

Entwicklung eines biologischen Pflanzenschutzmittels aus Süßholz mit sicherer Wirkung im Freiland unter Nutzung effizienter Anwendungstechnik. Arbeitsschwerpunkt 1: Industrielle Forschung und Grundlagen

Development of a biological plant protection product from Liquorice with proven efficacy in the field using suitable application technology. Work focus 1: Industrial and basic research

FKZ: 09OE101

Projektnehmer:

Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Biologischen Pflanzenschutz
Heinrichstraße 243, 64287 Darmstadt
Tel.: +49 6151 407-0
Fax: +49 6151 407-290
E-Mail: bi@jki.bund.de
Internet: www.jki.bund.de

Autoren:

Schmitt, Annegret; Orlik, Marc

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

Entwicklung eines biologischen Pflanzenschutzmittels aus Süßholz mit sicherer Wirkung im Freiland unter Nutzung effizienter Anwendungstechnik

Verbundprojekt



1. Industrielle Forschung und Grundlagen

FKZ 09OE036 Trifolio-M GmbH

(Teilprojekt 1: Formulierung, Standardisierung und Extraktionsoptimierung)

FKZ 09OE101 Julius Kühn-Institut, Institut für Biologischen Pflanzenschutz

(Teilprojekt 2: Wirkungsmechanismen und Vorprüfungen für Freilandanwendungen)

2. Anwendung im Freiland

FKZ 09OE038 Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum (DLR) Rheinpfalz

(Teilprojekt 1: Tomate, Kartoffel/Applikationstechnik)

FKZ 09OE102 Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und

Forst (Teilprojekt 2: Gurke/Klimafaktoren)

Gesamtlaufzeit: 04.11.2010 bis 31.03.2014

**Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere
Formen nachhaltiger Landwirtschaft
(BÖLN) Verbundvorhaben**

„Entwicklung eines biologischen Pflanzenschutzmittels aus Süßholz
mit sicherer Wirkung im Freiland unter Nutzung effizienter
Anwendungstechnik“

Arbeitsschwerpunkt 1: „Industrielle Forschung und Grundlagen“

Teilprojekt 2: (09OE101) „Wirkungsmechanismen und
Vorprüfungen für Freilandanwendungen“

Abschlussbericht Teilprojekt 2 (09OE101)

Laufzeit: 04.11.2010 bis 31.12.2013

**Julius Kühn-Institut (JKI),
Institut für Biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt**

Koordinatorin des Verbundvorhabens: Dr. Gabriele Leinhos, DLR Rheinpfalz, Abt.
Gartenbau, Schifferstadt
FKZ: 09OE038

Leitung und Koordination Arbeitsschwerpunkt 1: Dr. Annegret Schmitt
Wissenschaftliche Bearbeitung Teilprojekt 2: Marc Orlik, JKI, Institut für Biologischen
Pflanzenschutz, Darmstadt
FKZ: 09OE101

Projektleitung Teilprojekt 1 des Arbeitsschwerpunktes 1 : Dr. Hubertus Kleeberg,
Trifolio-M GmbH, Lahnau
FKZ: 2809OE036

Projektpartner Arbeitsschwerpunkt 2: Dr. Ute Gärber, Dr. Peggy Marx, JKI, Institut für
Pflanzenschutz im Gartenbau und Forst, Kleinmachnow
FKZ: 09OE102

Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN)

Entwicklung eines biologischen Pflanzenschutzmittels aus Süßholz mit sicherer
Wirkung im Freiland unter Nutzung effizienter Anwendungstechnik-

„*Wirkungsmechanismen und Vorprüfungen für Freilandanwendungen*“

Abschlussbericht (09OE101): Arbeitsschwerpunkt 1, Teilprojekt 2

**Julius Kühn-Institut (JKI), Institut für Biologischen Pflanzenschutz,
Darmstadt**

Autoren: Dr. Annegret Schmitt, Marc Orlik

Kontakt: Annegret.Schmitt@jki.bund.de Tel.: 06151/ 407-241

Kurzfassung

Im Projekt "Entwicklung eines biologischen Pflanzenschutzmittels aus Süßholz mit sicherer Wirkung im Freiland unter Nutzung effizienter Anwendungstechnik, Arbeitsschwerpunkt 1: Industrielle Forschung und Grundlagen; Teilprojekt 2: Wirkungsmechanismen und Vorprüfungen für Freilandanwendungen“ wurden die UV-Beständigkeit formulierter Süßholzextrakte für die weitere Testung im Freiland geprüft (Arbeitsschwerpunkt 2), sowie Untersuchungen zu wirksamen Fraktionen und zum Wirkmechanismus durchgeführt. Formulierungen mit verbesserter Wirkung wurden identifiziert. Bislang konnte jedoch noch keine ausreichend UV-beständige, direkt für die Praxis nutzbare Formulierung gefunden werden. Ergebnisse, die für die weitere Entwicklung des Extraktes bedeutend sind, waren wie folgt:

Formulierungen aus *Glycyrrhiza glabra*-Extrakt (Suspendierbares Konzentrat, 2 % w/v) sollten in Tomaten/*Phytophthora infestans* mit ca. 800 L/ha ausgebracht werden, um hohe Anfangswirkungen zu erreichen.

In Untersuchungen zu wirksamen Fraktionen erreichte Fraktion 4 (Sterole/ Terpenoide) in Gurke/*Pseudoperonospora cubensis* bei 2,55 % w/v 50 % Wirkungsgrad. Fraktion 6 (Flavonoide) und der Rohextrakt hatten in Tomate eine EC₅₀ von 0,19 % w/v.

Für Fraktion 4 wurde *in vitro* keine sporozide Wirkung gegen *P. infestans* gezeigt. Fraktion 6 und der Rohextrakt unterdrückten bei 0,1 % w/v (Fraktion 6) bzw. 0,04 % w/v (P1) die Zoosporentlassung von *P. infestans* und hatten auch sporozide Wirkung.

Welcher Anteil der indirekten Wirkung von Süßholz gegen Oomyceten an der Gesamtwirkung zukommt, ist noch abschließend zu klären. Allerdings scheint die Hauptwirkung *ad planta* eine direkte zu sein.

Rohextrakt, Fraktion 6 und Fraktion 4 hatten eine positive Wirkung auf die physiologische Leistungsfähigkeit der Pflanzen (Chlophyllfluoreszenz-Messungen). Dies zeigte sich in einer Erhöhung der Stresstoleranz gegen biotischen (*P. cubensis*) bzw. abiotischen Stress (Seneszenz). Letzterer wurde nur für Fraktion 6 und den Rohextrakt geprüft.

Insgesamt lag ein pflanzenstärkender Einfluss nach Süßholzbehandlung in Gurke neben der fungistatisch/fungiziden Wirkung des Extraktes vor. Dies erweitert das Anwendungspotential von *G. glabra*-Extrakt, nicht nur im Pflanzenschutz gegen Oomyceten, sondern auch für die Pflanzenstärkung.

**Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger
Landwirtschaft (BÖLN)**

Development of a biological plant protection agent from liquorice with proven efficacy in the field using suitable application technology, Work focus 1:
Industrial and basic research, Project part 2:

“Mode of action and pre-selection for field application”

Final Report (09OE101): work focus 1, project part 2

**Julius Kühn-Institut (JKI), Institute for Biological Control,
Darmstadt**

Authors: Dr. Annegret Schmitt, Marc Orlik

Contact: Annegret.Schmitt@jki.bund.de Phone.: 06151/ 407-241

Abstract

In the frame of the project “Development of a biological plant protection agent from liquorice with proven efficacy in the field using suitable application technology, work focus 1: Industrial and basic research, project part 2: Mode of action and pre-selection for field application”, formulations with improved UV-stability for testing in the field (in work focus 2), active fractions and mode of action were investigated. Formulations with improved efficacy were identified. Until now, a sufficient UV-stable formulation for use in practice was not found. Important results for further development of liquorice extracts are as follows.

In order to get high initial activity in tomato/*Phytophthora infestans*, formulations from *Glycyrrhiza glabra* extract (suspendable concentrate, 2 % w/v) should be applied with 800 L/ha.

Investigations on active fractions in cucumber/*Pseudoperonospora cubensis* showed 50 % efficacy for fraction 4 (sterols/terpenoids) at 2.55 % w/v. Fraction 6 (flavonoids) and raw extract revealed an EC₅₀ value at 0.19 % w/v.

In vitro, no direct activity against *P. infestans* was found for fraction 4. Fraction 6 and raw extract suppressed zoospore release of *P. infestans* at concentrations as low as 0.1 % w/v (fraction 6) and 0.04 % w/v (P1), respectively, and showed sporocidal effects. To what extent indirect mechanisms play a role in the overall activity of liquorice extract against oomycetes

remains to be clarified. But the main mode of action *ad planta* appears to be based on direct effects on the pathogen.

Raw extract, fraction 6 and fraction 4 showed positive effects on physiological performance of plants (chlorophyll fluorescence). They increased tolerance against biotic (*P. cubensis*) and abiotic (senescence) stress. The latter was investigated for fraction 6 and raw extract, only.

Overall, after application of liquorice extract in cucumber a plant strengthening effect was found along with fungistatic/fungitoxic effects. This enlarges the potential use of *G. glabra* extract, not only in plant protection against oomycetes, but also for plant strengthening applications.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Abbildungsverzeichnis:.....	XII
Tabellenverzeichnis:.....	XV
1 Einführung.....	1
1.1 Gegenstand des Vorhabens.....	1
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts im Arbeitsschwerpunkt 1, Teilprojekt 2 „Wirkungsmechanismen und Vorprüfungen für Freilandanwendungen“	2
1.2.1 Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen des BÖLN.....	2
1.2.2 Bezug des Vorhabens zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen.	2
1.2.3 Wissenschaftliche und/oder technische Arbeitsziele des Vorhabens.....	2
1.3 Planung und Ablauf des Projektes.....	4
2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	9
3 Material und Methoden	10
3.1 Erregerhaltung	10
3.1.1 Kultivierung von <i>Phytophthora infestans</i>	10
3.1.2 Kultivierung von <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	10
3.2 Infektion mit <i>P. infestans ad planta</i> und Zoosporenschlupf <i>in vitro</i>	11
3.2.1 Inokulum <i>P. infestans</i>	11
3.2.2 Infektion <i>P. infestans ad planta</i> (Tomate, UV-Test).....	11
3.2.3 Infektion <i>P. infestans in vivo</i> ((Fb, Tomate)	11
3.2.4 Schlupf und Viabilität von <i>P. infestans</i> Sporangien <i>in vitro</i>	11
3.2.5 Inkubation <i>P. infestans ad planta</i> (Tomate).....	12
3.2.6 Inkubation <i>P. infestans in vivo</i> (Fb-Bioassay)	12
3.3 Infektion mit <i>P. cubensis</i> und Erregerschlupf	12
3.3.1 Inokulum <i>P. cubensis</i>	12
3.3.2 Infektion <i>P. cubensis ad planta</i> (Gurke)	13
3.3.3 Infektion mit <i>P. cubensis in vivo</i> (Bs Gurke)	13
3.3.4 Inkubation <i>P. cubensis ad planta</i> (Gurke)	13
3.3.5 Inkubation <i>P. cubensis in vivo</i> (Bs).....	13

3.3.6	Schlupf und Viabilität von <i>P. cubensis</i> Sporangien <i>in vitro</i>	13
3.4	Pflanzenanzucht.....	13
3.4.1	Pflanzenanzucht Tomate	13
3.4.2	Pflanzenanzucht Gurke	14
3.5	Pflanzenversuche	14
3.5.1	Versuche mit Ganzpflanzen (Tomate)	14
3.5.2	Versuche mit Fiederblättchen (Tomate).....	15
3.5.3	Versuche mit Blattscheiben (Tomate).....	16
3.5.4	Versuche mit Ganzpflanzen (Gurke), Testsysteme <i>ad planta</i>	16
3.5.5	Versuche mit Blattscheiben (Gurke), Testsysteme <i>in vivo</i> (Bs).....	17
3.6	Statistik: zu den Versuchen <i>ad planta</i> und <i>in vivo</i> in Gurke und Tomate	20
3.7	Fraktionierungsschema für pflanzliche Extrakte (Süßholz, gemahlen).....	20
4	Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse	21
4.1	Wirksamkeitsvergleich ausgewählter Süßholzformulierungen im Klimaraum in Gurke/ <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	22
4.2	Wirksamkeitsprüfungen ausgewählter Süßholzformulierungen im Semifreiland in Gurke/ <i>Pseudoperonospora cubensis</i> und Tomate/ <i>Phytophthora infestans</i>	23
4.2.1	Vergleich der Wirkungen der getesteten Formulierungen in Gurke und Tomate im Semifreiland 2011	26
4.3	Wirksamkeitsprüfungen ausgewählter Formulierungen im Klimaraum mit künstlicher UV-Strahlung in Tomate/Braunfäule:	27
4.3.1	Versuche <i>ad planta</i> in Tomate im Klimaraum mit künstlicher UV-Strahlung:	27
4.4	Wirksamkeitsprüfung einer ausgewählten Formulierung (Anwendung Applikationsanlage) im Semifreiland 2013	32
4.5	Wirksamkeit von P1 und Fraktionen <i>ad planta</i> : EC ₅₀	42
4.5.1	Versuche in Gurke/ <i>P. cubensis</i> : EC ₅₀ von Fraktion 4	43
4.5.2	Versuche in Tomate/ <i>P. infestans</i> : EC ₅₀ von P1 und Fraktion 6	44
4.6	Versuche zur indirekten Wirkungsweise nach Extraktbehandlung, Einfluss auf die Photosynthese (F _v /F _m) in Gurke	46
4.6.1	Untersuchungen zu biotischen Faktoren: Pathogeninfektion mit <i>P. cubensis ad planta</i>	46

4.6.2	Untersuchungen zu abiotischen Faktoren: Temperatur und Seneszenz <i>in vivo</i> ..	48
4.7	Untersuchung indirekter Wirkmechanismen:	49
4.7.1	Qualitative Untersuchung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Applikation von P1/Fraktionen:	49
4.7.2	Versuche zu ROS mit Radikalfängern nach P1-Behandlung:	50
5	Diskussion der Ergebnisse	51
5.1	Wirksamkeitsprüfungen ausgewählter Süßholzformulierungen im Klimaraum in Gurke/ <i>P. cubensis</i>	51
5.2	Wirksamkeitsteste ausgewählter Süßholzformulierungen im Semifreiland in Gurke/ <i>P. cubensis</i> und Tomate/ <i>P. infestans</i>	51
5.3	Wirksamkeitsprüfungen ausgewählter Formulierungen im Klimaraum mit künstlicher UV-Strahlung in Tomate/ <i>P. infestans</i> :	52
5.4	Direkte fungizide Wirkung von P1-Extrakt und Fraktionen <i>in vitro</i> :	53
5.5	Wirksamkeit von P1 und Fraktionen <i>ad planta</i> : EC ₅₀	54
5.6	Versuche zu indirekten Wirkmechanismen <i>in vivo</i> : ROS	55
5.7	Versuche zur indirekten Wirkungsweise nach Extraktbehandlung, Einfluss auf die Photosynthese	56
6	Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse..	56
6.1	Voraussichtlicher Nutzen der Ergebnisse	56
6.2	Wurden im Projekt praxisrelevante Ergebnisse erzielt?	57
7	Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen (unter Berücksichtigung des geänderten Arbeitsplans)	57
8	Zusammenfassung	58
9	Literaturverzeichnis	60
10	Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt (Printmedien, Newsletter usw.), bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse	62

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
bar	Maßeinheit für Druck (Bar)
BBCH	Biologische Bundesanstalt Schweiz
BION®	<i>Resistenzinduktor</i>
BLE	Bundesamt für Landwirtschaft und Ernährung
Bls.	Blattscheiben
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BÖLN	Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft
Bs	Blattscheiben
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
CH ₂ CL ₂	Dichlormethan (DCM)
cm	Zentimeter
cv.	Kultivar
d	Tage
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DC	Dünnschichtchromatografie
DCM	Dichlormethan (CH ₂ CL ₂)
DCINA	Dichlorisonicotinsäure
DLR	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum
dpa	day(s) past application (Tag(e) nach Behandlung)
dpi	day(s) post inoculation (Tag(e) nach Inokulation)
EC	in Wasser 'Emulgierbares Konzentrat'
EC ₅₀	Effektive Konzentration zur Erreichung von 50 % Wirkungsgrad
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und weitere)

EtOH	Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH)
EU	Europäische Union
FuE	Forschung und Entwicklung
Fa.	Firma
Fb	Fiederblättchen
F _v /F _m	Quotient aus variabler (F _v) und maximaler (F _m) Fluoreszenz
G	Indexbezeichnung der Versuche mit Gurken
V	Versuch
V8	Gemüsesaftagar
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
i.d.R.	in der Regel
JKI	Julius Kühn-Institut
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
Konz.	Konzentration
L	Liter
ha	Hektar
m ²	Quadratmeter
MES	MES PUFFERAN®, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mind.	mindestens
ml	Milliliter
MLP	Maximum Likelihood Programme (Berechnung der EC)
mm	Millimeter
mM	millimolar (Konzentrationsangabe)
ms	Millisekunde
n	Anzahl

N	Anzahl biologische WDH (Pflanzen)
n _{BS}	Anzahl Blattscheiben
Nr.	Nummer
o. g.	oben genannt
P	Irrtumswahrscheinlichkeit in der Statistik
P1	Süßholz Rohextrakt (HERBA), Auszug in EtOH
PAM	Puls-Amplituden-Modulationsfluorometer (Junior PAM, <i>WALZ Germany</i>)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
ppm	parts per million → Teile pro Million (Quotient), Definition: 1 ppm = 10 ⁻⁶ = 0,000001
ZWIPERO	Vorhersagemodell: Wettergestütztes Prognosemodell für Falschen Mehltau an Zwiebeln
PSM	Pflanzenschutzmittel
PST	Pflanzenstärkungsmittel
rel.	relativ
R _f -Wert(e)	Retentionsfaktor(en) in der DC
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (z.B. H ₂ O ₂)
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
s.	siehe
s. a.	siehe auch
SC	Suspensions Konzentrat (Formulierung)
<i>spp.</i>	<i>supspecies, Subspezies (Unterart, Taxon der Systematik)</i>
ßABA	ß-Aminobuttersäure, <i>3-Aminobutansäure</i>
STABW	Standardabweichung
t	Zeit
T	Indexbezeichnung für Versuche mit Tomaten
UV	ultraviolett
v. a.	vor allem
Vergr.	Vergrößerung

w/v	weight/volume
WDH	Wiederholung(en)
WG	Wirkungsgrad(e) nach ABBOTT (1925)
WP	in 'Wasser dispergierbares Pulver'(Formulierung)
z. B.	zum Beispiel
α	Signifikanzniveau
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μmol	Mikromol (Stoffmengenangabe)

Abbildungsverzeichnis:

