehen die namensgebenden Wurzelgallen (Abb. 1). Die Nematoden entwickeln sich zu adulten, sesshaften, birnenförmigen Weibchen oder freilebenden, wurmförmigen Männchen. Reife Weibchen können auch ohne Begattung durch Männchen Nematodeneier produzieren (Jungfernzeugung), die sie in einer gallertartigen Matrix ausserhalb der Wurzeln ablegen. Aus diesen schlüpfen präparasitäre Nematodenlarven, die in den Boden gelangen und anschliessend wieder in Wurzeln eindringen.

Ausser den adulten Männchen sind nur die infektiösen L2 mobil und freilebend. Diese können, bis sie eine geeignete Wurzel für ihre Ernährung finden, eine längere Zeit im Boden verharren. Diese Zeitspanne ist sowohl für die chemisch-synthetische als auch für die biologische Bekämpfung von Wurzelgallennematoden wichtig. Da aufgrund von Bedenken hinsichtlich der menschlichen Gesundheit und der Umweltsicherheit kaum mehr chemische Nematizide in der Schweiz und in vielen anderen Ländern zugelassen sind (Oka, 2020, Sasanelli *et al.*, 2021), wird heute intensiv nach alternativen Bekämpfungsmethoden gesucht. Bei der biologischen Bekämpfung werden Nematoden mittels Mikroorganismen im Boden bekämpft (Pal und Mc Spadden Gardener, 2006, Flores Francisco *et al.*, 2021). Bakterien der Gattung *Pseudomonas* spp. werden dabei häufig als antagonistische Mikroorganismen genutzt und lassen sich im Labor auch leicht kultivieren. *In-vitro*- und *on-planta*-Studien haben ausserdem gezeigt, dass Suspensionen von Pseudomonaden oder deren Zellüberstände erfolgreich zur Bekämpfung von Wurzelgallennematoden eingesetzt werden können (Soliman *et al.*, 2019, Nishantha *et al.*, 2018). Aktuell ist in der Schweiz nur das biologische Produkt BioAct WG zur Bekämpfung von Wurzelgallennematoden zugelassen und andere bekannte Antagonisten sind nicht an das Schweizer Klima angepasst. Eine neue Screening Methode für in der Schweiz vorkommende Bakterien mit antagonistischer Wirkung gegen *M. incognita* würde die Möglichkeit bieten, neue Produkte zu entwickeln, die für das zukünftige, integrierte Management von pflanzenparasitären Nematoden genutzt werden können.

Ziel dieser Forschungsarbeit, veröffentlicht in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift MDPI Microorganisms bei Stucky *et al.*, (2023), war daher die Etablierung eines

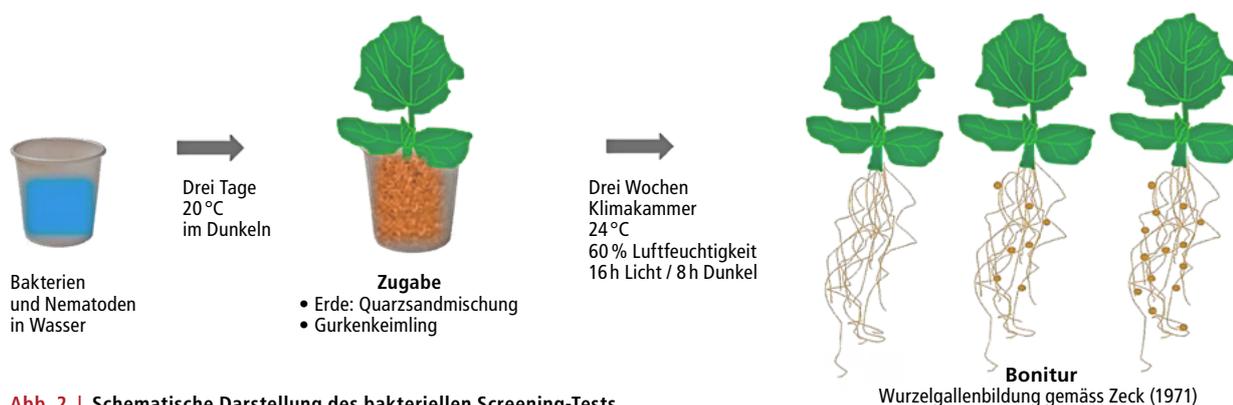


Abb. 2 | Schematische Darstellung des bakteriellen Screening-Tests gegen *Meloidogyne incognita* im zweiten Larvenstadium (L2) mit Gurkensetzlingen.

schnellen und zuverlässigen Methode für das Screening von potenziellen bakteriellen Antagonisten gegen *M. incognita* im Labor und die genetische Analyse vielversprechender Isolate. Im neuen Screening-Test beruht die Beurteilung des antagonistischen Potenzials auf der Wurzelgallenbildung einer Indikatorpflanze und somit auf der Wurzelinfektiosität von Nematoden nach einer Behandlung mit Antagonisten. Dies ist entgegen der herkömmlichen Praxis, die nur die Lebensfähigkeit von Nematoden visuell unter dem Mikroskop bewertet. Im neu entwickelten Screening-Test wurden 44 Bakterienisolate von Schweizer Randenwurzeln im Labor auf ihre antagonistische Aktivität gegen Larven des zweiten Stadiums des südlichen Wurzelgallennematoden *Meloidogyne incognita* (L2) auf Gurke als Indikatorpflanze evaluiert. So ausgewählte Bakterien wurden auf ihre nematizide Wirkung in weiterführenden Gewächshausexperimenten getestet.

Um zukünftig Kandidaten für die Wurzelgallennematoden-Bekämpfung besser auswählen zu können, nutzte Agroscope die im Rahmen des Forschungsprogrammes «Mikrobielle Biodiversität» aufgebaute Kompetenz, Bakterienisolate auf Genombasis studieren zu können. So konnte die phylogenetische Verwandtschaft der erfolgreichsten bakteriellen Isolate aus den durchgeführten Versuchen mit bereits charakterisierten bakteriellen Antagonisten festgestellt werden.

Material und Methoden

Aufzucht von *M. incognita*

Die Vermehrung von *M. incognita* erfolgte auf Tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Oskar unter Gewächshaus-Bedingungen (15/9 Stunden Licht-/Dunkelzyklus bei 25/19°C und 60 % Luftfeuchtigkeit). Juvenile des zweiten Larvenstadium (L2) wurden mit Hilfe einer Sprühanlage aus stark vergallten Wurzelsystemen extrahiert (Sikora *et al.*, 2018). Die geschlüpften L2 wurden täglich gesammelt und bis zu ihrer Verwendung (3–7 Tage) bei 6°C gelagert.

Bakterienisolierung

Bakterien wurden von Randenwurzeln der Sorte «Pablo» (Gewächshaus Agroscope - Wädenswil (CH)) isoliert, indem kleine Wurzelteile in Phosphatpuffer geschüttelt und der Überstand in logarithmischen Verdünnungen auf Nährplatten aufgetragen wurde. Kolonien von Reinkulturen wurden durch Proteinanalysen mittels MALDI-TOF (Gekenidis *et al.*, 2014) und Teilsequenzierung der 16S rRNA-Gene auf Gattungsebene identifiziert.

Aufbau Screening-Test

Nematoden-Bakterien-Mischungen bestanden aus einer 6 ml Wassersuspension, die ca. 250 L2 enthielt und 4 ml einer frisch hergestellten Bakteriensuspension (OD_{600nm} von 0,5 in autoklaviertem Leitungswasser) in einem 25-ml-Plastikbecher. Nach drei Tagen bei 20°C im Dunkeln wurden 20 cm³ einer Substratmischung aus gedämpfter Erde und Silbersand (1:3, v/v) in die Plastikbecher gegeben und ein drei Tage alter Gurkenkeimling (*Cucumis sativus* cv. Sprinter F1) gepflanzt. Nach drei Wochen in einer Klimakammer bei 24°C, 60 % Luftfeuchtigkeit und einem 16/8-Stunden-Licht/Dunkel-Zyklus wurden die durch *M. incognita* (L2) verursachte Wurzelgallenbildung gemäss Zeck (1971) bonitiert, wobei die 0 für keine Gallen und die 10 für abgestorbene Wurzeln steht (Abb. 2).

Test unter Bodenbedingungen im Gewächshaus

Die nematizide Aktivität von Bakterienisolaten wurden im Gewächshaus auf Gurke oder Tomate (Sorte cv. Moneymaker) als Indikator-Pflanzen getestet. Töpfe, gefüllt mit 750 cm³ gedämpfter Erde:Quarzsandmischung (1:3, v/v), wurden mit ca. 4000 *M. incognita* L2 inokuliert. Mit Ausnahme der bakterienfreien Kontrollen (n=8), wurden drei Tage nach Zugabe der Nematoden 25 ml Bakteriensuspension (OD_{600nm} von 0,5) zu der mit Nematoden versetzten Erde gegeben. Nach sieben Tagen wurden in die Töpfe drei Wochen alte Gurken- oder Tomatenpflanzen gepflanzt. Nach vier Wochen Wachstum im Gewächshaus erfolgte die Bonitur der Wurzelgallenbildung nach Zeck (1971).