- Abbildung 1: Blattscheiben Test für Chlorophyllfluoreszenzmessungen behandelter Gurken mit PAM (Puls-Amplituden-Modulationsfluorometer) der Fa. WALZ (Germany), BIS = Blattscheiben (Bs), F_v/F_m = Chlorophyllfluoreszenz. 19*
- Abbildung 2: Fraktionierungsschema für pflanzliche Extrakte (Süßholz, Glycyrrhizza glabra, HERBA); F=Fraktion; Hier: Methode A: CH₂CL₂ (DCM) für wasserunlösliche Substanzen und Substanzen mit sauren Gruppen im 1. Schritt, sowie in den Schritten zu F1, F1a und F6 als Lösungsmittel; Methode B: tert-Butylmethylether anstatt DCM in den genannten Fraktionierungsschritten. 20*
- Abbildung 3: Versuch G1: Wirksamkeitstest von fünf 2 %-igen Süßholzformulierungen (w/v) im System Gurke/Falscher Mehltau in Ganzpflanzen in der Klimakammer. K EtOH: Kontrolle Ethanol, K Wasser: Kontrolle Wasser, P1: Süßholz-Rohextrakt, Bayp, UFO, T2OG, LSS: Süßholzformulierungen; Balken: Standardabweichung. 22*
- Abbildung 4: Versuch G2: Wirksamkeitstest von fünf 1,5 %-igen Süßholzformulierungen (w/v) im System Gurke/Falscher Mehltau in Ganzpflanzen in der Klimakammer. K EtOH: Kontrolle, Wasser: Kontrolle Wasser, P1: Süßholz-Rohextrakt, Bayp, UFO, T2OG, LSS: Süßholzformulierungen; Balken: Standardabweichung. 23*
- Abbildung 5: Versuchsaufbau zur Prüfung der UV-Stabilität von Süßholzformulierungen in Tomate. Bild rechts oben: Formulierungen von Süßholz im UV-Test an getopften Tomaten der Sorte 'Minibell', Bild links oben und unten: Bestrahlung der Pflanzen mit Sylvania UV-Vollspektrum-Röhren (30 % höherer UV-Anteil), bis zu 7 Tage nach Behandlung und über 16 h pro Tag; Bild rechts unten: SCHACHTNER Applikationsanlage mit Düse über Kopf der Pflanzen. 28*
- Abbildung 6: WG von PISC-149 (2 % w/v) bei verschiedenen Aufwandmengen (800 L/ha, 1200 L/ha, Applikationsanlage) gegen *P. infestans* im Vergleich zum Rohextrakt und Cuprozin-Progress, mit UV-Behandlung: 0 Tage, 3 Tage und 7 Tage UV-Strahlung, Klimaraum. 30*
- Abbildung 7: WG von PISC-159 bis 161 (2 % w/v) bei 800 L/ha Aufwandmenge (Schachtner Applikationsanlage) gegen *P. infestans* im Vergleich zum Rohextrakt und Cuprozin-Progress; 0 Tage, 4 Tage und 7 Tage UV-Strahlung, Klimaraum. 31*
- Abbildung 8: Befall von Tomate mit *P. infestans* nach Behandlung von PISC-159 bis 161 (2 % w/v) bei 800 L/ha Aufwandmenge (Applikationsanlage) im Vergleich zu Cuprozin-Progress; 0 Tage, 4 Tage und 7 Tage UV-Strahlung, Kontrolle gemittelt, Klimaraum. 31*
- Abbildung 9: Befall von Tomate mit *P. infestans* nach Behandlung von PISC-149 (2 % w/v) und P1 (2 % w/v) (Applikationsanlage) im Vergleich zu Cuprozin-Progress (0,2 % w/v): 0 Tage, 3 Tage und 7 Tage im Semifreiland, Kontrolle gemittelt, Applikationsart, Regen bzw. Sonnenereignisse s. Tabelle 5. 32*

- Abbildung 10: WG [%] im Semifreiland nach Behandlung von Tomaten mit PISC-159 (2 % w/v) und Infektion mit P. infestans im Vergleich zu Cuprozin-Progress (0,2 % w/v) und Rohextrakt P1 (2 % w/v), (Applikationsanlage)..... 33*
- Abbildung 11: Schlupftest mit Sporangien, behandelt in Lösungen von P1 von 0,008 % bis 1,0 % w/v, 24 h 10 °C, Auswertung bei RT, > 100 Sporangien je Variante und Konz. in Doppelbestimmung, 240913 A und C sowie 270913 B sind Chargennummern. 35*
- Abbildung 12: Schlupftest mit Sporangien, inkubiert in Lösungen von P1, Fraktion 6 und Fraktion 4: 0,001 % bis 1,0 % w/v, Inkubation 24 h bei ca. 10 °C, Auswertung bei RT, > 100 Sporangien je Konzentration und Variante, Doppelbestimmung. 171013 und 211013 sind Chargennummern..... 36*
- Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme von Sporangien von P. infestans nach 2,5 h Behandlung mit Wasser (8 °C), Blau-Exzitation und Färbung mit Acridin-Orange 1:1000, Vergr. 40 x 10, Maßstab 20 µm, weißer Rahmen: fortgeschrittene Zoosporenreifung (runde Zonen, hellgrüne Kerne). 38*
- Abbildung 14: Sporangien von P. infestans nach 3 h Behandlung mit Fraktion 6 aus Rohextrakt 1 % w/v, ca. 8 °C, Blau-Exzitation und Färbung mit Acridin-Orange 1:1000, Vergr. 40 x 10, Maßstab 20 µm, keine beginnende Zoosporenreifung, Anlagerung von Fraktion 6-Tröpfchen an Sporangien..... 38*
- Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme von Sporangien von P. infestans nach 3,0 h Behandlung mit Fraktion 4 (1 % w/v) aus Extrakt aus G. glabra, 8 °C, Blau-Exzitation und Färbung mit Acridin-Orange 1:1000, Vergr. 40 x 10, Maßstab 20 µm, weißer Rahmen: beginnende Zoosporenreifung (runde, dunklere Zonen)..... 39*
- Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme von Sporangien (P. infestans) nach 5,5 h Behandlung mit Rohextrakt P1 (1 % w/v) G. glabra HERBA, ca. 8 °C, (5 s Belichtung wg. Fluoreszenz löschendem Effekt von P1-Inhaltsstoffen), Färbung mit Acridin-Orange 1:100, Blau-Exzitation, Vergr. 20 x 10, Maßstab 50 µm..... 39*
- Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopie einer Sporangie von P. infestans nach Behandlung mit Wasser (24 h), schlüpfende Zoospore, weißer Pfeil: Kern Zoospore, 8 °C, Färbung mit Acridin-Orange 1:1000, Blau-Exzitation, Vergr. 40 x 10, Maßstab 20 µm..... 40*
- Abbildung 18: Sporangien von P. infestans in Fraktionen 4 bis 6 aus G. glabra a) bis c) runde, hell-grün leuchtende Bereiche = sichtbare Zoosporenkerne (weiße Rahmen), d) Fraktion 6, keine reifenden Zoosporen erkennbar, inneres diffus granular, schwächer fluoreszierend; 3 h Behandlung in Mitteln bei 8 °C..... 41*
- Abbildung 19: Darstellung der Probit-transformierten Daten zur EC₅₀-Berechnung der Wirkung von Fraktion 4 (Terpenoide, Sterole) aus Süßholzextrakt in Gurke/P. cubensis (Datensätze aus zwei Versuchen)..... 43*

<i>Abbildung 20: Darstellung der Probit-transformierten Daten zur EC_{50} Berechnung der Wirkung von Fraktion 6 aus Süßholzextrakt in Tomate/<i>P. infestans</i>.</i>	44
<i>Abbildung 21: Darstellung der Probit-transformierten Daten zur EC_{50}-Berechnung der Wirkung von P1 in Tomate/<i>P. infestans</i> (Datensätze aus drei unabhängigen Folgeversuchen).</i>	45
<i>Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der F_v/F_m-Messungen protektiv behandelter Gurkenpflanzen (P1 und seine Fraktionen (F)), $N = 3 \times 2$ WDH (24 Messpunkte je Variante), Infektion 1 dpa (<i>P. cubensis</i>); Messungen mit PAM-Fluorometer, Fa. Waltz, Germany.</i>	47
<i>Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der F_v/F_m-Messungen mit der Junior-PAM (Fa. Walz, Germany) an Tag 11 bei 21 °C, Befall in % in Ganzpflanzen: Rahmen; im Vergleich dazu Chlorophyllfluoreszenz an Tag 11 nach Infektion: grüne Säulen. Messung F_v/F_m mit PAM-Fluorometer, Fa. Waltz Germany.</i>	47
<i>Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der F_v/F_m-Messungen an Bs protektiv behandelte Gurkenpflanzen, P1 und Fraktion 6 (F6), über 16 Tage bei 22 °C, $N = 5$ WDH mit 4 Bs je Pflanze (20 Messpunkte je Variante), PAM-Fluorometer, P1 und Fraktion 6 (b) an Tag 16 21 signifikant verschieden zur Kontrolle (a), Tukey Test $P < 0,05$ zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$.</i>	48
<i>Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der F_v/F_m-Messungen an Bs protektiv behandelte Gurkenpflanzen, P1 und Fraktion 6 (F6), über 21 Tage bei 35 °C, $N = 5$ WDH mit 4 Bs je Pflanze (20 Messpunkte je Variante), PAM-Fluorometer, Fa. Waltz, Germany, P1 und Fraktion 6 (b) an Tag 21 signifikant verschieden zur Kontrolle (a), Tukey Test $P < 0,05$ zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$.</i>	48
<i>Abbildung 26: DAB-Färbung mit Blattscheiben (Gurke), nach 6 bis 8 Stunden Behandlung mit P1-Extrakt und Fraktionen (3 % w/v, in Suspension) bildete sich eine braune Färbung, Hinweis auf H_2O_2.</i>	50

Tabellenverzeichnis:

<i>Tabelle 1: Übersicht Zeitplan (mit geändertem Arbeitsplan</i>	<i>8</i>
<i>Tabelle 2: Test von Süßholzformulierungen in Gurke (2011), Wirkungsabbau durch Sonnen- und Regeneinfluss.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 3: Test der Formulierungen in Tomate 2011, Wirkungsabbau durch Sonnen- und Regeneinfluss.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 4: Zusammenstellung der Ergebnisse der im 2. Projektjahr 05-2012 bis 04-2013 getesteten Formulierungen im Testsystem mit künstlicher UV-Strahlung in Tomate.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 5: Versuch in Tomate/Semifreiland, Wetterereignisse und Behandlungsvarianten....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 6: Infektionsfähigkeit von Süßholz-Extrakt behandelten Mehltau-Sporangien in Gurke</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 7: Gehalte an Flavonoide in P1-Extrakten nach Soxhlet-Extraktion, 20 g / 8 h in EtOH.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 8: Wirksame Inhaltsstoffe von P1 und der Fraktionen 4, 5, 6 (G. glabra, HERBA)...</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 9: Versuchsdaten zur Berechnung der EC₅₀ von F4 aus Süßholzextrakt in Gurke/ P. cubensis.....</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 10: Versuchsdaten zur Berechnung der EC₅₀ von F6 in Tomate*/P. infestans</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 11: Versuchsdaten zur Berechnung der EC₅₀ von Fraktion 6 in Tomate*/P. infestans</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 12: Geplante und tatsächlich erreichte Projektziele (basierend auf dem geänderten Arbeitsplan).....</i>	<i>58</i>

1 Einführung

In den letzten Jahren hat zum einen die Nachfrage der verarbeitenden Industrie nach Produkten aus ökologischer Bewirtschaftung stark zugenommen, zum anderen ist auch durch die Verbrauchernachfrage (über Lebensmittelketten und Discounter) der Druck auf Landwirte, ökologisch zu produzieren, stark gewachsen. Der Anbau von Gurke und Tomate ist jedoch im Ökoanbau mit einem hohen Risiko verbunden. *Oomyceten*, wie Falscher Mehltau und *Phytophthora spp.* gehören in diesen beiden und vielen anderen Freilandgemüseulturen zu den ökonomisch wichtigsten Schaderregern. Im ökologischen Gemüseanbau stehen zu ihrer direkten Kontrolle nur kupferhaltige Präparate zur Verfügung, und zwar nur in den Indikationen ‚Gurke‘ und ‚Tomate‘ im Freiland (BVL, 2009).

Die Zulassung kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel ist jedoch EU-weit nur bis zum Jahr 2016 vorgesehen. Zur Sicherung des Gemüse-Ökoanbaus ist es daher dringend notwendig, wirksame und in der Wirkung verlässliche alternative Präparate zu erarbeiten.

Im Rahmen verschiedener durch das "Bundesprogramm Ökolandbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft" (BÖLN) geförderter Projekte wurde in den Jahren 2007-2010 ein Extrakt aus Süßholz (*Glycyrrhiza glabra*) auf seine Wirkung gegen Falschen Mehltau geprüft.

Unter kontrollierten Bedingungen und im Gewächshaus zeigte Süßholzextrakt Wirkungsgrade bis über 90 %. Bei Anwendung im Freiland waren die Wirkungsgrade jedoch stark schwankend und meist deutlich niedriger. Als Ursache konnten verschiedenen Faktoren identifiziert bzw. postuliert werden, wie z. B. mangelnde UV- und Regenstabilität, ungenügende Haftung und ungleichmäßige Benetzung oder sub-optimale Terminierung der Applikation. Erste Vorversuche zu einer Extraktformulierung durch Trifolio-M GmbH zeigten in Versuchen des DLR Rheinpfalz in Zwiebel eine deutliche Wirkungsverbesserung im Gegensatz zum nicht-formulierten Rohextrakt aus Süßholz.

1.1 Gegenstand des Vorhabens

Vor dem unter Punkt 1 beschriebenen Hintergrund war eine Optimierung der Formulierung des Süßholzextraktes angezeigt, um eine verbesserte UV- und Regenbeständigkeit zu erreichen.

Gleichzeitig waren weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus notwendig, die als Grundlage zur Bestimmung der optimalen Anwendungsmodalitäten dienen sollten. Diese Arbeiten wurden im Teilprojekt 1 (Industrielle Forschung / Grundlagen) von der Trifolio-M GmbH und JKI, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, bearbeitet. Die Arbeiten leiten zu den Untersuchungen im Arbeitsschwerpunkt 2 über, bei denen die im Arbeitsschwerpunkt 1 gewonnenen Ergebnisse in die Freilandanwendung einfließen.

1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts im Arbeitsschwerpunkt 1, Teilprojekt 2 „Wirkungsmechanismen und Vorprüfungen für Freilandanwendungen“

1.2.1 Bezug des Vorhabens zu den förderpolitischen Zielen des BÖLN

In verschiedenen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Extrakte aus Süßholz in verschiedenen Gemüsekulturen wie Gurke, Tomate, Salat und Zwiebel den Befall mit Falschem Mehltau bzw. *Phytophthora infestans* im Gewächshaus deutlich reduzieren können (Schmitt *et al.* 2010). Ähnlich wie bei anderen Pflanzenextrakten ist jedoch auch die Wirkung der derzeitigen Süßholz-Extrakte unter Freilandbedingungen, aufgrund von Niederschlag und Sonneneinstrahlung, meist nur sehr gering und stark schwankend. Deshalb sollten in diesem Verbundprojekt ein praxistaugliches formuliertes Süßholzpräparat entwickelt und Anwendungsstrategien im Freiland in Gurke, Tomate bzw. Kartoffel geprüft werden.

Ziel war es, ein praxisrelevantes Verfahren zu entwickeln, das eine wirksame Regulierung von 'Falschem Mehltau' und *P. infestans* ermöglicht und dadurch die Anwendung von kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln in Gurke, Tomate und Kartoffel reduzieren oder sogar ersetzen kann. Das Forschungsvorhaben nimmt damit Bezug zu der von der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung ergangenen Bekanntmachung „Erforschung und Entwicklung von Verfahren zur Reduktion oder zum Ersatz kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel (Bekanntmachung Nr. 02/09/51 vom 20.5.2009)“.

1.2.2 Bezug des Vorhabens zu konkreten Bekanntmachungen und Ausschreibungen

Insbesondere bezogen sich die geplanten Arbeiten auf die von der BLE vorgegebenen thematischen Förderschwerpunkte:

- Vorbeugende Maßnahmen, auch Einsatz von Pflanzenstärkungsmitteln und deren Entwicklung
- Optimierte Pflanzenschutzverfahren
- Eine optimale Pflanzenschutzgerätetechnik unter Berücksichtigung der auf den Praxisbetrieben vorhandenen gerätetechnischen Ausstattung und bisher vorliegender Erfahrungen

1.2.3 Wissenschaftliche und/oder technische Arbeitsziele des Vorhabens

Das vom JKI, Institut für Biologischen Pflanzenschutz, bearbeitete Teilprojekt 2 im Arbeitsschwerpunkt 1 des Verbundprojektes verfolgte zum einen das Ziel, Grundlagen zur Wirkungsweise des Extraktes aus Süßholz zu erarbeiten und daraus Information für eine optimale Anwendung abzuleiten. Zum anderen stellten die Arbeiten ein Verbindungsglied zwischen der technischen Optimierung des Extraktes durch Trifolio-M GmbH und der

Übertragung auf die Anwendung im Freiland durch JKI, Institut für Pflanzenschutz in Gartenbau und Forst, und DLR Rheinpfalz, dar.

Ziel war es dabei, die Extrakte unter kontrollierten Bedingungen vorab zu prüfen, um so die effektivsten Varianten

- für eine weitere Optimierung auf der Produktionsseite
- für die Freilandanwendung

zu selektionieren.

Dabei beinhalteten die Arbeitsziele folgende Fragestellungen:

- Welche Mechanismen (direkte oder indirekte Wirkung) sind für die Wirkung des Süßholzextraktes gegen Oomyceten verantwortlich? („Mode of action“)

In dem vorangegangenen Projekt 06OE188 „Strategiekombinationen zur Regulierung des Falschen Mehltaus an Gurke unter Glas/Folie und im Freiland“ wurden sowohl Hinweise für eine direkte als auch indirekte Wirkungsweise des Süßholzextraktes an Gurke gefunden.

Im Rahmen des sich daran anknüpfenden und nun abgeschlossenen Projektes sollten daher *in vitro* und *ad planta* Versuche zur direkten Wirkung des Extraktes bzw. von wirksamen Extraktfraktionen durchgeführt werden. Zudem sollten mikroskopische Untersuchungen *in vitro* zu Zoosporenschlupf nach Behandlung mit dem Extrakt und seinen Fraktionen, sowie die protektive Wirkung in Gurke überprüft werden. Die Versuche erfolgten vornehmlich im System Gurke/Falscher Mehltau.

In Versuchen *ad planta /in vivo* sollte ausserdem die indirekte Wirkung des Extraktes untersucht werden. Hierbei sollte als Marker die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Einfluss auf die Photosynthese geprüft werden. Zudem sollte der Einfluss von Radikalfängern (für ROS) auf die Wirkung im System Gurke/Falscher Mehltau untersucht werden.

Die Ergebnisse dienen der Charakterisierung der Wirkungsweise des Extraktes, woraus Hinweise für eine optimale und effektive Anwendung in der Praxis abgeleitet werden können.

- Welche Extraktfraktionen (Inhaltsstoffgruppen oder Substanzen, sofern bekannt) sind an der Wirkung gegen Falschen Mehltau an Gurke und Braunfäule an Tomate beteiligt?

In dem vorangegangenen Projekt 06OE188 „Strategiekombinationen zur Regulierung des Falschen Mehltaus an Gurke unter Glas/Folie und im Freiland“ wurden bereits Fraktionen und Inhaltsstoffe des Süßholzextraktes identifiziert, die maßgeblich an der Wirkung gegen Falschen Mehltau an Gurke beteiligt sind. Basierend auf diesen Daten erfolgte eine weiterführende Prüfung der Extraktfraktionen in diesem System. Insbesondere bei einer indirekten Wirkungsweise, bei der die Abwehr über eine Stimulierung des pflanzlichen Metabolismus erfolgt, aber auch bei einer fungiziden Wirkung können verschiedene Bestandteile eines Pflanzenextraktes zur Wirkung kommen. Um dies zu prüfen, sollten die

verschiedenen Extraktfraktionen daher auch einer Testung im System 'Tomate / Braunfäule' *in vitro* und *in vivo* unterzogen werden. Abschließend sollten für die wirksamsten Bestandteile und den Rohextrakt in Tomate (in Gurke wurde dieser im Vorgängerprojekt 06OE188 eruiert) die effektiven Konzentrationen (EC-Werte) zur Erreichung einer 50%-igen Wirkung ermittelt werden.

Bei der Trifolio-M GmbH wurden dem Süßholzextrakt verschiedene Formulierungsstoffe zugesetzt, die eine bessere Haftung und Benetzung, aber auch Regenstabilität oder UV-Schutz vermitteln sollten. Die formulierten Präparate, die bei Trifolio-M GmbH in einem Screening die genannten Parameter positiv beeinflusst haben, wurden anschließend am JKI Darmstadt unter kontrollierten Bedingungen in Tomate im Hinblick auf ihre Wirkung gegen Braunfäule geprüft. Dabei sollten die formulierten Präparate erhöhtem UV-Licht ausgesetzt werden. Einige in diesem Testsystem vielversprechende Präparate wurden selektioniert und flossen in die Freilanduntersuchungen im Arbeitsschwerpunkt 2 ein.

➤ Wie kann das Upscaling der Süßholzextraktion erfolgen?

Für die kommerzielle Nutzung des Süßholzextraktes ist eine Produktion in größeren Mengen notwendig. Erfahrungsgemäß ist die Übertragung des Extraktionsschemas von Klein- zu Großproduktion ein schwieriger Schritt, bei dem eine Überprüfung der Wirksamkeit des gewonnenen Extrakts wichtig ist. Das Upscaling erfolgt zusammen mit einer Qualitätsprüfung basierend auf der Bestimmung extrahierter Inhaltsstoffe bei der Trifolio-M GmbH. Eine abschließende Wirksamkeitsprüfung des Extraktes sollte dann *ad planta* im System Tomate / *P. infestans*, am JKI Darmstadt, unter Nutzung standardisierter Applikationstechnik, durchgeführt werden.

1.3 Planung und Ablauf des Projektes

Im Nachgang zum Projekttreffen vom 4. bis 6. Dezember 2012 wurde der Arbeitsplan für das JKI Darmstadt und Trifolio-M GmbH an die bis zum Projektende zu realisierenden und zur Erreichung der Ziele prioritären Versuchsfragen angepasst. Der geänderte und mit dem Projektträger abgestimmte Arbeitsplan enthält die ursprünglichen Arbeitspakete, aus denen jeweils einzelne Fragestellungen herausgenommen wurden.

Im Folgenden sind die Arbeiten und ebenso die Änderungen im Arbeitsplan ausführlich dargestellt.

Im Projekt wurden Untersuchungen der an der Wirkung des Süßholzextraktes gegen Oomyceten beteiligten Mechanismen durchgeführt („Mode of action“). Zur Abklärung der direkten Effekte wurden lichtmikroskopische Untersuchungen zum Zoosporenschlupf herangezogen. Hier sollte der Schwerpunkt auf der Untersuchung der isolierten wirksamen Fraktionen liegen. Die Überprüfung der Beteiligung indirekter Wirkmechanismen (pflanzenstärkende Wirkung / indirekte Wirkmechanismen) erfolgte auf verschiedenen Ebenen, um die Prozesse in der Pflanze besser einschätzen zu können. Als ein Marker wurde das Auftreten von H₂O₂ und sein Einfluss auf die Pflanzenreaktion nach Extraktbehandlung, untersucht. Mögliche Auswirkungen von H₂O₂ auf den Infektionsprozess mit dem Falschen

Mehltau an Gurke sollten untersucht werden, wenn eine Fraktion vorläge, die ausschließlich eine indirekte Stimulierung der pflanzlichen Abwehr bewirkt. Der Einfluss der Süßholzextraktbehandlung auf die Photosyntheseleistung gesunder und mit Falschem Mehltau infizierter Gurkenpflanzen sollte mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenz bestimmt werden.

- Änderungen zum ursprünglichen Arbeitsplan: Die Einflüsse der Behandlung mit Süßholzextrakt / wirksamen Inhaltsstoffen auf das weitere Infektionsverhalten der Zoosporen bzw. Sporangien auf der Blattoberfläche wurde aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt. Versuche zum potenziellen Einfluss auf den Zoosporenschlupf wurden nicht mit einzelnen Inhaltsstoffen sondern mit wirksamen Fraktionen durchgeführt.

Die Bedeutung von H₂O₂ im Abwehrprozess gegen Oomyceten kann nur dann zielführend geprüft werden, wenn eine Fraktion aus Süßholz identifiziert werden kann, die ausschließlich eine indirekte Wirkung besitzt. Ansonsten überlagern sich die Effekte der direkten und indirekten Wirkung zu stark, um schlüssige Aussagen treffen zu können. Zur Untersuchung des Einflusses der Süßholzextraktbehandlung auf die Photosyntheseleistung wurde die Messung der Chlorophyllfluoreszenz herangezogen.

- Änderungen zum ursprünglichen Arbeitsplan: Die Bestimmung des Chlorophyllgehalts entfiel aus zeitlichen Gründen. Die Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen, der Prüfung auf indirekte Wirkung und der Einfluss der Extraktbehandlung auf die Chlorophyllfluoreszenz wurden zur Beurteilung der Wirkmechanismen und des Einflusses auf die physiologische Leistungsfähigkeit behandelter Pflanzen herangezogen.

Untersuchung der an der Wirkung gegen Falschen Mehltau an Gurke und Braunfäule an Tomate beteiligten Extraktfraktionen / Inhaltsstoffen:

Die 5 verschiedenen Fraktionen der naßchemischen Aufarbeitung des Süßholzextraktes wurden an Tomatenjungpflanzen auf ihre Wirkung gegen Braunfäule geprüft. Dies erfolgte zudem in den Untersuchungen zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz *ad planta*, in denen auch eine Abschlußbonitur nach Infektion mit dem Erreger erfolgte. Erkenntnisse zum Wirkungsgrad der Substanzgruppen/Fraktionen des Extraktes konnten so eruiert werden.

- Änderungen zum ursprünglichen Arbeitsplan: Die Isolierung weiterer Banden aus Fraktion 6 des Süßholzextraktes und die Kombination von Fraktionen bzw. Einzelsubstanzen auf ihre Wirksamkeit entfielen aus Zeitgründen.

Grundlegende Unterschiede in der Wirksamkeit einzelner Fraktionen in den Testsystemen Gurke und Tomate konnten aus den weiteren im geänderten Arbeitsplan angegebenen Versuchen abgeleitet werden.

Für die wirksamsten Fraktionen wurde eine Berechnung der EC₅₀-Werte durchgeführt. Es erfolgt ein Vergleich der EC₅₀-Werte an Tomate und Gurke (an Gurke wurden bereits erste

Untersuchungen mit dem Rohextrakt und Fraktion 6 in einem Vorgängerprojekt durchgeführt). Daran anschließende Arbeiten und Versuche beinhalteten die Testung der Fraktion 4 vornehmlich in Gurke, sowie des Rohextraktes in Tomate Kultivar 'Minibell', da diese als Versuchssorte in den Prüfungen *ad planta* und *in vivo* im Projekt verwendet wurde. Fraktion 6 wurde in Tomate alternativ auch im Kultivar 'Campari' getestet. 'Campari' wurde als Standardsorte im Arbeitsschwerpunkt 2 im Semi-Freiland und im Gewächshaus eingesetzt. Im Sortenvergleich zwischen 'Minibell' und 'Campari' ergab sich für die Wirksamkeit des Rohextraktes bei diesen Kultivaren kein nennenswerter Unterschied, so dass die Sorte 'Minibell' im UV-Testsystem im Klimaraum Verwendung fand, da sie als Zwergtomate aus Gründen der Praktikabilität besser für diese Versuche geeignet war.

Verbesserung der UV- Stabilität des Süßholzextraktes:

Die von der Trifolio-M GmbH hergestellten formulierten Süßholzpräparate wurden nach *in vitro* Testung bei der Firma auf UV-Stabilität hin selektioniert. Am JKI Darmstadt wurden die selektionierten Extrakte auf Wirksamkeit an Tomatenjungpflanzen getestet. Hier wurde die Wirkung mit und ohne UV-Bestrahlung geprüft. Basierend auf den Ergebnissen sollten die ein bis drei am wirksamsten formulierten Präparate selektioniert werden, um dann in die Freilanduntersuchungen in Arbeitsschwerpunkt 2 einfließen zu können, auch vordringlich weiterhin im 3. Projektjahr, um eine UV-stabile Formulierung für die Freilandanwendungen im Arbeitsschwerpunkt 2 zu finden (Projektpartner DLR Rheinpfalz).

- Änderungen: Mit JKI Kleinmachnow wurde eine Arbeitsteilung hinsichtlich der Testung von UV- und Regenstabilität vereinbart: JKI Kleinmachnow übernahm im Arbeitsschwerpunkt 1 die Versuche zur Regensimulation an Gurke, während JKI Darmstadt die Versuche zur UV-Stabilität an Tomate unter Nutzung effizienter Anwendungstechnik (Applikationsanlage) vornahm.



Upscaling der Süßholzextraktion:

Die Extrakterstellung für Freilandversuche erfolgte in einer Pilotanlage. Die Extrakte wurden von Trifolio-M einer Qualitätsprüfung basierend auf der Bestimmung extrahierter Inhaltsstoffe unterzogen. Eine Prüfung auf Wirksamkeit von Formulierungen aus den so hergestellten Extrakten erfolgte am JKI Darmstadt im System Tomate/*P. infestans* und im Arbeitsschwerpunkt 2 in den Freilandversuchen.

- Änderungen: Da die Art der Extraktproduktion von der verwendeten Formulierung abhängig ist, die Optimierung der Formulierung jedoch noch nicht abgeschlossen ist, konnte das Upscaling nicht mehr während der Laufzeit des Projekts abgeschlossen werden.

Mit den o.g. Versuchen wurden die prinzipiellen Möglichkeiten und ersten wichtigen Schritte zur Optimierung einer großtechnischen Produktion aufgezeigt. Nachfolgend ist die geänderte Arbeitsplanung, unter Einbeziehung der zeitlichen Änderungen im Ablauf, dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht Zeitplan (mit geändertem Arbeitsplan)

Jahr	
Ursprünglich 2010; tatsächlicher Projektbeginn 2011	<p>a) Literatursichtung;</p> <p>b) Untersuchung zu wirksamen Fraktionen an Tomate/<i>P. infestans</i>: (Fraktionen des Extraktes)</p> <p>Teilziel: Erste Ergebnisse zur Bestimmung der in Tomaten wirksamen Fraktionen</p>
2011	<p>d) Testung der UV-Beständigkeit von Formulierungen der Trifolio-M GmbH an Tomate/<i>P. infestans</i>: UV-Bestrahlung 7, 3 und 0 Tage, anschließend Inokulation an Tomatenpflanzen; Wiederholung mit den besten Formulierungen</p> <p>e) Untersuchung direkter Wirkmechanismen: Untersuchung von wirksamen Fraktionen an <i>P. infestans</i>; lichtmikroskopische Beobachtung des Zoosporenschlupfes in vitro;</p> <p>f) Upscaling: Testung der Wirkung von Extrakten (bzw. Formulierungen aus diesen Extrakten) der Trifolio-M GmbH aus einer Pilotanlage durch JKI an Tomate/<i>P. infestans</i>; Wiederholungen mit wirksamsten Extrakten</p> <p>Teilziele: Entwicklung eines UV-Testsystems in vivo (Tomate) und Selektion von Formulierungen auf UV-Beständigkeit für die Testung unter Freilandbedingungen im Arbeitsschwerpunkt 2</p>
2012	<p>b) Untersuchung zu wirksamen Fraktionen an Tomate/<i>P. infestans</i>: (Fraktionen des Extraktes); Ermittlung der EC₅₀-Werte von P1 und Fraktion 6</p> <p>d) Fortsetzung der Versuche von 2011 basierend auf den Ergebnissen der Freilandversuche (Arbeitsschwerpunkt 2)</p> <p>e) Fortsetzung der Versuche von 2011</p> <p>f) Fortsetzung der Versuche von 2011</p> <p>g) Untersuchung des Einflusses auf die Photosynthese: Messung der Chlorophyllfluoreszenz von Extrakt- bzw. mit Fraktionen behandelten Gurkenpflanzen (Messungen über mehrere Tage) mit und ohne Infektion</p> <p>h) Untersuchung indirekter Wirkmechanismen: Qualitative Untersuchung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Applikation des Extraktes bzw. von Fraktionen in Gurken und Tomate ohne Infektion (verschiedene Messzeitpunkte);</p> <p>Teilziele: Optimierung bezüglich Formulierung des Extraktes; Einschätzung des Einflusses des Extraktes auf die physiologische Leistung von Gurkenpflanzen</p>
2013	<p>b) Statistische Auswertung der Versuche</p> <p>c) Ermittlung der EC₅₀-Werte einer weiteren wirksamen Fraktion (Fraktion 4) an Gurke/<i>P. cubensis</i></p> <p>d) Fortführung der Versuche von 2012 basierend auf den Ergebnissen der Freilandversuche (Arbeitsschwerpunkt 2)</p> <p>e) Fortführung der Versuche von 2012</p> <p>f) Fortführung der Versuche von 2012</p> <p>h) Untersuchung indirekter Wirkmechanismen: Mikroskopische Studien und Versuche an getopften Gurken zur Abwehr des Pathogenes nach Applikation des Extraktes bzw. von Fraktionen unter besonderer Berücksichtigung der Beteiligung von ROS;</p> <p>Teilziel: Erste Schritte zur Optimierung des Upscaling-Prozesses der Extrakterstellung; Beurteilung der an der Wirkung beteiligten Wirkmechanismen; Abschließender Vergleich der in Gurke und Tomate wirksamen Fraktionen;</p>

2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Seit 2007 werden ethanolische Extrakte aus dem Laub der Süßholzpflanze *Glycyrrhiza glabra* intensiv in Labor und Gewächshaus auf ihre Wirkung gegen Falschen Mehltau/*Phytophthora infestans* in verschiedenen Gemüsekulturen und Kartoffel geprüft. An Gurke wurde unter Glas bzw. Folie bei einem 7- bzw. 10-tägigen Behandlungsintervall ein Wirkungsgrad von ca. 70 % gegen *P. cubensis* erreicht. Jedoch konnte im Freiland in Gurke trotz teilweise siebenmaliger Anwendung eines Süßholzextraktes keine wirtschaftlich bedeutende Reduktion des Mehлтаubefalls erzielt werden; oft zeigte sich nur eine Befall verzögernde Wirkung, die nicht ertragsrelevant war (Mattmüller *et al.* 2010).

Ähnlich ist die Wirkung gegen *Bremia lactucae* an Salat und *P. destructor* an Zwiebel einzuschätzen (Schmitt *et al.* 2010). Bei Salat wurden in Gewächshausversuchen bei protektiver Behandlung Wirkungsgrade von über 90 % erzielt. Dagegen war die Wirkung des Süßholzextraktes an Salat bei wöchentlicher Applikation im Freiland sehr unterschiedlich zu bewerten. In einem ersten Freilandversuch 2009 in Zwiebeln zeigte der Süßholzrohextrakt auch keine Wirkung gegen *P. destructor* bei fünfmaliger Anwendung nach dem Prognosemodell ZWIPERO und Standardspritzbalken-Applikationstechnik.

An Freiland-ähnlichen Zwiebelpflanzen und kontrollierten Beregnungsintervallen konnte aber gezeigt werden, dass die mangelnde Regenfestigkeit und wahrscheinlich auch die geringe UV-Stabilität des Süßholzrohextraktes dessen Wirkungsdauer stark einschränkt (Schmitt *et al.* 2010). An Tomaten im Freiland konnten dagegen in ersten Versuchen Wirkungsgrade von 40 % bzw. 63 % nach wöchentlicher Behandlung erzielt werden (Schuster, 2008; Jäckel, pers. Mitt.).

In Zusammenarbeit mit der LVG Heidelberg und dem JKI Kleinmachnow wurden Gewächshausversuche unter Praxisbedingungen mit dem ethanolischen Pflanzenrohextrakt aus Süßholz durchgeführt, die sehr gute Ergebnisse hinsichtlich der Krankheitseindämmung des Falschen Mehltaus an Gurke zeigten. Die Wirkungsgrade lagen zwischen 70 % und 80 % bei 7- bis 10-tägigem Behandlungsabstand mit Rohextrakt 3 % w/v. Die Befallswerte in den Kontrollen lagen zwischen 30 % und 50 %.

In einem Kleinparzellenversuch wurde die Wirkung des 5 %-igen Rohextraktes gegen *P. infestans* an Tomate unter Freilandbedingungen getestet. Hier konnten Wirkungsgrade von 40 % bei wöchentlicher Applikation erreicht werden (Befall in den Kontrollen 90 %). Die Fraktionierung des Extraktes ergab, dass sich die Hauptwirkung gegen Falschen Mehltau an Gurke in der Fraktion 6 (enthält Substanzen mit sauer reagierenden funktionellen Gruppen, Flavonoide) befindet. Es konnten mindestens drei Wirkstoffbanden, mittels DC sowie SC und HPLC, in anschließenden Biotests *ad planta* in der Fraktion 6 des ethanolischen Süßholzrohextraktes (Gurke - *P. cubensis*) nachgewiesen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Erregerhaltung

3.1.1 Kultivierung von *Phytophthora infestans*

Der Erreger der Kraut- und Knollen- bzw. Braunfäule in Kartoffel bzw. Tomate, *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary (Oomycota), wurde auf standardisiert hergestelltem Komplexmedium (Gemüsesaftagar, V8) kultiviert und für Versuche produziert. Für die Versuche wurde ein JKI-Isolat verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 15 °C im Dunkeln im Klimaraum.

Zweimonatlich erfolgte eine Wirtspassage über sterile Kartoffelscheiben, um die Pathogenität des Erregers aufrecht zu erhalten. Zudem erfolgte eine Dauerkultivierung in Schrägagarröhrchen (Roggenmedium) wirtspassagierter Phytophthora, um jederzeit auf pathogenes Material zurückgreifen zu können. So konnte pathogenes Material für Versuche zeitnah in ausreichenden Mengen, nach Abimpfung auf Roggenagar und anschließend auf V8-Medium, produziert werden.

Bei Bedarf erfolgte nach der Wirtspassage über Kartoffel eine Fungizid- und Antibiotikapassage des Isolates. Dabei wurde Penicillin (60 ppm), Ampicillin (50 ppm) und Rifampicin (50 ppm) dem V8-Anreicherungsmedium beigemischt, um die meisten gram-positiven und gram-negativen Keime sowie auch die sich nicht teilenden und ruhenden bakteriellen Zellen, die das Mycel besiedeln könnten, abzutöten. Als Fungizid gegen höhere Pilze (Basidiomyceten, Ascomyceten und Fungi imperfecti) kam in seltenen Fällen Fludioxonil (50 ppm) im Medium zum Einsatz.

3.1.2 Kultivierung von *Pseudoperonospora cubensis*

Der 'Falsche Gurkenmehltau' *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curt.) Rostovzev, ist ein biotropher Oomycet, der nur in den Wirtspflanzen (*Cucurbitaceen*) kultiviert werden kann. Auf künstlichen Nährmedien oder Komplexmedien gedeiht *P. cubensis* nicht. Dazu wurden befallene Gurkenblätter abgedunkelt und bei relativer Feuchtigkeit >90 % und 20 °C bildeten sich in wenigen Stunden (oder über Nacht) Sporangienlager, die aus Spaltöffnungen herauswuchsen.

Für die Erregerhaltung wurden frische Sporangienlager mit Wasser abgewaschen und als Inokulum wieder auf die Blattunterseite gesunder Gurkenpflanzen aufgesprüht oder auf die Unterseite von Blattscheiben als Tröpfcheninokulation mit einer Pipette gesetzt. Im Anschluss wurde ein Tag/Nacht Rhythmus von 16 h/8 h bei 20 °C eingestellt. Der Eipilz entwickelte sich darauf innerhalb von wenigen Tagen in den Pflanzen (Blättern), bis nach erneuter Sporulation wiederum Sporangien geerntet werden konnten.

3.2 Infektion mit *P. infestans* ad planta und Zoosporenschlupf *in vitro*

3.2.1 Inokulum *P. infestans*

Als Inokulum diente eine Sporangiensuspension von *P. infestans* von V8-Platten. Als günstig erwies sich ein Kulturalter von ca. 2 Wochen alten V8-Agarplatten. In diesem Kulturalter wiesen die meisten Sporangien eine Viabilität von ca. 99 % auf (erste Sporulationsphase auf dem Medium). Zum Gewinnen des Inokulums pro Versuch *ad planta* wurden ca. 15 bis 25 Kulturplatten mit kaltem sterilisiertem Leitungswasser abgeschwemmt (10 ml je Kulturplatte), um Inokulum der Dichte 1×10^4 bis 5×10^4 Sporangien je ml zu erhalten. Nach Inokulation der Versuchspflanzen mit dem Erreger wurde der Zoosporenschlupf des Inokulums unter Versuchsbedingungen (bei ca. 15 °C) zu Beginn und nach 24 h ermittelt, um einen Eindruck über die Schlupffähigkeit der Sporangien in dem jeweiligen Versuch zu erhalten.

3.2.2 Infektion *P. infestans* ad planta (Tomate, UV-Test)

Das Inokulum (s. 3.2.1) wurde zügig auf die Versuchspflanzen aufgesprüht (Desaga Laborsprüher, oder alternativ eine Sprühflasche, je nach Versuchskonzept, Versuchsgröße und Praktikabilität). Der Schlupf der Sporangien sollte überwiegend erst auf den Pflanzen erfolgen, um eine vergleichbare Ausbringungsmenge mit Sporangien je Pflanze in den Versuchen zu erhalten und die Infektion so standardisierbarer gestalten zu können.