Bakterienapplikation auf Mineralwollpfropfen

Gurkensetzlinge wurden in Grodan SBS-Mineralwollpfropfen (SBS 36/77, Grodan, NL) angezogen. Nach 14 Tagen Wachstum wurden sie mit 10 ml Bakteriensuspension ($OD_{600nm} = 0,5$) getränkt und in Töpfe gepflanzt, deren Erde:Quarzsandmischung drei Tage zuvor mit ca. 4000 *M. incognita* L2 inokuliert worden war. Für jede Behandlung gab es sieben Replikate (n=7). Nach vier Wochen erfolgte die Wurzelbonitur nach Zeck (1971).

De-novo-Assemblierung und Annotation der Genome

Die Gesamt-DNA wurde aus Bakterienzellen der Stämme 105 und 108 isoliert (Davis *et al.*, 1986). Um die vollständige Genomsequenz zusammensetzen zu können, wurden für die Sequenzierung sowohl Illumina short-read als auch Oxford Nanopore long-read Sequenzierungstechnologien verwendet. Die qualitätsüberprüften Sequenzen wurden über mehrere Kontroll- und Zwischenschritte zur De-novo-Assemblierung und nachfolgenden Annotierung der Genome verwendet.

Phylogenetische Analyse der Genome

Ein phylogenetischer Baum von 70 *Pseudomonas*-Stämmen, der die Verwandtschaft dieser Stämme untereinander abbildet, einschliesslich der *Pseudomonas*-Stämme 105 und 108, wurde auf der Basis von 16 «house keeping» Genen, die in jeder Bakterienspezies vorkommen, erstellt. Die Auswahl der 68 Stämme, deren Genomsequenzen von der NCBI-Datenbank heruntergeladen wurde, basierte auf einer Literaturrecherche nach verfügbaren *Pseudomonas*-Genomen von Stämmen mit nematizider Wirkung, einer früheren Studie über *Pseudomonas*-Isolate mit Biokontrollpotenzial (De Vrieze *et al.*, 2020) und den fünf Genomen, die den *Pseudomonas*-Stämmen 105 und 108 am ähnlichsten sind.

Datenanalyse

Statistische Varianzanalysen (ANOVA mit Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) Post-hoc-Test ($p \leq 0,05$)) wurden mit der SPSS-Software durchgeführt.

Resultate

Screening-Test und selektierte Bakterien

Mittels des Wurzelgallenindex wurde die antagonistische Aktivität von 44 Bakterien, isoliert von Schweizer Randenwurzeln, bestimmt. Die Bakterienisolate 102, 105, 108, 112, 119 und 157 waren die wirksamsten Antagonisten von *M. incognita* (Abb. 3). Sie führten in diesem ersten Screening zu einer zweifachen oder noch