3.2.3 Infektion *P. infestans* in vivo ((Fb, Tomate)

Die Infektion der Tomaten Fb mit dem Erreger (Fb auf Wasseragar-Platten, oder in Gerdaschen auf Draht und feuchtem Fließpapier über Wasserreservoir (50 ml) je nach Versuch), erfolgte bei 15 °C und bei 24 h Dunkelheit. Das Inokulum der Dichte 1×10^4 Sporangien/ml wurde als Tröpfcheninfektion mit einer variablen Pipette (Handy Step[®] S von BRAND, 10 (15) µl/Tropfen) ausgebracht. Die Sporangiensuspension wurde im Becherglas mit Magnetfischchen unter vorsichtigem Rühren (Magnetrührer HEIDOLPH MR 2000/2002) bewegt gehalten, um eine einheitlichere Verteilung der Sporangien beim Abpipettieren zu gewährleisten. Anschließend wurde ein Tag/Nacht Regime mit 16 h/8 h eingestellt und nach 5 - 7 Tagen die Bonitur der Fb angesetzt.

3.2.4 Schlupf und Viabilität von *P. infestans* Sporangien *in vitro*

Der Zoosporenschlupf (Entlassung von Zoosporen aus Sporangien) wurde lichtmikroskopisch in unterschiedlichen Behandlungsmitteln und/oder Konzentrationen der Mittel (je nach Versuchsfrage) jeweils gegen eine Kontrolle (Leerformulierung, z. B. Wasser, EtOH) ausgewertet. Zu Versuchsbeginn (*in vitro*-Assays) wurden entleerte Sporangien zum Zeitpunkt $t = 0$ h ermittelt, sowie nach $t = 24$ h (oder in entsprechenden Zeitreihen je nach Versuchsfrage).

Der Schlupf diente dabei als Maß zur Ermittlung einer direkten Wirkung *in vitro*.

Die Sporangien wurden dazu bei ca. 10 °C im Dunkel inkubiert und bei RT mikroskopisch auf Schlupf untersucht. Dabei erfolgte in Assays zum Schlupfverhalten eine Doppelbestimmung von mindestens 2 x 50 bzw. 100 Sporangien je Ansatz/Variante. Es wurden leere Hüllen der Sporangien als 'erfolgreicher Zoosporenschlupf' gezählt und gefüllte Sporangien als 'im Schlupf gehemmte oder abgetötete Sporangien' gewertet. So konnte je nach Behandlung die Viabilität der Sporangien erfasst und die Wirkung der Mittel/Extrakte/Fractionen bewertet werden. Der Farbstoff Evans-Blau (Letalfärbung) konnte auch zur Kontrastierung der Sporangien im mikroskopischen Bild dienen.

Für Vitalitätstests von unbehandeltem Inokulum mittels fluoreszenzmikroskopischer Auswertung wurde Acridin-Orange als Fluorophor verwendet, da eine sehr sichere Unterscheidung zwischen *letalen* und *vitalen* Sporangien (sowie Zoosporen) leicht möglich war. Evans-Blau wurde als Chromophor für *in vitro*-Assays zum Schlupfverhalten nach Applikation von Süßholz und Fraktionen oder zur Betrachtung der Wirkung (Symptomatik) von Behandlungen auf Sporangien oder Zoosporen verwendet.

3.2.5 Inkubation *P. infestans ad planta* (Tomate)

Die Inkubation der Tomatenpflanzen mit dem Erreger in Ganzpflanzenversuchen erfolgte bei 15 °C und bei 24 h Dunkelheit in Plexiglaszylindern, die mit einer lichtdurchlässigen Folie abgedeckt wurden. Anschließend wurde ein Tag/Nacht Regime mit 16 h/8 h unter Pflanzenleuchten im Klimaraum eingestellt und nach 5 - 7 dpi die Bonitur angesetzt (s.u. 3.5.1).

3.2.6 Inkubation *P. infestans in vivo* (Fb-Bioassay)

Die Inkubation der Tomaten Fb mit dem Erreger in Fb-Bioassays erfolgte bei 15 °C und bei 24 h Dunkelheit und relativer Luftfeuchte von ca. 100 % in Kammern auf Drahtgittern über feuchtem Fließpapier oder in Petrischalen auf Wasseragar, je nach Versuchsaufbau und Fragestellung. Nach 24 h wurde ein Tag/Nacht Regime mit 16 h/8 h unter Pflanzenleuchten im Klimaraum zur Inkubation eingestellt. Nach 5 - 7 dpi wurde in den *in vivo*-Versuchen die Bonitur angesetzt (s.u. 3.5.2).

3.3 Infektion mit *P. cubensis* und Erregerschlupf

3.3.1 Inokulum *P. cubensis*

Als Inokulum diente eine Sporangiensuspension von *P. cubensis* von Blättern befallener Gurken. Damit wurden Versuchspflanzen oder Blattscheiben infiziert. Dazu wurden genügend Pflanzen 24 h dunkel und feucht gehalten und anschließend die ausgewachsenen Sporangienlager mit Leitungswasser abgeschwemmt. Um ein Inokulum der Dichte 5×10^4 Sporangien je ml zu erhalten, wurde im Mikroskop mittels Fuchs-Rosenthal Zählkammer in Doppelbestimmung die Anzahl Sporangien pro ml ermittelt und eine entsprechende Verdünnung hergestellt.

3.3.2 Infektion *P. cubensis ad planta* (Gurke)

Die Entwicklung von *P. cubensis* ist an feuchte Bedingungen gebunden. In Versuchen wurde das Inokulum auf die Blattunterseite von ebenfalls blattunterseits behandelten Pflanzen gesprüht (Desaga Laborsprüher, ca. 0,3 bar Sprühdruk) und die Pflanzen über Nacht für eine erfolgreiche Infektion dunkel und feucht gehalten.

3.3.3 Infektion mit *P. cubensis in vivo* (Bs Gurke)

Die Infektion der Gurkenblattscheiben (Bs) mit dem Erreger erfolgte bei 20 °C und bei 24 h Dunkelheit auf Petrischalen mit Wasseragar (30 ppm Benzimidazol). Dazu wurden auf der Scheibe ein bis drei Inokulationstropfen (je 10 µl) gesetzt, mit einer Dichte von 5×10^3 Sporangien pro ml.

3.3.4 Inkubation *P. cubensis ad planta* (Gurke)

Im Anschluss an die Infektion (s. 3.3.3) wurden die Pflanzen bei 20 °C unter Pflanzenleuchten und bei einem Tag/Nacht Regime von 16 h/8 h im Klimaraum gehalten.

3.3.5 Inkubation *P. cubensis in vivo* (Bs)

Die infizierten Blattscheiben wurden auf Wasseragar (ca. 100 % rel. Feuchtigkeit) bei 20 °C unter 16 h/8 h Tag/Nacht Regime inkubiert. Nach 7 - 10 dpi wurde die Bonitur angesetzt.

3.3.6 Schlupf und Viabilität von *P. cubensis* Sporangien *in vitro*

Schlupf und Viabilität wurde wie unter 3.2.4 für Sporangien von *P. infestans* beschrieben, durchgeführt. Die Sporangien wurden jedoch nicht für Assays bei ca. 10 °C, sondern bei ca. 15 °C bis zum Schlupf (spätestens nach 24 h) im Klimaraum aufbewahrt, und bei RT mikroskopisch ausgewertet.

3.4 Pflanzenanzucht

3.4.1 Pflanzenanzucht Tomate

Tomaten wurden bei RT in Bioerde/Sand im Mischungsverhältnis 2/1 in Töpfe ausgesät (10 Samen pro Topf, 8 x 8 x 8 cm). Für die meisten Versuche wurde cv. 'Minibell', in einzelnen Versuchen wurden die cv. 'Campari' oder 'Harzfeuer' verwendet. Nach dem Auflauf wurden sie ins Gewächshaus gestellt (22 - 24 °C). Pikiert wurde ca. 2 Wochen nach dem Auflauf einzeln in Töpfe mit Bioerde/Sand 2/1, und nach 2 Wochen mit Vinasse (laut Herstellerangaben) aufgedüngt. Zur Schädlingsbekämpfung wurden Schlupfwespen z. B. gegen *Weißer Fliege* eingesetzt sowie Gelbtafeln verwendet. In der Regel gingen die Tomaten im Stadium BBCH 107 in Versuche (7 voll entwickelte Blätter). Im Gewächshaus wurde ein Tag/Nacht

Regime von 16 h/8 h eingestellt. Für Versuche im Klimaraum wurden die Tomaten 2 Tage vor den Behandlungen im Klimaraum bei 20 °C (Lumilux- und Fluora Pflanzenleuchten), mit einer Strahlung von ca. 300 µmol/sm² (LI-COR Light Meter) in Pflanzenhöhe adaptiert.

3.4.2 Pflanzenanzucht Gurke

Gurkensamen wurden bei RT in Bioerde/Sand im Mischungsverhältnis 2/1 in Töpfe (10 Samen pro Topf, 8 x 8 x 8 cm) ausgesät. In der Regel wurde Kultivar Chinesische Schlange verwendet. Nach dem Auflauf im Klimaraum (ca. 24 °C) wurden sie im 1-Blatt-Stadium pikiert, einzeln in Töpfe (8 x 8 x 8 cm) mit Bioerde/Sand 2/1, und nach 2 Wochen mit Aminovital (1 % in Wasser) aufgedüngt.

In den Klimaräumen wurde ein Tag/Nacht Regime von 16 h/8 h eingestellt. Zur Schädlingsbekämpfung wurden Raubwanzen, z.B. gegen Thripse, eingesetzt. In der Regel wurden die Gurkenpflanzen im Stadium BBCH 103 oder BBCH 104 mit 3 bzw. 4 voll entwickelten Blättern für Versuche verwendet.

3.5 Pflanzenversuche

3.5.1 Versuche mit Ganzpflanzen (Tomate)

Testsysteme ad planta

Ganzpflanzenversuche in Tomate wurden je nach Fragestellung und Versuchsgröße mit 3 oder 4 WDH zu je 2 Pflanzen durchgeführt.

Nach erfolgter Mittelbehandlung (Handapplikation oder Applikationsanlage SCHACHTNER, je nach Versuchsansatz) und vor der Inokulation wurden die Versuchspflanzen im Klimaraum für mindestens 24 h gehalten, bis die Spritzbeläge abgetrocknet waren.

Biotest 7-3-0 Tage UV: Wirksamkeit unter UV-Lichteinfluss

In UV-Tests wurden die behandelten Pflanzen einer definierten Bestrahlungszeit unter Röhren mit erhöhtem UV-Anteil (Silvania), alternierend geschaltet mit Lumilux- und Fluora Pflanzenleuchten, ausgesetzt.

Hier wurden drei Gruppen jeweils 7 Tage mit UV, 3 Tage mit UV oder 0 Tage (ohne UV) bestrahlt, bevor die Infektion (s.u. Punkte 3.2.1, 3.2.2) gesetzt wurde. Die UV-Menge (Anzahl UV-Röhren und Entfernung zur Lichtquelle) ermittelte sich aus Vorversuchen mit Rohextrakt behandelten Tomaten. Die Anzahl UV-Röhren und die Entfernung der Pflanzen zu dieser Strahlungsquelle wurde so gewählt, dass der Rohextrakt nach 7 Tagen UV-Behandlung der Tomaten deutlich in der Wirkung gegenüber 0 Tagen UV-Behandlung nachließ.

Die Infektion und Inkubation erfolgte in Plexiglaszylindern bei 15 °C wie unter Punkt 3.2.5 beschrieben.

Die Befallsstärke wurde in Ganzpflanzenversuchen in Tomate in einer Bonitur prozentual als Anteil der befallenen Blattfläche von drei mittleren Blättern je Pflanze geschätzt (Befall 0 % bis 100 %). Die Wirkungsgrade der Behandlungen gegen eine Kontrolle (Wasser) wurden nach Abbott (1925) berechnet ($WG = (\% \text{ Befall Kontrolle} - \% \text{ Befall Behandlung}) / \% \text{ Befall Kontrolle} \times 100$).

3.5.2 Versuche mit Fiederblättchen (Tomate)

Testsysteme *in vivo* (Fb)

Die Befallsstärke in Fb Bioassays (Typ 1 und Typ 2, s. u. Punkt 3.2.1, 3.2.3, 3.2.6) wurde in Befallsklassen ermittelt.

Fb Test Typ 1: Wirksamkeit als prozentuale Befallsstärke

Dazu wurden je Fiederblättchen 4 (oder 6) Inokulationstropfen gesetzt und nach der Inkubation (5 - 7 dpi) auf + oder - Befall untersucht und ausgewertet. Die Wirkungsgrade der Behandlungen gegen eine Kontrolle (Wasser oder Leerformulierung je nach Versuch) wurden nach Abbott (1925) berechnet. Dabei ermittelte sich die Befallsstärke aus dem prozentualen Anteil infizierter Stellen der Fb/Variante, bezogen auf die Gesamtanzahl gesetzter Infektionsstellen der Fb je Variante. Dies ermöglichte eine ausreichende Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Behandlungsvarianten in einem Versuch, um Formulierungen in ihrer Wirkung miteinander vergleichen zu können.

FB Test Typ 2: Wirksamkeit über Befallsklassen

In einem weiteren Testsystem mit Fb wurde der Befall Befallsklassen erhoben, in dem in die Befallsermittlung auch die Größe der Infektionsstellen einging. Es kamen dabei 4 Befallsklassen in die Auswertung (0 bis 3). Diese wurden als Häufigkeiten erfolgter Infektionen je Befallsklasse dargestellt.

0 = ohne Befall

1 = geringer Befall, minimal

2 = Befallsherd von der Größe des Inokulationstropfens

3 = Befallsherd größer als Inokulationstropfen, flächig

Detektion von ROS nach Mittelbehandlung *in vivo* (Fb):

Um H₂O₂-Bildung (ROS) als Nachweis einer indirekten Wirkung nach Mittelbehandlung (P1-Extrakt/Fraktionen) zu untersuchen, wurden Tomaten Fb entnommen und in Anlehnung an Thordal-Christensen *et al.* (1997) in die zu testenden Varianten getaucht. Die qualitative

Erfassung der ROS-Bildung erfolgte mittels Nachweis von oxidiertem DAB-Farbstoffreagenz in der Lösung. Durch die Oxidation des Farbstoffes Diaminobenzidin (DAB) durch H_2O_2 entsteht ein braunes beständiges Präzipitat im Gewebe.

Durchführung:

1. Probennahme der Fb, Entstressung der Fb in 10 mM MES-Puffer, pH 6
2. Behandlung der Fb in Lösungen (Mittel, Induktoren), Dauer je nach Versuch, z.B. 6 h (24 h)
3. Wässern der Fb
4. Inkubation in DAB-Farbstofflösung (0,1 %), pH 3,8, für 3 h
5. Überführen der Fb in Bleichlösung, um Chlorophyll zu entziehen (48 h, 2x wechseln)
6. Konservierung in 70 % EtOH, visuelle Auswertung auf weißem Filterpapier
(Die Behandlungslösungen/Puffer enthielten zum besseren Eintauchen der Bs Tween₂₀ in einer finalen Konzentration von 0,0125 %.

3.5.3 Versuche mit Blattscheiben (Tomate)

Testsysteme *in vivo*

Von Tomate wurden Blattscheiben nur in Vortestungen zum H_2O_2 -Nachweis (Qualitativer Nachweis von ROS) verwendet. Tomatenblättern wurden Fb entnommen und Bs ausgestanzt (Korkbohrer, 10 mm Durchmesser). Diese wurden in Versuchsgefäßen (Szintillationsgläschen, Multi-Well-Platten) in den Mitteln durch Tauchen auf H_2O_2 -Bildung (ROS) mittels DAB-Färbung untersucht. Im Weiteren erfolgte dies wie oben unter Punkt 3.5.2 beschrieben.

3.5.4 Versuche mit Ganzpflanzen (Gurke), Testsysteme *ad planta*

In Versuchen im Klimaraum wurden Temperatur, Feuchtigkeit und Lichtintensität aufgezeichnet (Datalogger). In den Versuchen herrschte auf Pflanzenebene eine Lichtstrahlung von ca. 300 $\mu\text{mol}/\text{sm}^2$ (LI-COR Light Meter), mit einem Tag / Nacht Regime von 16 h / 8 h bei 20°C.

Behandlung der Gurken *ad planta* :

Behandelt wurden die Pflanzen je nach Versuchsfrage mit P1-Extrakt/Fraktionen in entsprechender Konzentration i.d.R. blattunterseits durch Sprühapplikation mit einem Desaga Laborsprüher mit ca. 0,8 bar Sprühdruck und Membranvakuumpumpe. Für die Versuche wurde im Allgemeinen das 2. und 3. voll entwickelte Laubblatt behandelt und ausgewertet. Nach Behandlung wurden die Versuchspflanzen im Klimaraum randomisiert, meist in 3 oder

4 WDH x 2 Pflanzen, aufgestellt. Zu Infektion und Inkubation der Versuchspflanzen siehe Punkt 3.3.

Bonitur:

Die Pflanzen wurden i.d.R. nach 7 - 10 dpi bonitiert. Dazu wurde die Befallsstärke (über chlorotische/nekrotische Blattfläche in Bezug zur Gesamtblattfläche) in Prozent-Klassen (0, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40...100 %) je Blatt/Pflanze visuell geschätzt und der Mittelwert pro Wiederholung und für alle Wiederholungen pro Variante errechnet.

EC₅₀ Bestimmung *ad planta* :

Zur Ermittlung der effektiven Konzentration bei 50 % Wirkungsgrad von Fraktion 4 wurden die Gurken wie unter 3.4.2 beschrieben angezogen. In diesen Versuchen wurden 3*2 oder 4*2 Pflanzen je Konzentration blattunterseits behandelt und am darauf folgenden Tag mit *P. cubensis* (s. 3.3.2) infiziert und inkubiert (s. 3.3.4). Die Bonitur fand i. d. R. 7 - 10 dpi statt (s. oben). Statistik und Auswertung der Daten zur EC₅₀ siehe 3.6.

Messungen der Chlorophyllfluoreszenz *ad planta* :

Ganzpflanzen (s. 3.4.2) wurden wie unter Punkt 3.5.4 beschrieben behandelt. Je nach Versuchsfrage wurde 1 dpa eine Infektion an der Ganzpflanze vorgenommen (3.3.2 & 3.3.4). Zur Messung der Chlorophyllfluoreszenz wurden i. d. R. 4 Messpunkte auf den Blättern in ihrer Position definiert. Die Messungen wurden über den Inkubationszeitraum bis zum Boniturzeitpunkt beinahe täglich (ca. 10 Tage) mit dem PAM-Fluorometer (Fa. Waltz, Germany) in diesen Blattbereichen, durchgeführt.

3.5.5 Versuche mit Blattscheiben (Gurke), Testsysteme *in vivo* (Bs)

Versuche zur Detektion von ROS nach Mittelbehandlung *in vivo*:

Von Gurkenblättern wurde eine festgelegte Anzahl Bs je Blatt und Pflanze (WDH) ausgestanzt (Korkbohrer, 6 oder 10 mm Durchmesser, je nach Gefäß) und in Versuchsgefäße (Gläschen, Well-Platten) gleichmäßig auf die Behandlungsvarianten aufgeteilt. Pro Versuch wurden 4 (bis 10) WDH je Ansatz durchgeführt.

Durch Tauchen in Behandlungsmittel (mit oder ohne Vakuumfiltration, je nach Versuchsfrage) wurden die Bs behandelt und mittels DAB-Färbung auf H₂O₂-Bildung (ROS) untersucht. Im Weiteren erfolgte der Assay wie oben unter Punkt 3.5.2 für Fb in Tomate beschrieben.

Bs Test Typ 1: Wirksamkeitsversuch, Befallsstärke prozentual

Für Infektionsversuche wurden Blattscheiben wie unter Punkt 3.5.5 beschrieben, entnommen. Die Pflanzen wurden zuvor i.d.R. blattunterseits mit Sprühapplikation (Desaga Laborsprüher bei ca. 0,8 bar Sprühdruk (Membranvakuumpumpe) behandelt.

Die Bs (4-6 pro Blatt, 2. und/oder 3. Blatttage) wurden auf Agar (Wasseragar, 30 ppm Benzimidazol) in Petrischalen aufgeteilt. Infektion (Punkt 3.3.3) und Inkubation (Punkt 3.3.5) wurden wie beschrieben durchgeführt. Die Bonitur fand 7 - 10 dpi statt. Ausgewertet wurden die sichtbaren Infektionsstellen je Bs. Bei 6 WDH je Variante wurden so bis zu 48 Bs mit 144 Infektionsstellen ausgewertet und graphisch in Säulendiagrammen (umgerechnet in Befall in Prozent) je Variante dargestellt.

Messungen der Chlorophyllfluoreszenz *in vivo*:

Um den Einfluss auf die Photosynthese Extrakt (Fraktionen) behandelter Gurkenpflanzen zu untersuchen, wurde die Messung der Chlorophyllfluoreszenz (F_v/F_m) herangezogen (s. 3.5.4). Auch in Versuchen zur Stresstoleranz behandelter Pflanzen diente diese Methode der bestimmung des Einflusses auf die Photosynthese.

Die Versuchspflanzen wurden wie unter Punkt 3.5.5 beschrieben behandelt. Darauf wurden die ausgestanzten Bs auf Wasseragar-Platten gelegt (mind. 4 Bs pro Blatt mit 3 - 4 WDH/Pflanzen je Variante) und über ca. 2 - 3 Wochen beinahe täglich die Chlorophyllfluoreszenz jeder Bs in deren Zentrum gemessen.

Im Fall von abiotischen Einflussfaktoren wurden die Ganzpflanzen bzw. die Bs bei verschiedenen Temperaturen aufgestellt. Die Fluoreszenz-Werte wurden je Variante und Zeitpunkt der Messung gemittelt. Statistische Auswertung erfolgte wie unter Punkt 3.6 erläutert.

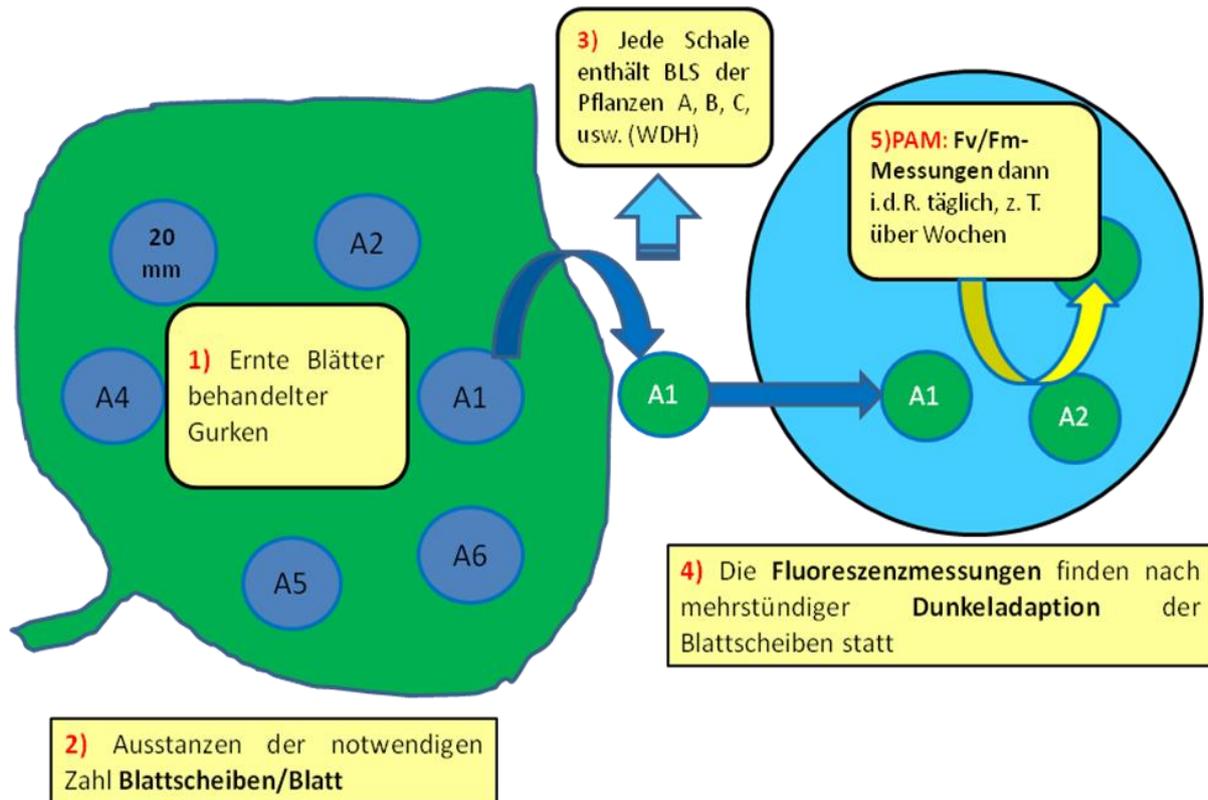


Abbildung 1: Blattscheiben Test für Chlorophyllfluoreszenzmessungen behandelter Gurken mit PAM (Puls-Amplituden-Modulationsfluorometer) der Fa. WALZ (Germany), BIS = Blattscheiben (Bs), F_v/F_m = Chlorophyllfluoreszenz.

3.6 Statistik: zu den Versuchen *ad planta* und *in vivo* in Gurke und Tomate

Konnten in den Versuchen statistisch auswertbare Daten gewonnen werden, wurden diese mit Excel, dem Statistik-Programm SIGMA PLOT (Version 11.0) oder dem *Add In* für Excel (WINSTAT[®] Version 2006) ausgewertet und eine Analyse der Varianz vorgenommen (Tukey Test oder Prozedur nach Holm-Sidak, $P < 0,05$, $\alpha = 0,05$).

In Versuchen zur EC_{50} Berechnung wurden mit dem Programm MAXIMUM LIKELIHOOD (MLP Version 3.08) die jeweilige effektive Konzentration bei 50 % Wirkungsgrad nach einer Probit Analyse berechnet und statistisch auf Heterogenität der Daten überprüft.

Der Wirkungsgrad (WG) einer Behandlung wurde in Anlehnung an Abbott (1925) berechnet. Der Befall wurde über Schätzung der befallenen Blattfläche pro WDH je Variante (gemittelt) in Prozent erhoben.

3.7 Fraktionierungsschema für pflanzliche Extrakte (Süßholz, gemahlen)

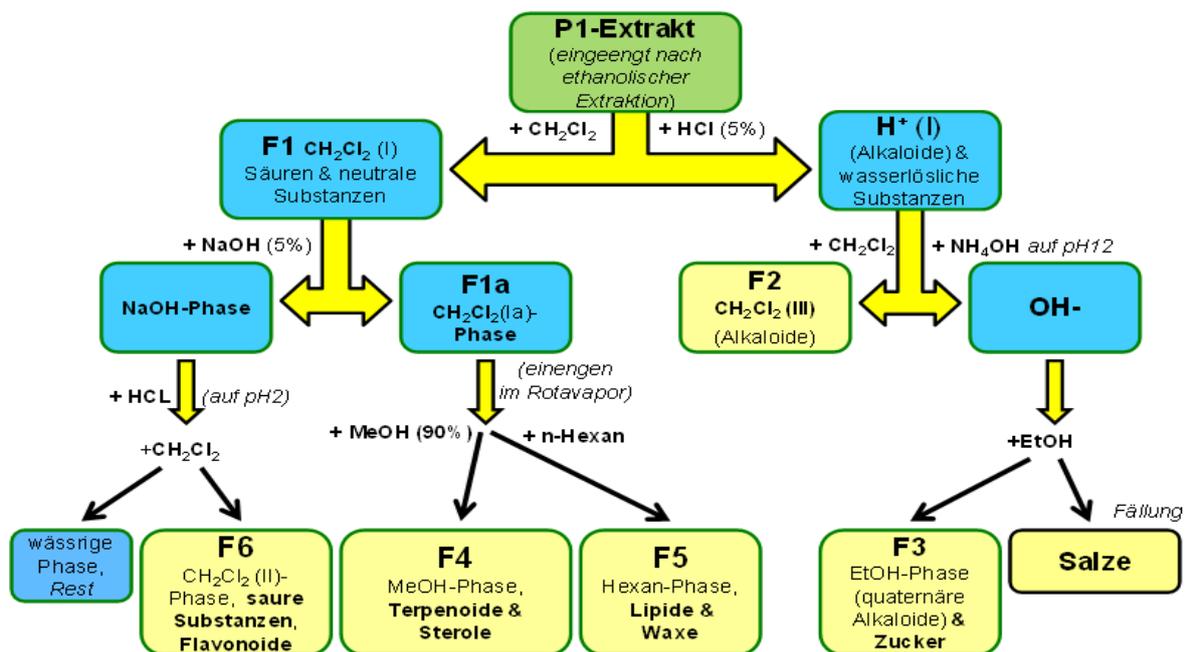


Abbildung 2: Faktionierungsschema für pflanzliche Extrakte (Süßholz, *Glycyrrhizza glabra*, HERBA); F=Fraktion; Hier: Methode A: CH_2Cl_2 (DCM) für wasserunlösliche Substanzen und Substanzen mit sauren Gruppen im 1. Schritt, sowie in den Schritten zu F1, F1a und F6 als Lösungsmittel; Methode B: tert-Butylmethylether anstatt DCM in den genannten Fraktionierungsschritten.

Methode A und B: Fraktionierung

In der Regel wurde Süßholzextrakt mit DCM (Dichlormethan) in einer naßchemischen Fraktionierung in verschiedene Fraktionen getrennt (Methode A) (Abbildung 2).

Dabei ist zu vermerken, dass sich zwischen zwei Phasen in der Fraktionierung von P1 zu Fraktion 1 und im weiteren zu Fraktion 6 und Fraktion 1a, ein Intermedium bildete, das stets der unteren Phase zugeordnet wurde. Nach Substitution von DCM mit tert-Butylmethylether (Methode B) konnte dieses Intermediat weitestgehend vermieden werden, die geringe Menge Intermedium wurde der Ether-Phase zugeordnet, so dass eine vollständigere Trennung der Phasen erreicht werden konnte.

4 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Innerhalb der Projektlaufzeit wurden vom JKI Darmstadt 29 von Trifolio-M hergestellte und vorausgewählte Formulierungen in unterschiedlichen Testsystemen getestet.

Im Wirksamkeitsvergleich wurden die Formulierungen Bayp 3, UFO 6, UFO 10, T20G-5 und LSS 13 in 2 %-iger Konzentration und in 1,5 %-iger Konzentration in Gurke/*Falscher Mehltau* geprüft. Daraufhin gingen diese Formulierungen in Biotests im Semifreiland unter natürlichen Bedingungen im System Gurke/*P. cubensis*, um einen ersten Eindruck der Auswirkungen von Witterungseinflüssen wie Sonne und Regen zu untersuchen. Eine Auswahl dieser und weiterer Formulierungen (KW32-6, FNF 5 und FNF 6) wurde ebenso in Tomate/*Braunfäule* im Semifreiland unter natürlichen Einflüssen getestet. In einem speziell entwickelten UV-Testsystem im Klimaraum fanden in Tomate im zweiten und dritten Projektjahr weitere 21 Formulierungen Eingang. Hier wurde der UV-Abbau in einem dreistufigen Test (0 UV, 3 d UV und 7 d UV) ermittelt. Im Zuge dessen wurden durch Trifolio-M Formulierungen angepasst und weiterentwickelt. Wichtige Formulierungen mit Fokus auf UV-Stabilität wurden darauf unter Verwendung einer Applikationsanlage (*Schachtner* Spraylab) in Tomate auf Wirksamkeit nach künstlichem UV-Einfluss getestet. Dies waren die Formulierungen: P1SC-149, P1SC-159, P1SC-160 und P1SC-161. Mit der Formulierung P1SC-149 wurden auch unterschiedliche Aufwandmengen verglichen. Diese Formulierung wurde im dritten Projektjahr zusätzlich noch einmal im Semifreiland unter Verwendung der Applikationsanlage in Tomate getestet. Dabei kamen auch Variationen in der Applikationstechnik zum Tragen. So wurden neben der Kopfdüse (als Spritzbalkensimulation) auch Varianten mit zusätzlichen seitlichen Düsen (als Droplegsimulation) in der Applikation eingesetzt.

Desweiteren wurden im Verlauf des Projekts Untersuchungen des Süßholzextraktes und von Fraktionen auf Wirksamkeit sowie die Beteiligung direkter und indirekter Wirkungen an Gurke bzw. Tomate durchgeführt.

4.1 Wirksamkeitsvergleich ausgewählter Süßholzformulierungen im Klimaraum in Gurke/*Pseudoperonospora cubensis*

Die fünf eingesetzten Formulierungen (2 % w/v) haben sich im Klimaraum sehr wirksam gezeigt (WG > 95 %). In der Tendenz waren die P1-Formulierungen so wirksam wie der P1-Rohextrakt (Abbildung 3). Um zwischen den Wirksamkeiten der einzelnen Formulierungen besser differenzieren zu können, wurde die Konzentration auf 1,5 % w/v reduziert. Hier zeigte sich bei 2 Formulierungen, LSS13 und UFO 10, nach wie vor ein WG > 95 %, die übrigen getesteten Formulierungen erreichten, wie auch der Rohextrakt, ca. 70-80 % WG (Abbildung 4).

Zusätzlich wurden folgende Parameter beim Einsatz der Formulierungen geprüft: Phytotoxizität, Applizierbarkeit der Mittel und Löslichkeit der Formulierungen in Wasser. In die Feldtestung (JKI Kleinmachnow, DLR Rheinpfalz und ergänzende Versuche am JKI Darmstadt) sind daher auch eine EC- (LSS 13) sowie WP-Formulierungen (UFO 6, 10) eingegangen. EC steht für in Wasser 'emulgierbares Konzentrat' und WP für in 'Wasser dispergierbares Pulver'. Die eingesetzten Formulierungen enthielten Zusatzstoffe zur Verbesserung der Löslichkeit, UV-Schutzstoffe und/oder Stoffe, die die Regenfestigkeit von Süßholzextrakt (HERBA) erhöhen sollten.

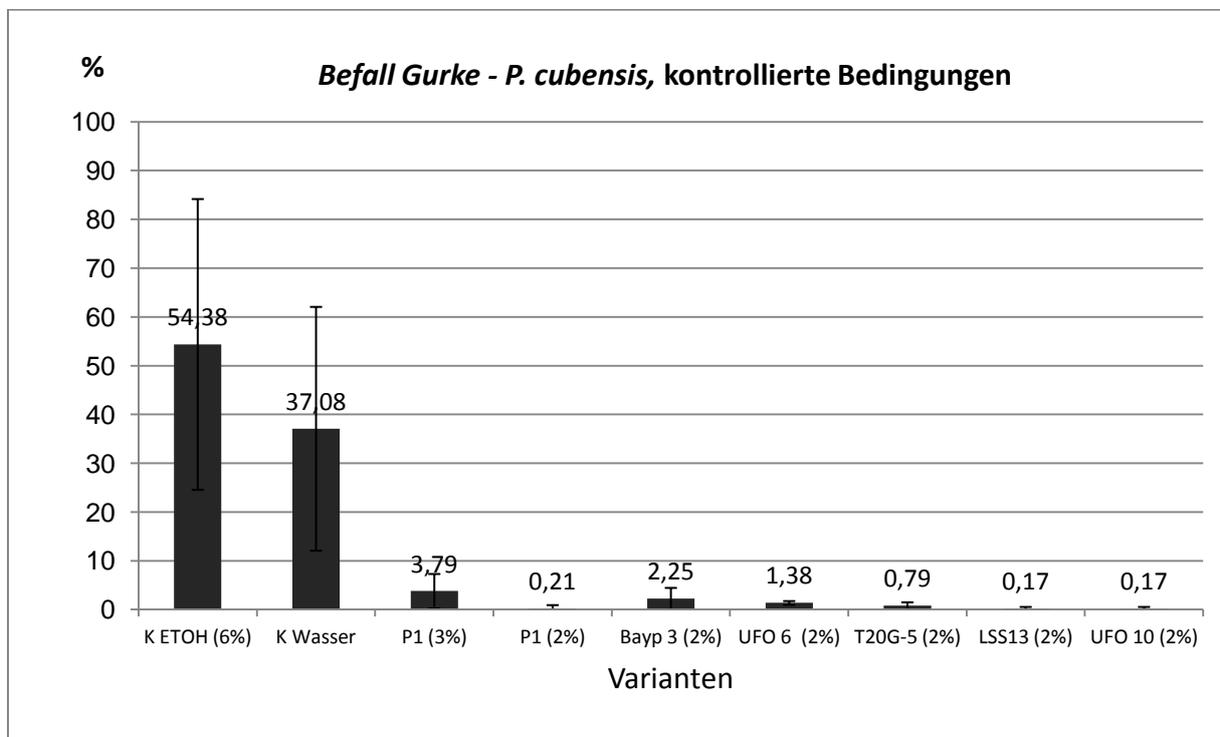


Abbildung 3: Versuch G1: Wirksamkeitstest von fünf 2 %-igen Süßholzformulierungen (w/v) im System Gurke/Falscher Mehltau in Ganzpflanzen in der Klimakammer. K EtOH: Kontrolle Ethanol, K Wasser: Kontrolle Wasser, P1: Süßholz-Rohextrakt, Bayp, UFO, T2OG, LSS: Süßholzformulierungen; Balken: Standardabweichung.

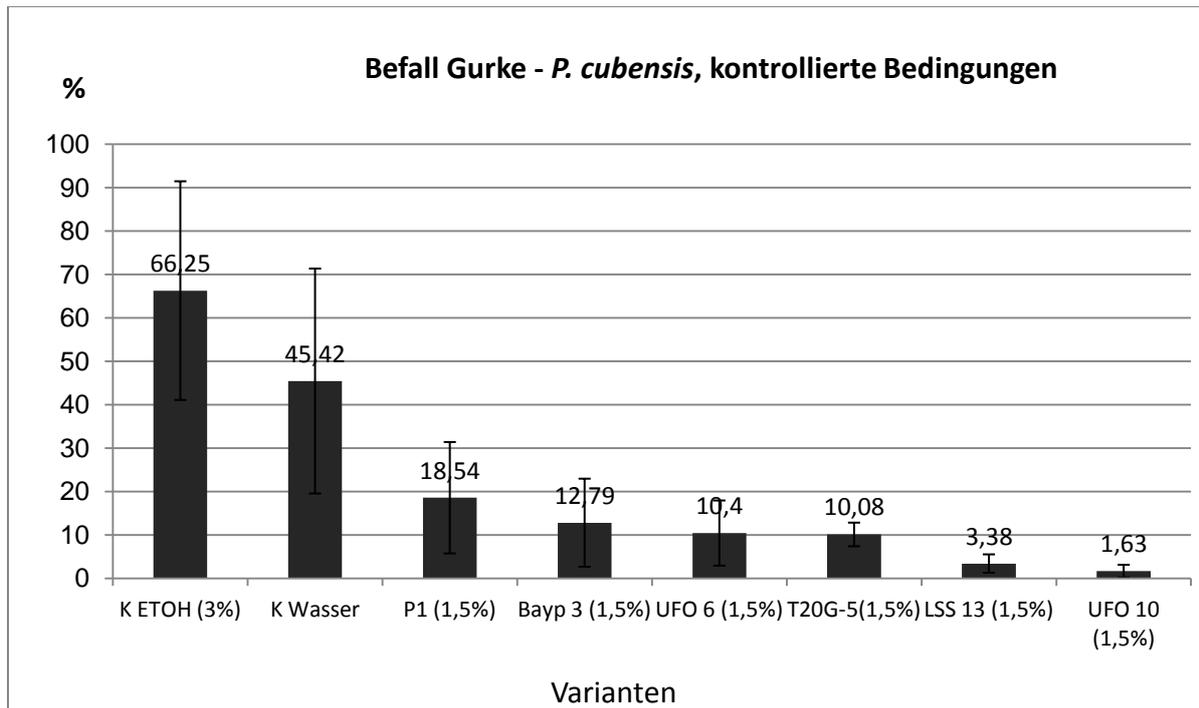


Abbildung 4: Versuch G2: Wirksamkeitstest von fünf 1,5 %-igen Süßholzformulierungen (w/v) im System Gurke/Falscher Mehltau in Ganzpflanzen in der Klimakammer. K EtOH: Kontrolle, Wasser: Kontrolle Wasser, P1: Süßholz-Rohextrakt, Bayp, UFO, T2OG, LSS: Süßholzformulierungen; Balken: Standardabweichung.