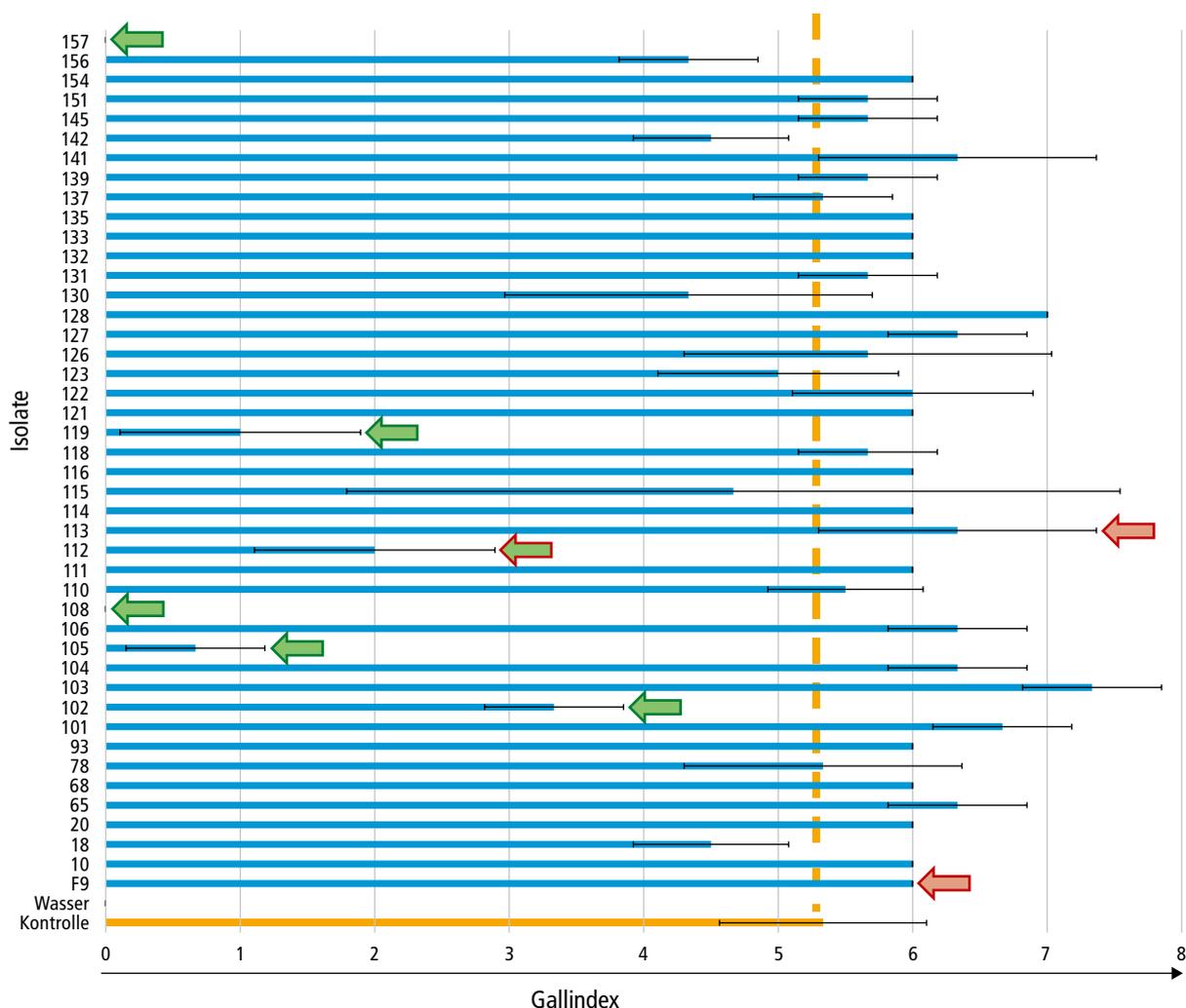


Abb. 3 | Screening von Bakterienstämmen gegen *Meloidogyne incognita* im zweiten Larvenstadium (L2). Der Wurzelgallenindex wurde nach Zeck (1971) bewertet: 0 = keine Wurzelgallenbildung und 10 = höchste durch *M. incognita* verursachte Wurzelgallenbildung. Die orange Längslinie zeigt die durch *M. incognita* verursachte Wurzelgallenbildung in der unbehandelten (keine Zugabe von Bakterien) Kontrolle. Wasser = Negativkontrolle, bei der den Gurkensetzlingen keine Nematoden zugesetzt wurden. Die Fehlerbalken (grau) stellen die Standardabweichungen der drei Wiederholungen ($n=3$) pro Behandlung dar. Pfeile weisen auf die Stämme hin, die in einer Wiederholung geprüft wurden. Grün: Reduktion der Gallenbildung, Rot: keine Reduktion der Gallenbildung, Innenfärbung Pfeil: Ergebnis erster Durchgang, Färbung Pfeilrahmen: Ergebnis zweiter Durchgang.

grösseren Verringerung des Gallenindexes. Im Vergleich dazu wiesen die bakterienlose Kontrolle oder die Negativkontrollen mit Bakterien, die über keine antagonistische Wirkung verfügen (*P. orientalis* F9 und Isolat 113) einen Gallenindex über fünf auf.

Diese Bakterienisolate wurden erneut im Screening-Test auf ihre antagonistische Fähigkeit gegen *M. incognita* L2 überprüft. Mit Ausnahme von Stamm 112 zeigten die Stämme erneut eine antagonistische Wirkung (Abb. 3), während die Negativkontrollen wiederum wirkungslos blieben. Dies bestätigte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse im neu etablierten Screening-Test.

Test unter Bodenbedingungen im Gewächshaus

Die durch den Screening-Test ausgewählten *Pseudomonas*-Stämme 102, 105, 108, 119, und 157 wurden in einem weiterführenden Versuchen auf Gurkensetzlingen unter Bodenbedingungen im Gewächshaus getestet. Insbesondere die Stämme 105 und 108 erreichten eine deutliche und signifikante Verringerung der Wurzelgallenbildung im Vergleich zu den beiden Kontrollen, Wasser und *P. orientalis* F9 (Bakterium ohne antagonistische Wirkung, Abb. 4).

Die vielversprechendsten Isolate, *Pseudomonas*-Stamm 105 und 108 wurden daraufhin auch mit getopften Tomatenpflanzen als Indikatorpflanze getestet. Beide Stämme reduzierten die Wurzelgallenbildung von *M. incognita* gegenüber der Kontrolle (Tab. 1). Eine statistisch signifikante Reduktion konnte jedoch nur mit einer höheren Zellkonzentration von $OD_{600nm} = 1,5$ erzielt

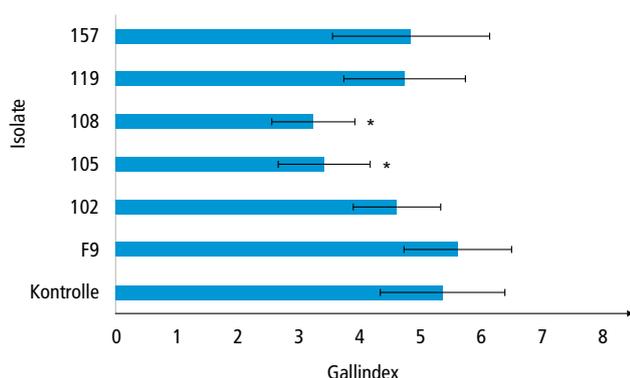


Abb. 4 | Prüfung ausgewählter *Pseudomonas*-Stämme gegen *Meloidogyne incognita* im zweiten Larvenstadium (4000 L2/Topf) mit Gurkensetzlingen, die vier Wochen lang in der behandelten Erde erwachsen ($n=8$). Der Wurzelgallenindex wurde nach Zeck (1971) bewertet: 0 = keine Wurzelgallenbildung und 10 = höchste Wurzelgallenbildung. Die Fehlerbalken (grau) stellen die Standardabweichungen der Wiederholungen dar. Signifikante Unterschiede sind durch ein Sternchen gekennzeichnet. Kontrollen: Wasser und *P. orientalis* F9 (F9, Bakterium ohne antagonistische Wirkung).

Tab 1 | Bewertung der Tomatenwurzelgallen vier Wochen nach der Pflanzung in nematodenhaltiger Erde, die 4000 *M. incognita* L2/Topf.

Behandlung	Wurzelgallen-Index	
	$OD_{600nm} 0,5$	$OD_{600nm} 1,5$
Kontrolle (nur Nematoden)	$4,55 \pm 0,52$	$4,82 \pm 0,57$
Bakterienstamm F9 (negative Kontrolle für bakteriellen Antagonismus)	$4,6 \pm 1,12$	$5,00 \pm 0,53$
Bakterienstamm 105	$4,05 \pm 1,1$	$3,86 \pm 0,64^*$
Bakterienstamm 108	$4,12 \pm 1,2$	$3,29 \pm 1,16^*$

* Signifikante Unterschiede im Vergleich zu Kontrollpflanzen (nematodenhaltiger Boden ohne Zugabe von Bakterien).

werden, während die in den vorherigen Tests genutzte Konzentration von $OD_{600nm} = 0,5$ sich statistisch nicht von den Kontrollen unterschieden.

Bakterienapplikation auf Mineralwollpfropfen

Die *Pseudomonas*-Stämme 102, 105, 108, 119 und 157 wurden ebenfalls als Wurzelballen-Behandlung getestet. Dazu wurden sie auf die Mineralwolle von Gurkensetzlingen gegeben. Bei dieser Applikationsform schützten die Bakterien die Gurkenpflanzen besser vor einer *M. incognita* Infektion als nach der Giess-Applikation auf Erde (Abb. 4 und 5). Bis auf *Pseudomonas*-Stamm 157 führte die Applikation der Stämme zu einer signifikanten Verringerung der Wurzelgallenbildung im Vergleich zu Kontrollpflanzen (Abb. 5). Wie in den vorangegangenen Versuchen zeigten 105 und 108 die stärkste antagonistische Wirkung.