4.2 Wirksamkeitsprüfungen ausgewählter Süßholzformulierungen im Semifreiland in Gurke/*Pseudoperonospora cubensis* und Tomate/*Phytophthora infestans*

Projektjahr 05-2011 bis 04-2012:

Eine Auswahl dieser Formulierungen (Tabelle 2 u. 3) ging wegen ihrer guten Anfangswirksamkeit (mit den weiteren Formulierungen FNF 5, FNF 6 und KW32-6, die bei Trifolio-M in Tomate vorgetestet wurden) in die Testung im Semifreiland in getopften Tomaten und Gurken unter natürlichen Bedingungen (Besonnung und/oder Regenereignisse) am Standort JKI Darmstadt.

Eine Übersicht fasst die Ergebnisse der Prüfungen in **Gurke** im Semifreiland zusammen (s. Tabelle 2). Hier sind die Versuchsergebnisse (mit Einfluss von Sonnenstunden und Regenmengen in mm/m²) und die eingesetzten Formulierungen aufgeführt. Der Rückgang der Wirksamkeit wird hier nach den jeweiligen Wetterereignissen mit den Vermerken 0 (ohne Wirksamkeitsverlust), über (+) minimaler bis zu ++++ (totaler Wirkungsverlust), für die jeweiligen Formulierungen des Versuches, wiedergegeben. In Gurke wurde der Bs Test Typ 1 (s. 3.5.5) in den Versuchen (G) Nr. 4, 5, 6 und 10 angewendet. In Versuch (G) 3 wurde statt einer Bs- eine Ganzpflanzen-Bonitur angesetzt. Die Infektion und Inkubation in Gurke im Versuch 3 fand im Klimaraum statt, wie unter Punkt 3.3.2 u. 3.3.4 beschrieben.

Tabelle 2: Test von Süßholzformulierungen in Gurke (2011), Wirkungsabbau durch Sonnen- und Regeneinfluss

V.- Nr. G	Mittel (2 %)	P1	KW 32-6	KW 32-6 SF	UFO 6	UFO 10	BAYP 3	FNF 5	FNF 6	LSS 13	T20- G 5
	[h] [mm]										
3*	4 h	(+)			0	(+)				0	(+)
3*	20 h	0			0	(+)				(+)	(+)
4	38 h	+++									
5	24 h + 25 mm	+++			+++		+++	++			
5	40 h + 35 mm	++++			++++	++++	++++	++++			
6	12 h + 9 mm	++++							++++		
10	12 h	0	0	0	+		0				
10	18 h	+++	+++	++	++++		+++				

Wirkungsverlust klassifiziert als: 0: ohne, (+): gering, ++: moderat, +++: stark, ++++: total; Regenmenge in mm pro m² und Sonnenscheindauer [h] kumulativ; leeres Feld bedeutet Formulierung nicht im Versuch getestet; *: Ganzpflanzenbonitur, ansonsten Bs Test Typ 1 (Gurke).

Zusammenfassung der Versuche in Gurke im Semifreiland 2011 mit Einfluss von Sonnenstunden und/oder Regenmengen (Tabelle 2):

- Bis zu 20 Sonnenstunden (ohne Regen) zeigten kaum Einfluss auf die Wirksamkeit von Rohextrakt und Formulierungen (G 3, Tabelle 2).
- Ab 12 h Sonne und 9 mm Regen zeigt der Rohextrakt sowie eine Vergleichsformulierung keine Wirkung mehr (G 6).
- Niederschläge bis 25 mm (mit 24 h Sonne) führten zu moderatem bis starkem Wirkungsverlust (G 5). Ab 40 Sonnenstunden mit 35 mm Regen hatten die getesteten Formulierungen keinerlei Wirkung (G 5).
- Wenn der Spritzbelag durch Morgentauereignisse „verdünnt“ wurde, hatten Sonnenereignisse einen stärkeren Einfluss auf die Wirksamkeit (G 10, Details nicht gezeigt).
- Von den 7 nur unter Besonnung getesteten Formulierungen waren am wirksamsten: **KW32-6 SF > UFO 6 = BAYP 3 = Rohextrakt P1**.
- **KW32-6 SF** war wesentlich stabiler in der Wirkung als der Rohextrakt in Gurke (G 10).

Die folgende Übersicht fasst die Ergebnisse der Prüfungen in **Tomate** im Semifreiland in 2011 im JKI Darmstadt zusammen.

Tabelle 3: Test der Formulierungen in Tomate 2011, Wirkungsabbau durch Sonnen- und Regeneinfluss

Versuch Nr. T	Mittel (2 %)	P1	KW32-6	KW32-6 SF	UFO 6	BAYP 3	FNF 5	FNF 6
	[h] [mm]							
7 *	60 h + 10 mm	+++			+++	++	++++	++++
8 #	12 mm	++	++	+	++	++		
9 *	12 mm	++	(+)	(+)	+	+		

Wirkungsverlust klassifiziert als: 0: ohne, (+): gering, ++: moderat, +++: stark, ++++: total; Regenmenge in mm pro m² und Sonnenscheindauer [h] kumulativ; leeres Feld bedeutet Formulierung nicht im Versuch getestet; Biotest Fiederblättchen (Tomate), Bonitur zu Versuchsende, * 'Campari', # 'Harzfeuer'.

Zusammenfassung der Versuche im Semifreiland 2011 in Tomate mit Einfluss von Sonnenstunden und/oder Regenmengen (Tabelle 3):

- Zwischen den beiden Tomatensorten konnten nur leichte Unterschiede verzeichnet werden. Die Anfälligkeit von 'Harzfeuer' scheint etwas größer als die von 'Campari' für Braunfäule zu sein (T 8, 9). Beide Versuche fanden parallel unter gleichen Bedingungen statt.
- Bis zu 30 Sonnenstunden und 10 mm Regen hatten geringen Einfluss auf die Wirkung (Detailergebnisse aus T 7, hier nicht gezeigt).
- Niederschläge (ohne direkte Sonne) bis 12 mm/m² in einer Woche führten nur zu geringen bis moderaten Wirkungsverlusten (T 9).
- Über 60 Sonnenstunden mit kumulativ 10 mm Regen im Versuchszeitraum (T 7) führten zu z. T. sehr deutlichen Wirkungsverlusten bei den Test-Formulierungen in diesem Versuch, **BAYP 3** war aber etwas stabiler zu Versuchsende als die anderen Formulierungen.

Von den 6 getesteten Formulierungen in Tomate waren am wirksamsten:

KW32-6 SF > BAYP 3 >= UFO 6

KW32-6 SF zeigte die größte Stabilität in der Wirkung über die Zeit in den Tomatensorten 'Campari' und 'Harzfeuer', sowie die beste Wirksamkeit auch noch zu Versuchsende in diesen beiden Versuchen und wirkte besser als der Rohextrakt in beiden geprüften Kultivaren (T 8, 9).

4.2.1 Vergleich der Wirkungen der getesteten Formulierungen in Gurke und Tomate im Semifreiland 2011

Von den neun getesteten Formulierungen im Semifreiland in Gurke und den sechs getesteten in Tomate im Sommer/Früherbst 2011 war die Formulierung **KW32-6 SF** in beiden Systemen nach entsprechenden Wettereinflüssen in der Wirkung am stabilsten (Tabelle 2 u. 3).

Weitere Formulierungen waren ebenso wirksam wie der Rohextrakt (P1). Nur wenige Formulierungen wiesen unter den gegebenen Witterungseinflüssen eine geringere Beständigkeit in der Wirkung auf.

Mit den Biotests im Semifreiland konnten erste Ergebnisse zur Dauer der Beständigkeit der Formulierungen in Abhängigkeit von natürlicher Sonnenscheindauer und von Regenmengen im jeweiligen Versuch verglichen werden. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche im Semifreiland (in unterschiedlichen Sommermonaten) sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar, da natürlicherweise unterschiedliche Sonnenscheindauer und Regenmengen vorlagen.

Für den standardisierten Vergleich wurde im Folgenden ein UV-Testsystem entwickelt, mit dem Formulierungen im Klimaraum unter künstlicher UV-Strahlung auf Wirksamkeit getestet wurden.

4.3 Wirksamkeitsprüfungen ausgewählter Formulierungen im Klimaraum mit künstlicher UV-Strahlung in Tomate/Braunfäule:

Die Entwicklung eines Süßholzpräparates gegen Falschen Mehltau mit hinreichender UV-Beständigkeit war das vordringliche Ziel in diesem Arbeitsschwerpunkt. So sollten in diesem Screening UV-stabile und dabei hochwirksame Formulierungen für Praxisanwendungen und weitere Prüfungen im Freiland gefunden werden. Zu diesem Zweck wurde ein Biotest in Tomate entwickelt, in dem an drei Behandlungsterminen die Prüfmittel appliziert wurden (jeweils für 0, 3 und 7 Tage UV-Bestrahlung) und ein Tag nach der letzten Applikation der Ganzpflanzen die Inokulation mit dem Pathogen vorgenommen wurde. Die Bestrahlungsdauer war so gewählt, dass der Rückgang der Wirksamkeit der Testmittel im Vergleich zum Rohextrakt unter künstlichem UV-Lichteinfluss dargestellt werden konnte (Punkt 3.5.1). Dadurch sollte eine Differenzierung der UV-Stabilität der Formulierungen erreicht werden.

4.3.1 Versuche *ad planta* in Tomate im Klimaraum mit künstlicher UV-Strahlung:

Projektjahr: 05-2012 bis 04-2013: UV-Teste

Im Projektzeitraum bis 04-2013 wurden 18 Süßholzformulierungen im UV-Testsystem mit künstlicher UV-Strahlung im Klimaraum getestet. Die Versuchspflanzen wurden wie unter Punkt 3.5 beschrieben mit Mitteln an drei Terminen behandelt und gestaffelt 0, 3 und 7 Tage erhöhter UV-Bestrahlung ausgesetzt (Punkt 3.5.1). Fotos zum generellen Versuchsaufbau sind in Abbildung 5 dargestellt. Zwölf Formulierungen wurden mit Handapplikation bis zum 'run-off' eingesetzt, 6 Formulierungen wurden in der Applikationsanlage (Schachtner Spraylab) mit 800 L/ha Aufwandmenge (P1-Extraktgehalt 2 % w/v je Formulierung) und mit handelsüblichen Lechler IDK 12004 *Flachstrahl-Airinjektor-Düse* behandelt und anschließend auf UV-Beständigkeit in Tomate / *P. infestans* geprüft (Tabelle 4). Ca. 50 % der im 2. Projektjahr getesteten Süßholz-Formulierungen waren ebenso wirksam wie oder wirksamer als der Rohextrakt unter UV-Bestrahlung. Hohe Wirkungsgrade von ca. 80 % und mehr nach 7 Tagen UV-Bestrahlung zeigten die Formulierungen SIM SC-1, Mon 68 SC-1, P1 SC-061, P1 SC-066, und P1 SC-122 (Tabelle 4).

Kupfer (Atempo, Cuprozin WP, Cuprozin Progress) war in der Regel im jeweiligen Versuch stabiler in der Wirkung als die Süßholzformulierungen. Das eingesetzte Kupferpräparat erreichte in der Regel tendenziell höhere Anfangswirkungen (keine UV-Bestrahlung) und hatte eine bessere Wirkungsstabilität gegenüber Süßholzextrakt-Formulierungen.

Mit einer Testformulierung (P1SC-001) wurden verschiedene Aufwandmengen verglichen (400, 800 und 1200 L/ha Aufwandmenge). Es zeigte sich, dass mit 800 L/ha (Düse IDK 12004) in Tomate die beste Anfangswirkung (keine UV-Bestrahlung) erreicht werden konnte (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 5: Versuchsaufbau zur Prüfung der UV-Stabilität von Süßholzformulierungen in Tomate. Bild rechts oben: Formulierungen von Süßholz im UV-Test an getopften Tomaten der Sorte 'Minibell', Bild links oben und unten: Bestrahlung der Pflanzen mit Sylvania UV-Vollspektrum-Röhren (30 % höherer UV-Anteil), bis zu 7 Tage nach Behandlung und über 16 h pro Tag; Bild rechts unten: SCHACHTNER Applikationsanlage mit Düse über Kopf der Pflanzen.

Tabelle 4: Zusammenstellung der Ergebnisse der im 2. Projektjahr 05-2012 bis 04-2013 getesteten Formulierungen im Testsystem mit künstlicher UV-Strahlung in Tomate

If. Nr.	Formulierung	1 dpa ohne UV		3 dpa + UV		7 dpa + UV		1 dpa ohne UV		3 dpa + UV		7 dpa + UV		V-Nr.	Tomate Sorte	
		Infektion [%]	Wirkungsgrad [%]	Infektion [%]	Wirkungsgrad [%]	Infektion [%]	Wirkungsgrad [%]									
1	P1	17,50	66,13	6,67	88,06	21,67	48,00									
2	SIM SC-1*	5,00	90,32	5,00	91,04	8,33	80,00							T13	Campari	
3	Mon 68 SC-1	2,50	95,16	9,17	83,58	8,33	80,00							Fb + Pf		
4	Simon SC-1	0,00	100,00	3,33	94,03	35,83	14,00									
5	P1*	0,93	92,75	5,56	93,93	11,11	88,35									
6	TF SC-001	2,78	95,65	7,41	91,92	46,3	51,45									
7	TF SC-041	2,78	95,65	6,48	92,93	33,33	65,05							T14	Campari	
8	Atempo	0,93	92,75	0,93	93,93	0,93	88,35							Fb + Pf		
9	P1 SC 047*	16,67	83,33	34,44	65,56	55,56	36,71									
10	P1 SC 048	22,22	77,78	63,33	36,67	56,94	35,13							T15	Minibel	
11	P1	4,44	95,56	41,11	58,89	73,33	16,46							Pf		
12	Cuprozin Progr.	1,11	98,89	0,00	100,00	7,78	91,14									
13	P1	7,67	90,61	4,33	94,35	2,33	96,50									
14	Kupfer	3,67	95,51	4,00	94,78	4,00	94,00							T16	Minibel	
15	P1 SC-061*	7,67	90,61	4,00	94,78	4,00	94,00							Pf		
16	P1 SC-066	7,67	90,61	6,33	91,74	6,00	91,00									
17	Cu_800	1,56	90,18	2,56	84,41	1,39	73,96									
18	SC-001*	5,25	66,84	2,56	84,41	2,89	45,83							T20#	Minibel	
19	SC-094	4,78	69,82	2,33	85,76	4,61	13,54							Pf		
20	Molke	8,89	43,86	6,67	59,32	5,71	0,00									
21	Cuprozin WP	0,89	87,77	0,84	83,90	1,08	88,77									
22	SC-107	1,34	81,50	2,58	50,35	6,64	30,79							T21	Minibel	
23	SC-122*	2,28	68,65	3,68	29,18	1,98	79,40							Pf		
24	SC-123	2,63	63,76	3,19	38,54	7,28	24,19									
25	Cuprozin Progr.	18,33	58,02	19,00	57,78	40,00	20,53									
26	EC-029	12,00	72,52	17,00	62,22	59,29	0,00							T29	Minibel	
27	EC-064	13,33	69,47	14,67	67,41	40,00	20,53							Pf		
28	EC-065	11,73	73,13	25,67	42,96	44,00	12,58									
Die besten Süßholz-Varianten sind in den Versuchen mit * gekennzeichnet!																
															# statt 3 Tage UV, 4 Tage UV Variante	

Süßholzformulierungen im UV-Testsystem *ad planta* (mit cv. 'Campari' oder cv. 'Minibell') gegen Kupfer (Atempo, Cuprozin); Gelb: wirksamste Varianten je Versuch.

Projektjahr 05-2013 bis 12-2013: UV-Teste im Klimaraum

Zum Ende des Projektes wurden 6 Weiterentwicklungen formulierter Süßholzextrakte im System Tomate/Braunfäule unter künstlicher UV-Bestrahlung geprüft, eine davon (P1SC-149) zusätzlich auch im Semifreiland unter natürlichen Bedingungen.

Diese Formulierung wurde daher auch für einen weiteren Versuch zum Einfluss der Aufwandmenge verwendet.

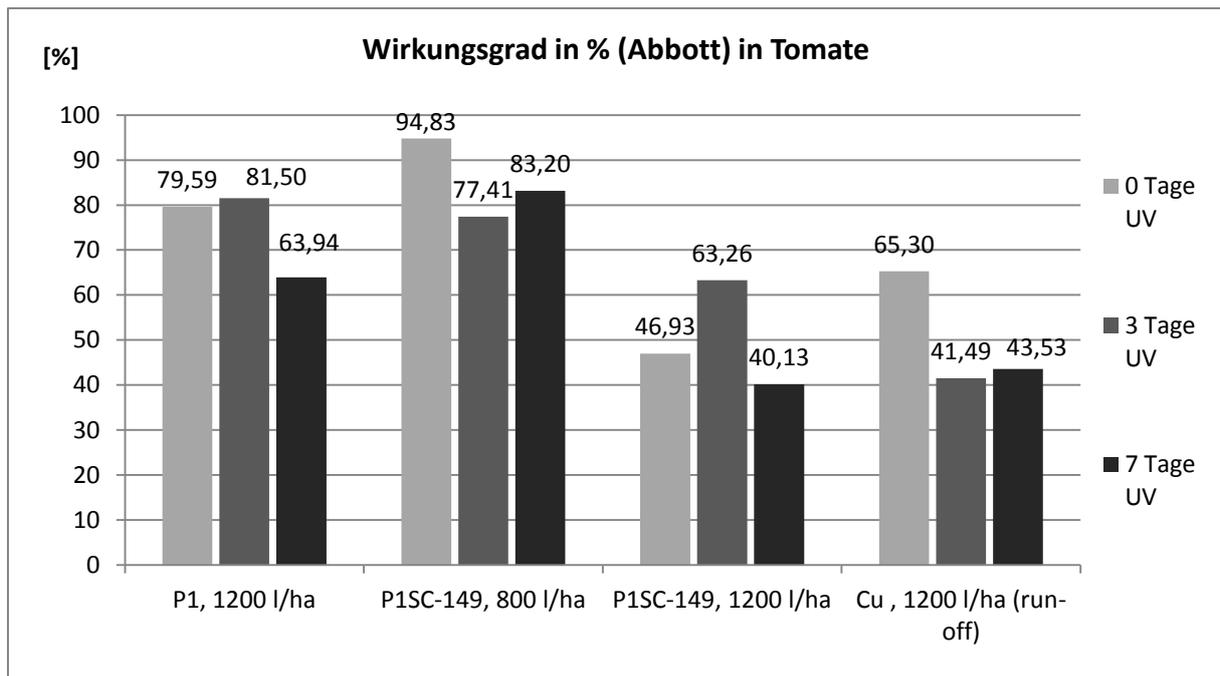


Abbildung 6: WG von P1SC-149 (2 % w/v) bei verschiedenen Aufwandmengen (800 L/ha, 1200 L/ha, Applikationsanlage) gegen *P. infestans* im Vergleich zum Rohextrakt und Cuprozin-Progress, mit UV-Behandlung: 0 Tage, 3 Tage und 7 Tage UV-Strahlung, Klimaraum.

Im Test verschiedener Aufwandmengen (Applikationsanlage) zeigte sich, dass die Formulierung P1SC-149 bei 800 L/ha deutlich besser wirkte als bei 1200 L/ha (entsprach run-off). Dies zeigte sich in allen drei UV-Varianten (0-3-7 Tage UV) (Abbildung 6).

Es wurden in Tomate noch 3 weitere SC-Formulierungen (P1SC-159, 160 und 161) mit 800 L/ha Aufwandmenge auf UV-Beständigkeit gegen den Kupferstandard geprüft (Abbildung 7 u. 8).