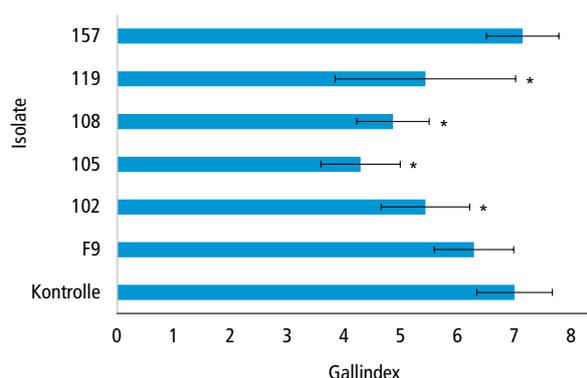


Abb. 5 | Ausgewählte *Pseudomonas*-Stämme als Schutzmittel gegen *Meloidogyne incognita* im zweiten Larvenstadium (L2) durch Applikation der Bakterien auf die Mineralwolle von Gurkenwurzeln. Die Wurzelgallen wurden nach Zeck (1971) bewertet, 0 = keine Wurzelgallenbildung und 10 = höchste Wurzelgallenbildung. Die Fehlerbalken (grau) stellen die Standardabweichungen der Wiederholungen dar. Signifikante Unterschiede sind durch ein Sternchen gekennzeichnet. Kontrollen: Wasser und *P. orientalis* F9 (F9, Bakterium ohne antagonistische Wirkung).

Genomsequenzierung und phylogenetische Analyse

Für die zukünftige Identifizierung der antagonistischen Wirkmechanismen, wurden die Genome von *Pseudomonas*-Stämmen 105 und 108 sequenziert und annotiert. Eine phylogenetische Analyse zeigte, dass beide Isolate in zwei separate Untergruppe der *P. fluorescens* Gruppe zugeordnet werden können. Stamm 105 wurde eng mit den charakterisierten Stämmen *Pseudomonas brassicacearum* und *Pseudomonas rhizophila* gruppiert, Stamm 108 mit charakterisierten *P. fluorescens*-Stämmen. In beiden dieser *P. fluorescens* Untergruppen befinden sich weitere Stämme mit antagonistischem Potential gegen Nematoden oder andere phytopathogene Mikroorganismen.

Diskussion

Anhand von 44 getesteten Schweizer Bakterienstämmen konnte in der Studie von Stucky *et al.*, (2023) gezeigt werden, dass der neu etablierte Screening-Test effizient bakterielle *M. incognita* Antagonisten identifizieren kann.

Durch die Exposition von freilebenden *M. incognita* des zweiten Larvenstadiums (L2) in einer bakteriellen Suspension mit anschließender Infektion von Gurkensämlingen, kann eine Nematoden-hemmende Wirkung der getesteten Bakterien durch die Reduktion der Wurzelgallenbildung gemessen werden. Im neuen Screening-Test wird die antagonistische Wirkung der Bakterien somit anhand der L2-Wurzelinfektiosität beurteilt. Dies ist ein Vorteil gegenüber den meisten bisher veröffentlichten Studien, bei denen die Lebensfähigkeit der L2-Nematoden nur visuell unter dem Mikroskop bewertet wird. Dies kann zu einer falschen Beurteilung ihrer Aktivität führen, da sich inhibierte Nematoden möglicherweise von der Behandlung erholen können (Huang *et al.*, 2016, Choi *et al.*, 2020, Liu *et al.*, 2020).

Die im neuen Screening-Test selektionierten Bakterien zeigten auch im erweiterten Gewächshaustest das Potential, L2 an der Infektion von Gurken- und Tomatenwurzeln erfolgreich zu hindern. Bakterien der Gattung *Pseudomonas* spp. sind dafür bekannt, dass sie Pflanzenwurzeln besiedeln (Mhatre *et al.*, 2019, Zhao *et al.*, 2021). Die schützenden Eigenschaften der ausgewählten *Pseudomonas*-Stämme könnten daher mit der Wurzelbesiedlung der Indikatorpflanze zusammenhängen und die Applikation von Bakterien auf die Mineralwolle den Schutz der Gurkenwurzeln besonders gut fördern.

Mit zwei unterschiedlichen Zellkonzentrationen der beiden wirksamsten *Pseudomonas*-Stämme, 105 und 108, wurde ebenfalls ein Test mit Tomaten als Indikatorpflanze durchgeführt. Eine signifikante Reduktion wurde nur bei einer höheren Zellkonzentration der Bakterien er-

zielt. Es ist daher möglich, dass die beiden *Pseudomonas*-Stämme 105 und 108 Tomatenwurzeln nicht so gut besiedeln können wie Gurkenwurzeln. Eine frühere Studie zeigte, dass die Wirkung von *Pseudomonas fluorescens* CHA0 gegen *M. incognita* abhängig von Pflanzenart, Alter und Genotyp ist (Siddiqui und Shaukat, 2003). Die im Vergleich zu anderen biologischen Nematiziden sehr vielversprechenden *Pseudomonas*-Stämme 105 und 108 gruppieren sich phylogenetisch zu anderen *Pseudomonas*-Biokontrollstämmen. Es wäre daher sinnvoll, die Stämme auch gegen andere pflanzenpathogene Nematoden, Pilze und Oomyceten zu testen. Der entwickelte Screening-Test sollte es ebenfalls ermöglichen, Mischungen von Stämmen mit biokontrollierender Wirkung auf ihre robuste und möglicherweise sogar synergistische nematizide Wirkung zu testen.

Die vollständige Genomsequenz der Stämme ist eine wichtige Grundlage, zur Identifizierung der bakteriellen Wirkmechanismen, die *M. incognita* an der Ausbildung von Wurzelgallen hindert. Screening-Tests sind arbeitsintensiv und zeitaufwendig und können nur mit einer begrenzten Anzahl von Stämmen durchgeführt werden. Daher ist man bestrebt, die genetischen Faktoren zu identifizieren, die einen Bakterienstamm dazu befähigen, antagonistisch zu wirken. Mit Hilfe bekannter Gene kann auf molekularer Basis (z.B. PCR) eine Vorauswahl aus einer Vielzahl von Bakterien getroffen werden. Ebenso kann eine Analyse für alle öffentlich verfügbaren, kompletten Bakteriengenome durchgeführt werden, so dass man erfolgsversprechende Stämme identifizieren und vorselektionieren kann, um sie dann im Screening-Test zu überprüfen.

Schlussfolgerungen

- Der in dieser Studie etablierte Labor-Screening-Test führte zur Isolierung von *Pseudomonas*-Stämmen, deren antagonistisches Potential gegen *M. incognita* L2 auch in weiterführenden Gewächshausversuchen nachgewiesen werden konnte.
- Die vollständigen Genomsequenzen von Stamm 105 und 108 ermöglichen die Klärung ihrer antagonistischen Wirkmechanismen gegen *M. incognita*.
- Künftige Untersuchungen müssen das antagonistische Potenzial ausgewählter Stämme in grösseren Gewächshausversuchen und/oder bei der Anwendung im Freiland bestätigen.
- Die Reduktion des Einsatzes chemisch-synthetischer Bekämpfungsmittel durch biologische und nachhaltigere Lösungen ist ein sehr wichtiger Forschungsbereich von Agroscope für eine zukunftsorientierte, nachhaltige und resiliente Agrarwirtschaft. ■

Dank

Die Autoren danken der Extension Gemüsebau von Agroscope, Veronika Zenger, Vera Dreyfuss, Brigitta Teschner, Eliana Thyda Sy und Reinhard Eder für die technische Unterstützung bei den Labor- und Gewächshausarbeiten und Patrik Kehrl für seine wertvollen Kommentare bei der Durchsicht des Manuskripts.