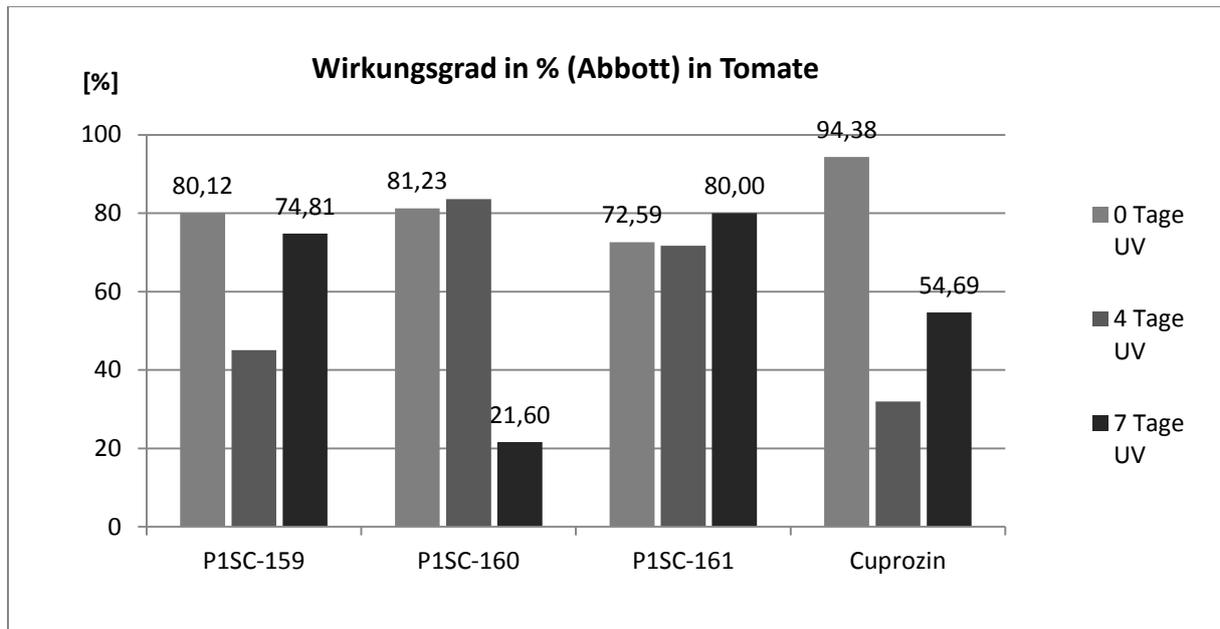


Abbildung 7: WG von PISC-159 bis 161 (2 % w/v) bei 800 L/ha Aufwandmenge (Schachtner Applikationsanlage) gegen *P. infestans* im Vergleich zum Rohextrakt und Cuprozin-Progress; 0 Tage, 4 Tage und 7 Tage UV-Strahlung, Klimaraum.

In diesem UV-Test war die Formulierung PISC-161 in der Wirksamkeit über die Zeit bis 7 dpa am stabilsten. Die Anfangswirkungen (kein UV) der Süßholzformulierungen lagen in diesem Versuch bei 70 - 80 %. Kupfer erreichte nach 3 und 7 Tagen Bestrahlung einen geringeren WG als zu Beginn des Versuches, als ca. 94 % WG erreicht wurden.

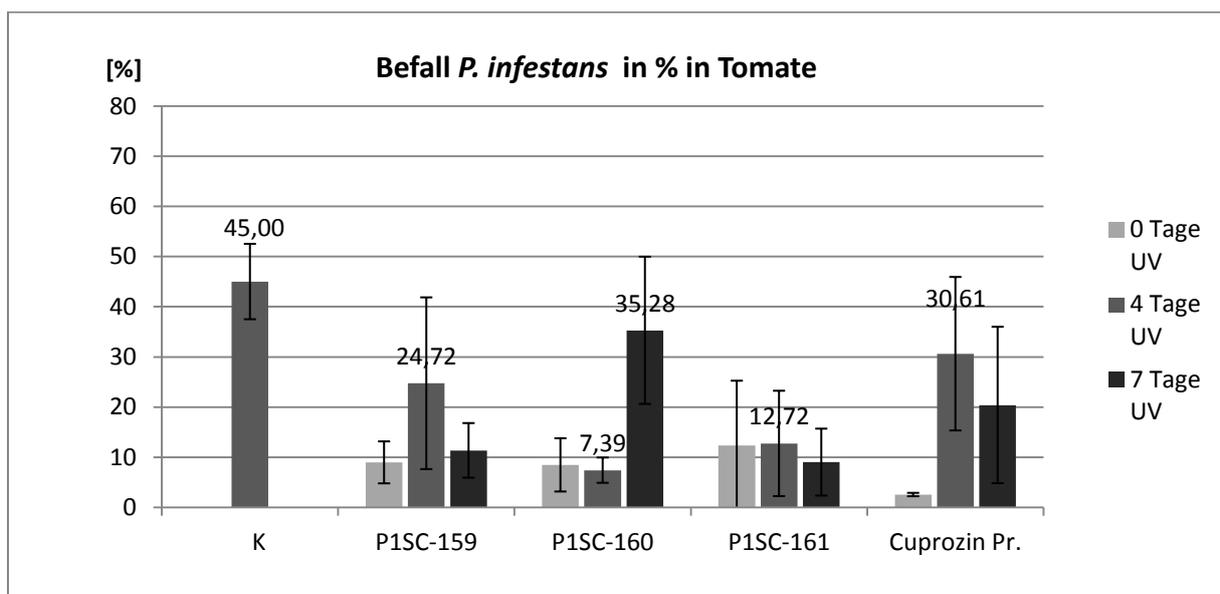


Abbildung 8: Befall von Tomate mit *P. infestans* nach Behandlung von PISC-159 bis 161 (2 % w/v) bei 800 L/ha Aufwandmenge (Applikationsanlage) im Vergleich zu Cuprozin-Progress; 0 Tage, 4 Tage und 7 Tage UV-Strahlung, Kontrolle gemittelt, Klimaraum.

4.4 Wirksamkeitsprüfung einer ausgewählten Formulierung (Anwendung Applikationsanlage) im Semifreiland 2013

Projektjahr 05-2013 bis 12-2013: Versuch in Tomate im Semifreiland, Witterungseinflüsse

Mit der bereits unter Standardbedingungen getesteten Formulierung P1SC-149 wurde im Projektjahr 2013 ein Versuch im Semifreiland durchgeführt, um diese Formulierung auch unter natürlichen Einflussgrößen wie Besonnung und Regen zu prüfen. In weiteren Varianten waren der Rohextrakt und Cuprozin-Progress vertreten.

Alle Versuchsglieder wurden mit der Applikationsanlage (Schachtner) behandelt. Einen Tag vor der Infektion wurden alle Versuchspflanzen zum Abtrocknen etwaiger Blattnässe und zum Schutz vor weiteren Regenereignissen über Nacht in einen Folientunnel gestellt. Die Infektion und Inkubation fand wie unter den Punkten 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben, am folgenden Tag im Klimaraum, statt.

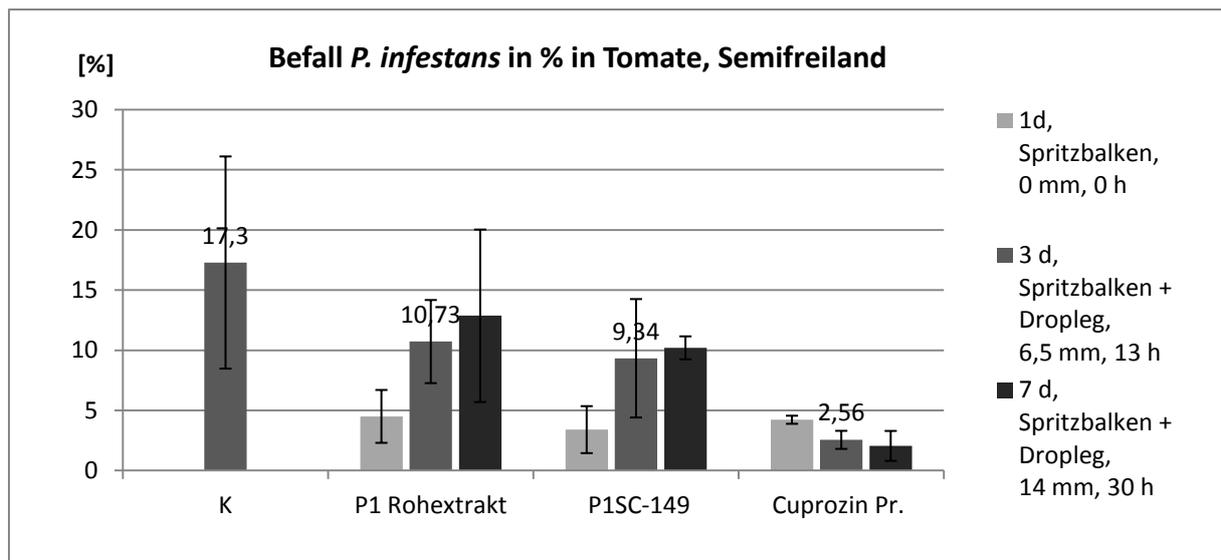


Abbildung 9: Befall von Tomate mit *P. infestans* nach Behandlung von P1SC-149 (2 % w/v) und P1 (2 % w/v) (Applikationsanlage) im Vergleich zu Cuprozin-Progress (0,2 % w/v): 0 Tage, 3 Tage und 7 Tage im Semifreiland, Kontrolle gemittelt, Applikationsart, Regen bzw. Sonneneignisse s. Tabelle 5.

Die Einflussgrößen (Sonne, Regen) und die Behandlungsvarianten in diesem Versuch im Semifreiland mit der Formulierung P1SC-149 sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Versuch in Tomate/Semifreiland, Wetterereignisse und Behandlungsvarianten

dpa*	Regen/Sonne	Behandlungsmittel	Applikationsvarianten
1 d	0 mm Regen, 0 h Sonne	Kontrolle Wasser, P1, PISC-149 , Cuprozin-Progress	Spritzbalken
3 d	6,5 mm Regen, 13 h Sonne	Kontrolle Wasser, P1 , PISC-149 , Cuprozin-Progress	Spritzbalken + Dropleg
7 d	14 mm Regen, 30 h Sonne	Kontrolle Wasser, P1 , PISC-149 , Cuprozin-Progress	Spritzbalken + Dropleg

* gemeinsame Abschlussinfektion in Tagen nach Behandlung (dpa), Konzentrationsangaben
 Behandlungsmittel: 2 % w/v, Cuprozin-Progress: 0,2 % w/v.

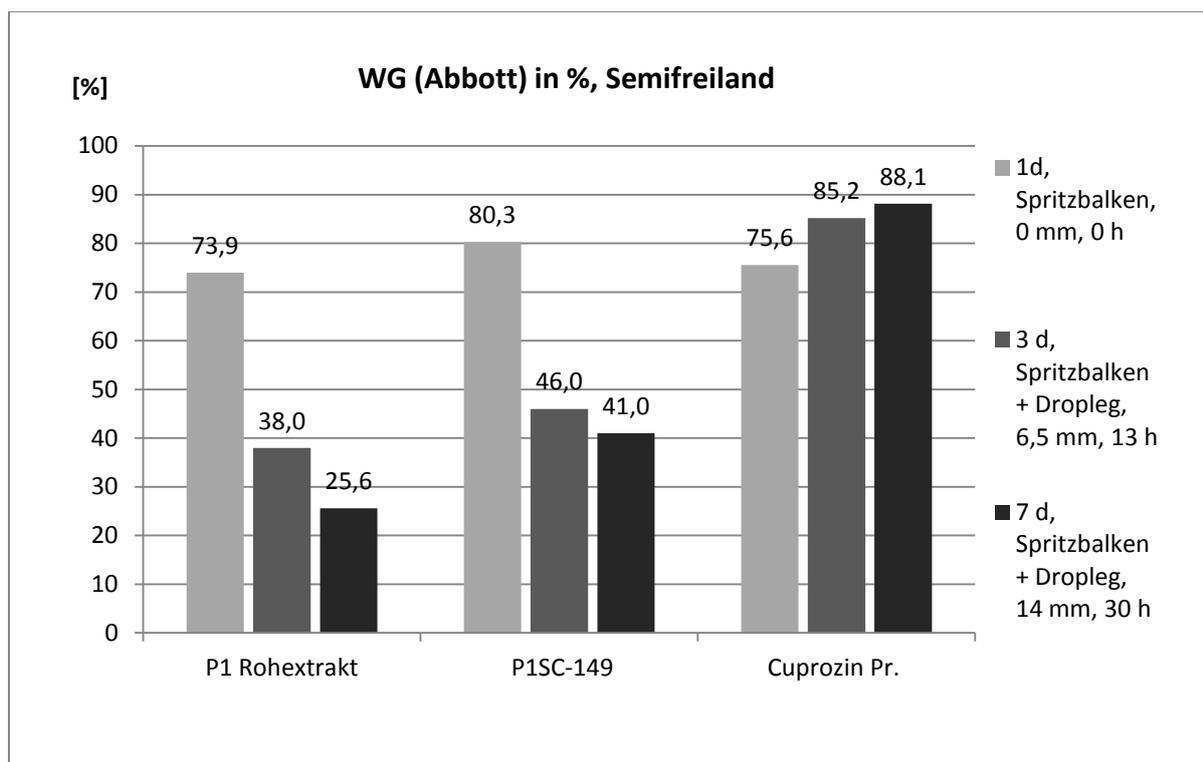


Abbildung 10: WG [%] im Semifreiland nach Behandlung von Tomaten mit PISC-159 (2 % w/v) und Infektion mit *P. infestans* im Vergleich zu Cuprozin-Progress (0,2 % w/v) und Rohextrakt P1 (2 % w/v), (Applikationsanlage).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei P1 und der Formulierung PISC-149 ca. 40 - 50 % Rückgang im WG bereits bei 6 mm Regen (ohne direkte Sonneneinstrahlung) zu verzeichnen war (Abbildung 10, 3 d). Die Kupfervariante blieb bei 14 mm Regen und 30 h

Sonne unverändert stabil in der Wirkung (Abbildung 9, Cuprozin 7 d). Insgesamt war der Befall in den Kontrollen nur gering (Abbildung 9). Der Süßholzextrakt P1 sowie die Süßholzformulierung P1SC-149 zeigten auch nach einer Woche mit 14 mm Regen und 30 Sonnenstunden noch ca. 50 % Wirkung (Abbildung 10). Dabei ließ sich die Formulierung in ihrer Wirksamkeit nicht sehr deutlich von der Wirkung des Rohextraktes P1 unterscheiden.

4.5 Direkte fungizide Wirkung von P1-Extrakt und Fraktionen:

Tabelle 6: Infektionsfähigkeit von Süßholz-Extrakt behandelten Mehltau-Sporangien in Gurke

Versuch Nr. G 7	Kontrolle H ₂ O, Infektionsstellen [%]	Süßholz P1 (3 % w/v), Infektionsstellen [%]
Wiederholung		
A	100	10
B	100	30
C	40	50
D	80	10
E	70	40
Mittelwert [%]	78	28
STABW [%]	24,90	17,89
Wirkungsgrad [%] ABBOTT	-	64,12

Infektion nach Resuspension der Sporangien von Blättern von 3 behandelten infizierten Pflanzen je Variante und erneuter Applikation dieser Inokuli auf 5 x 6 Bs mit 3 Inokulationsstellen, n_{Bs} = 5 x 18 je Variante, N = 5 Pflanzen/Variante, Methode: Blattscheiben Test Typ 1.

Gurke/*P. cubensis* in vivo:

Dieser Infektionstest mit behandelten Sporangien auf Gurke (s. Punkte 3.3.1, 3.3.3 und 3.3.5) gab Auskunft darüber, dass eine starke direkte fungizide Wirkung des P1-Extraktes (3 % w/v) auf Sporangien von *P. cubensis* vorhanden war, wenn eine Applikation des Mittels auf die Sporulationsherde von infizierten Pflanzen vorgenommen wurde. Auch wenn es sich hier um

einen ersten Versuch handelt, zeigten die Ergebnisse jedoch sehr deutlich, dass so behandelte Sporangien zu einem hohen Prozentsatz nicht mehr infektiös sind (Tabelle 6).

Es zeigte sich auch, dass ein gewisser Teil der Sporangien durch P1-Applikation offenbar nicht abgetötet werden konnte (in der Zeit bis zur Abtrocknung des Belages nach Applikation von P1). Es kam in diesem Test im Mittel bei 28 % der Inokulationsstellen, die auf unbehandelten Blattscheiben mit den P1-behandelten Sporangien infiziert wurden, zu einer Befallsentwicklung (Tabelle 6). Dies entsprach einem WG von 64 %.

P. infestans: Wirksame Konzentrationen von P1 und Fraktionen *in vitro*:

Mikroskopische Assays zum Schlupfverhalten von Zoosporen aus Sporangien, die in P1 bzw. Fraktionen inkubiert waren und nach 24 h mit Evans-Blau gefärbt wurden, zeigten, dass es eine konzentrationsabhängige direkte Wirkung auf die Sporangien *in vitro* gibt. In Versuchen mit dem Rohextrakt P1 und Fraktionen konnten Konzentrationen ermittelt werden, bei denen der Schlupf wirkungsvoll unterdrückt wurde. Die minimale Hemmkonzentration lag für *P. infestans* bei ca. 0,04 % w/v für ethanolische Soxhlet-Extrakte (P1) (Abbildung 11). Die absoluten Gehalte wirksamer Flavonoide sind für diese P1 Rohextrakte in Tabelle 7 aufgeführt.

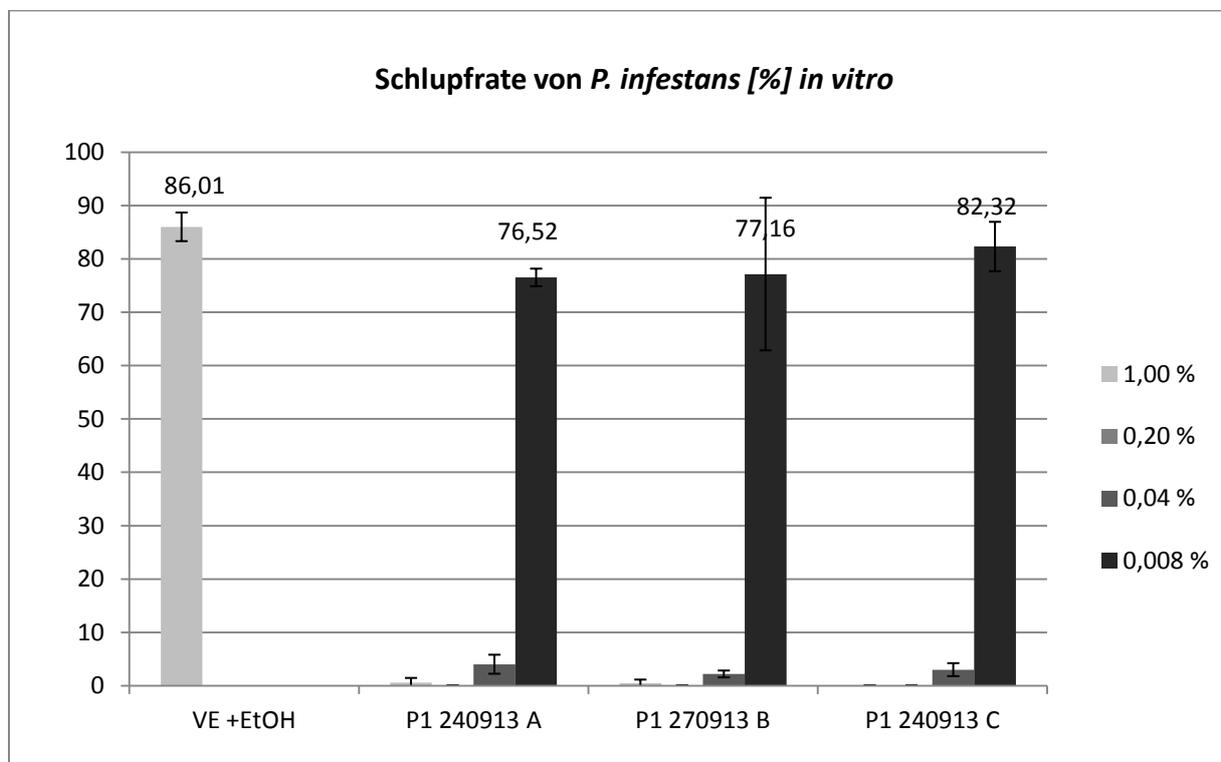


Abbildung 11: Schlupftest mit Sporangien, behandelt in Lösungen von P1 von 0,008 % bis 1,0 % w/v, 24 h 10 °C, Auswertung bei RT, > 100 Sporangien je Variante und Konz. in Doppelbestimmung, 240913 A und C sowie 270913 B sind Chargennummern.