Literatur

- Bernard, G. C., Egnin, M., & Bonsi, C. (2017). The impact of plant-parasitic nematodes on agriculture and methods of control. In *Nematology: Concepts, Diagnosis and Control*, Sha, M.M., Mahmood, M., Eds., InTech, Rijeka, Croatia chapter 4. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68958>.
- Caillaud, M. C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., de Almeida Engler, J., Abad, P., Rosso, M. N., & Favery, B. (2008). Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *J. Plant Physiol.*, **165**(1), 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.007>.
- Choi, T. G., Maung, C. E. H., Lee, D. R., Henry, A. B., Lee, Y. S., & Kim, K. Y. (2020). Role of bacterial antagonists of fungal pathogens, *Bacillus thuringiensis* KYC and *Bacillus velezensis* CE 100 in control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* and subsequent growth promotion of tomato. *Bio-control Sci. Technol.* **30**(7), 685–700. <https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1765980>.
- Davis, L. G., Dibner, M. D., & Battley, J. F. (1986). *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier: New York – Amsterdam – London.
- De Vriese, M., Varadarajan, A. R., Schneeberger, K., Bailly, A., Rohr R. P., Ahrens, C. H., & Weisskopf, L. (2020). Linking Comparative Genomics of Nine Potato-Associated *Pseudomonas* Isolates With Their Differing Biocontrol Potential Against Late Blight. *Front Microbiol.* Apr 30, 11:857. doi: 10.3389/fmicb.2020.00857.
- Dong, L., Huang, C., Huang, L., Li, X., & Zuo, Y. (2012). Screening plants resistant against *Meloidogyne incognita* and integrated management of plant resources for nematode control. *Crop Prot.* **33**, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.11.012>.
- Flores Francisco, B. G., Ponce, I. M., Plascencia Espinosa, M. Á., Mendieta Moctezuma, A., & López Y López, V. E. (2021). Advances in the biological control of phytoparasitic nematodes via the use of nematophagous fungi. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **37**(10), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03151-x>.
- Gekenidis, M. T., Studer, P., Wüthrich, S., Brunisholz, R., & Drissner, D. (2014). Beyond the matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) biotyping workflow: in search of microorganism-specific tryptic peptides enabling discrimination of subspecies. *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 4234–41. doi: 10.1128/AEM.00740-14.
- Huang, W. K., Cui, J. K., Liu, S. M., Kong, L. A., Wu, Q. S., Peng, H., He, W. T., Sun, J. H., & Peng, D. L. (2016). Testing various biocontrol agents against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in cucumber plants identifies a combination of *Syncephalastrum racemosum* and *Paecilomyces lilacinus* as being most effective. *Biol. Control*, **92**, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.008>.
- Liu, G., Lin, X., Xu, S., Liu, G., Liu, F., & Mu, W. (2020). Screening, identification and application of soil bacteria with nematicidal activity against root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on tomato. *Pest Manag. Sci.* **76**(6), 2217–2224. <https://doi.org/10.1002/ps.5759>.
- Mesa-Valle, C. M., Garrido-Cardenas, J. A., Cebrian-Carmona, J., Talavera, M., & Manzano-Agugliaro, F. (2020). Global research on plant nematodes. *Agronomy*, **10**(8), 1148. <https://doi.org/10.3390/agronomy10081148>.
- Mhatre, P. H., Karthik, C., Kadirvelu, K., Divya, K. L., Venkatasalam, E. P., Srinivasan, S., & Shanmuganathan, R. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for nematodes biocontrol. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **17**, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.009>
- Nishantha, K., Jayasiri, H. D. C. M., Herath, H., Nugaliyadde, M. M., Dissanayake, M., & Costa, D. M. (2018). Antagonistic effect of eight Sri Lankan isolates of *Pseudomonas fluorescens* on *Meloidogyne incognita* in tomato, *Lycopersicon esculentum*. *IJAEB*, **3**(6), 266217. <http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/3.6.4>.
- Oka, Y. (2020). From old-generation to next-generation nematicides. *Agronomy*, **10**(9), 1387. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091387>.
- Pal, K. K., & Mc Spadden G. B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>.
- Sasanelli, N., Konrat, A., Migunova, V., Toderas, I., Iurcu-Straistaru, E., Rusu, S., Bivol, A., Andoni, C., & Veronico, P. (2021). Review on Control Methods against Plant Parasitic Nematodes Applied in Southern Member States (C Zone) of the European Union. *Agriculture* **11**(7), 602. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070602>.
- Siddiqui, I. A., & Shaikat S. S. (2003). Plant species, host age and host genotype effects on *Meloidogyne incognita* biocontrol by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its genetically-modified derivatives. *J. Phytopathol.* **151**(4), 231–238. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00716.x>.
- Sikora, R. A., & Roberts, P. A. Management practices: an overview of integrated nematode management technologie. (2018). In *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*, 3rd ed., Sikora, R.A, Coyne, D., Hallmann, J., Timper, P., Eds., CABI: Oxfordshire, UK, pp. 795–839. <https://doi.org/10.1079/9781786391247.0795>.
- Soliman, G. M., Ameen, H. H., Abdel-Aziz, S. M., & El-Sayed, G. M. (2019). *In vitro* evaluation of some isolated bacteria against the plant parasite nematode *Meloidogyne incognita*. *Bull. Natl. Res. Cent.* **43**, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0200-0>.
- Stucky, T., Hochstrasser, M., Meyer, S., Segessemann, T., Ruthes, A. C., Ahrens, C., Pelludat, C., Dahlin, P. (2023). A novel robust screening assay identifies pseudomonas strains as reliable antagonists of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Microorganisms*, **11**(8), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082011>.
- Subedi, S., Thapa, B., & Shrestha, J. (2020). Root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) and its management: a review. *J. Agric. Nat. Resour.* **3**(2), 21–31. <https://doi.org/10.3126/janr.v3i2.32298>.
- Trudgill, D. L., & Blok, V. C. (2001). Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**, 53–77. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.39.1.53>.
- Wesemael, W., Viaene, N., & Moens, M. (2011). Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology* **13**(1), 3–16. <https://doi.org/10.1163/138855410X526831>.
- Zeck, W. M. (1971). Rating scheme for field evaluation of root-knot nematode infestations. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer.* **24**(1), 141–144.
- Zhao, J., Wang, S., Zhu, X., Wang, Y., Liu, X., Duan, Y., Fan, H., & Chen, L. (2021). Isolation and characterization of nodules endophytic bacteria *Pseudomonas protegens* Sneb1997 and *Serratia plymuthica* Sneb2001 for the biological control of root-knot nematode. *Appl. Soil Ecol.* **164**, 103924. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103924>.