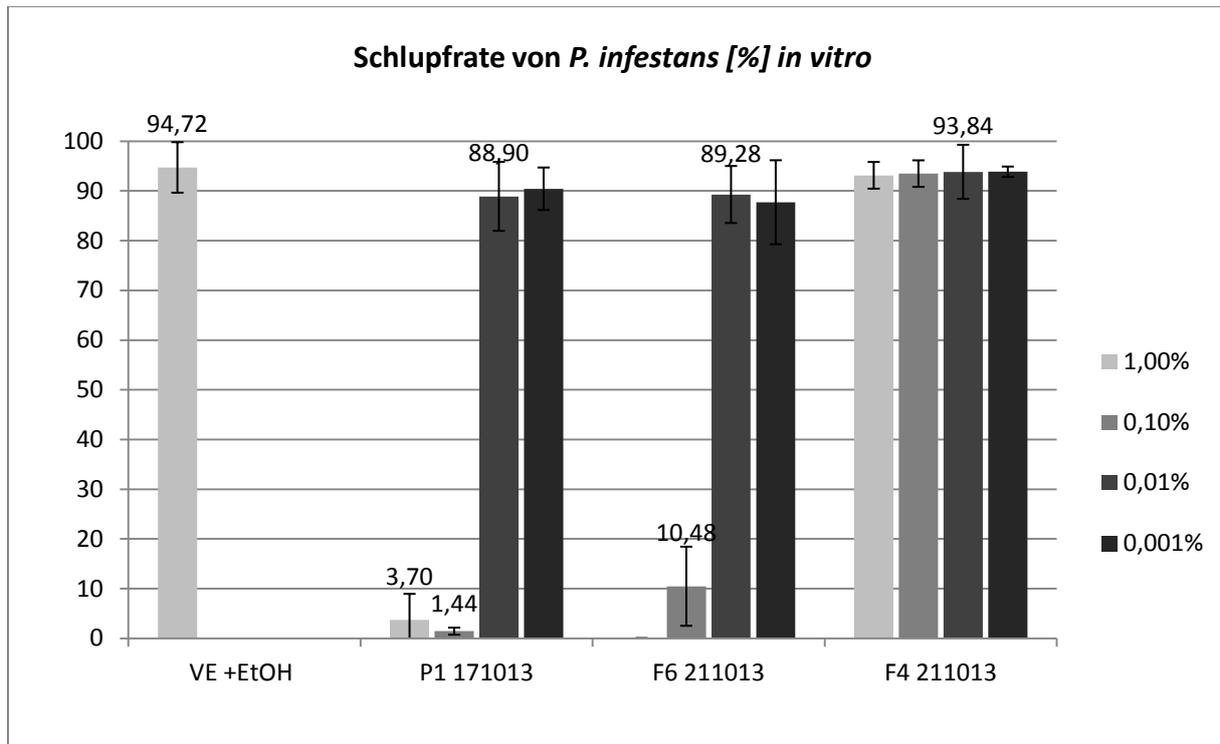


Abbildung 12: Schlupftest mit Sporangien, inkubiert in Lösungen von P1, Fraktion 6 (F6) und Fraktion 4 (F4): 0,001 % bis 1,0 % w/v, Inkubation 24 h bei ca. 10 °C, Auswertung bei RT, > 100 Sporangien je Konzentration und Variante, Doppelbestimmung. 171013 und 211013 sind Chargennummern.

Bei < 0,01 % w/v (Abbildung 12) trat bei Fraktion 6, sowie bei P1, keine Wirkung mehr auf. Fraktion 4 hatte *in vitro* keine Wirkung in den getesteten Konzentrationen.

Von den extrapolierten Werten für die Konzentrationsreihe (Tabelle 8) im *in vitro* Schlupftest ist ableitbar, dass ca. 4 µg/ml wirksame Inhaltsstoffe (Flavonoide) in 0,01 % Fraktion 6 w/v noch nicht ausreichte, jedoch ca. 40 µg/ml dieser Polyphenole in 0,1 % w/v zu einer nahezu vollständigen Hemmung im Schlupf von *P. infestans* Zoosporen geführt haben.

Desweiteren konnte auch gezeigt werden, dass bei Fraktion 4 keine Schlupfhemmung bis zu einer Konzentration von 1 % eintrat (Tabelle 8). Um die minimale Hemmkonzentration noch genauer bestimmen zu können, müssten weitere Versuche mit weiter abgestuften Konzentrationen durchgeführt werden.

Tabelle 7: Gehalte an Flavonoide in P1-Extrakten nach Soxhlet-Extraktion, 20 g / 8 h in EtOH

<i>G. glabra</i> Extrakt: HERBA	2 %-iger Extrakt [mg/ml]	Konz. in % w/v	Gehalt in [mg/ml]	Gehalt in [mg/ml]	Gehalt in [mg/ml]	Gehalt in [mg/ml]
			Pinocembrin	Licoflavanon	Glabranin	Summe
P1	240913 A	75	15,744	15,458	7,564	38,766
P1	240913 B	100	16,582	16,126	7,802	40,509
P1	270913 MP	100	15,672	15,843	7,349	38,864

Ernte Süßholz: A und B: 2010, MP: 2013, Herstellung Extrakte: 09-2013, HPLC: 10-2013 (J. Treutwein).

Tabelle 8: Wirksame Inhaltsstoffe von P1 und der Fraktionen (F) 4, 5, 6 (*G. glabra*, HERBA)

Extrakte	Charge	Summe: Pinocembrin, Licoflavanon & Glabranin in [µg/ml] bei				sichere fungizide Wirkung <i>in vitro</i> bei		
		2 %	1 %	0,04 %	0,008 %	1,0 %	0,04 %	0,008 %
P1	240913 A	1034	<i>517,0</i>	20,68	<i>4,136</i>	Ja	Ja	Nein
P1	240913 B	810	<i>405,0</i>	16,20	<i>3,240</i>	Ja	Ja	Nein
P1	270913	777	<i>388,5</i>	15,54	<i>3,108</i>	Ja	Ja	Nein
Fraktionen von P1 Ch. 171013)		Summe: Pinocembrin, Licoflavanon & Glabranin in [µg/ml] bei				sichere fungizide Wirkung <i>in vitro</i> bei		
		2 %	1 %	0,1 %	0,01 %	1,0 %	0,1 %	0,01 %
F6	211013	*832	<i>416,0</i>	41,60	<i>4,160</i>	Ja	Ja	Nein
F5	211013	1	<i>0,5</i>	<i>0,05</i>	<i>0,005</i>	Nein	Nein	Nein
F4	211013	10	<i>5,0</i>	<i>0,50</i>	<i>0,050</i>	Nein	Nein	Nein

Auf Pinocembrin* entfällt hier ein Anteil von 50,7 % an der Summe der wirksamen Flavonoide, # Schlupftest in 2-fach Zählung in 24-Well Platten, 800 µl Volumen je Well, ein Ansatz, Inkubation ca.10 °C, Auswertung bei RT, Werte für 2 % w/v gemessen mit HPLC, *kursive* Werte < 1 % w/v im Test extrapoliert (Konzentrations-Reihe, 0,2 % nicht gezeigt), fett gedruckt: kleinste wirksame Konzentration mit fungizider Wirkung *in vitro*, HPLC (J. Treutwein).

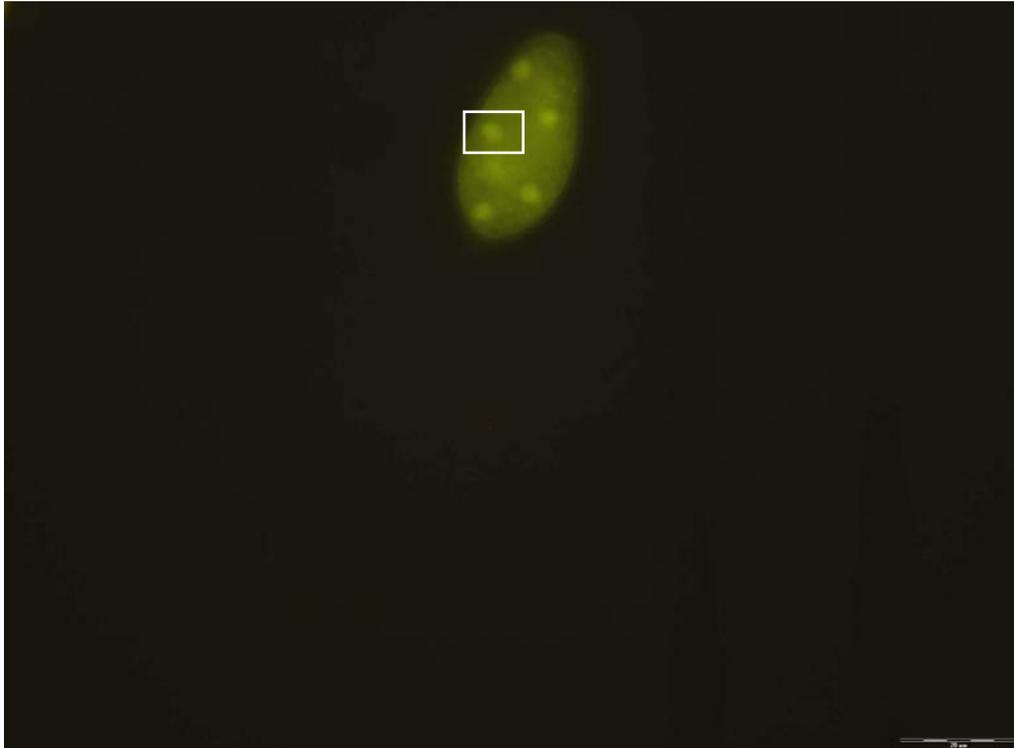


Abbildung 13: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme von Sporangien von *P. infestans* nach 2,5 h Behandlung mit Wasser (8 °C), Blau-Exzitation und Färbung mit Acridin-Orange 1:1000, Vergr. 40 x 10, Maßstab 20 µm, weißer Rahmen: fortgeschrittene Zoosporenreifung (runde Zonen, hellgrüne Kerne).

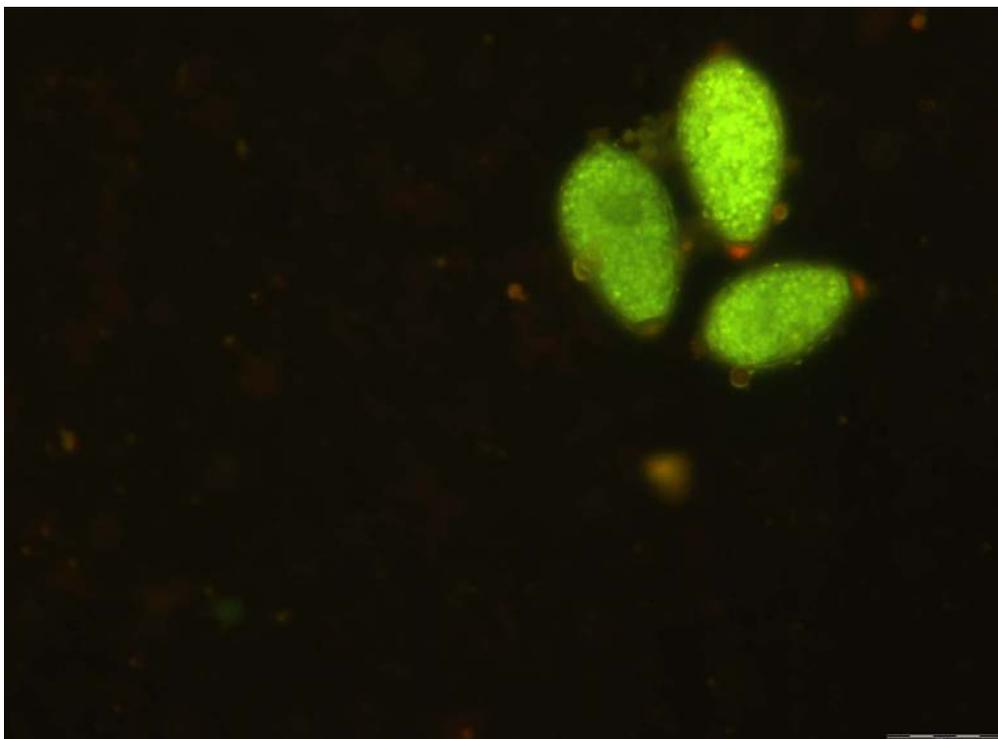


Abbildung 14: Sporangien von *P. infestans* nach 3 h Behandlung mit Fraktion 6 aus Rohextrakt 1 % w/v, ca. 8 °C, Blau-Exzitation und Färbung mit Acridin-Orange 1:1000, Vergr. 40 x 10, Maßstab 20 µm, keine beginnende Zoosporenreifung, Anlagerung von Fraktion 6-Tröpfchen an Sporangien.

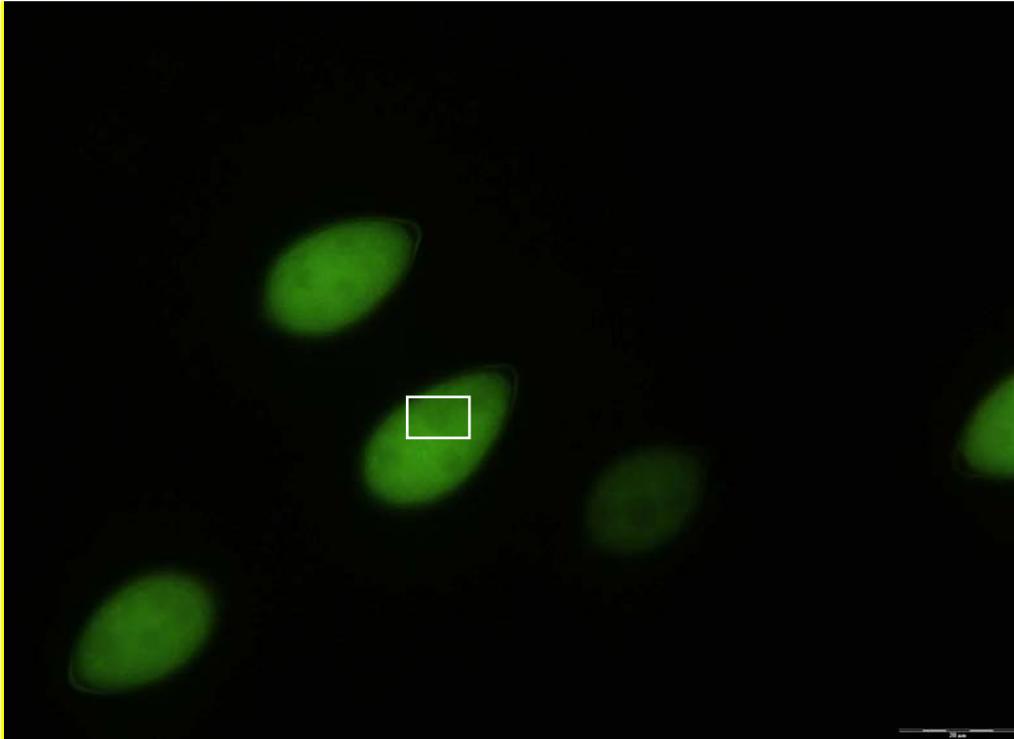


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme von Sporangien von *P. infestans* nach 3,0 h Behandlung mit Fraktion 4 (1 % w/v) aus Extrakt aus *G. glabra*, 8 °C, Blau-Exzitation und Färbung mit Acridin-Orange 1:1000, Vergr. 40 x 10, Maßstab 20 µm, weißer Rahmen: beginnende Zoosporenreifung (runde, dunklere Zonen).

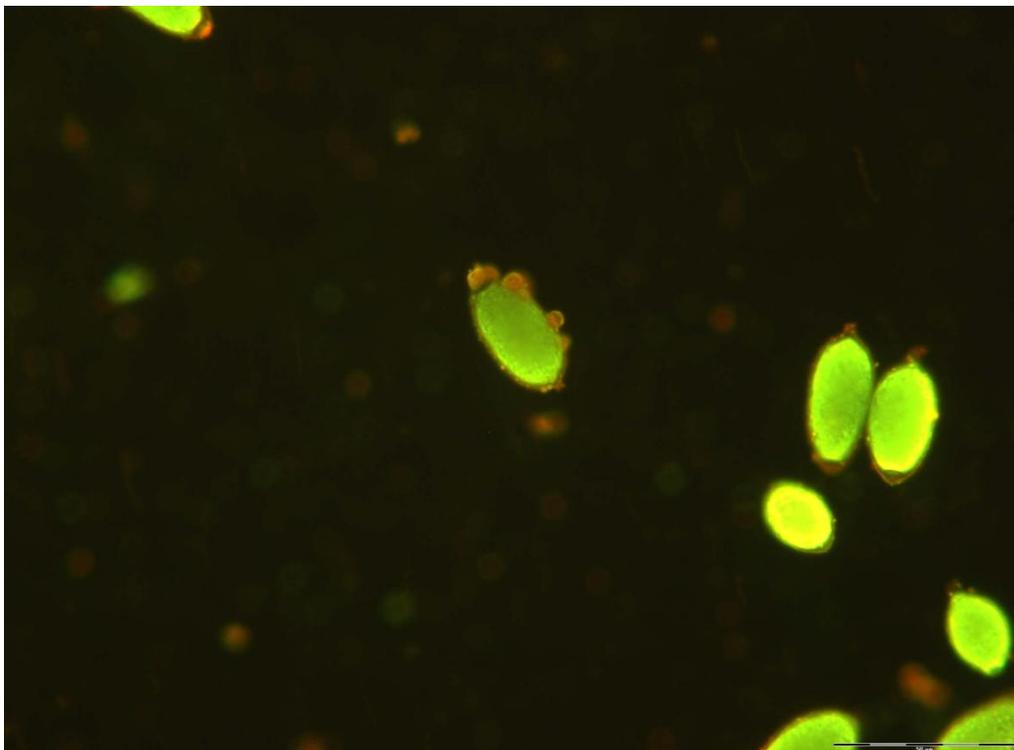


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahme von Sporangien (*P. infestans*) nach 5,5 h Behandlung mit Rohextrakt P1 (1 % w/v) *G. glabra* HERBA, ca. 8 °C, (5 s Belichtung wg. Fluoreszenz löschendem Effekt von P1-Inhaltsstoffen), Färbung mit Acridin-Orange 1:100, Blau-Exzitation, Vergr. 20 x 10, Maßstab 50 µm.

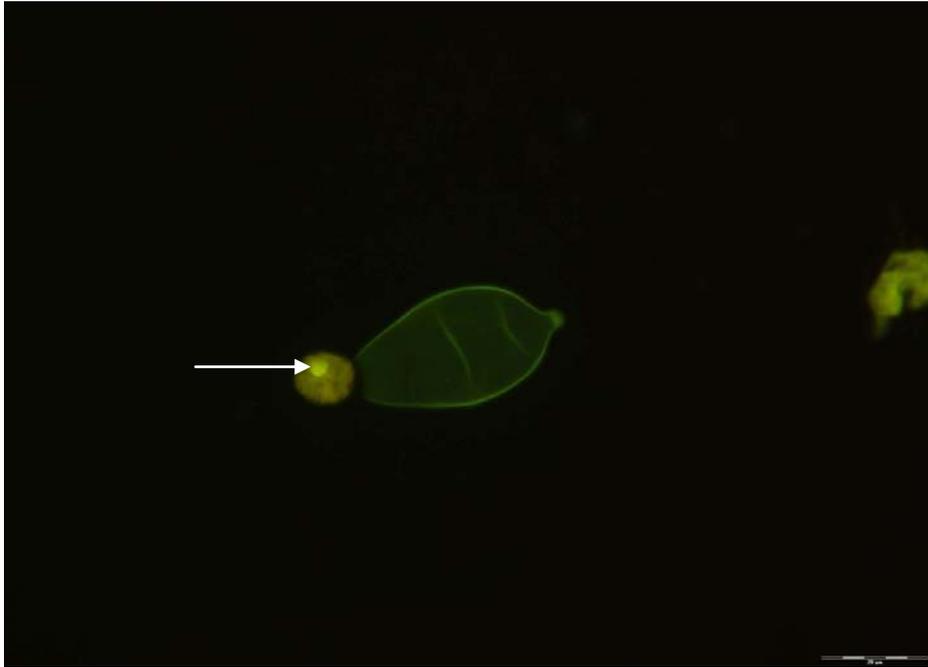
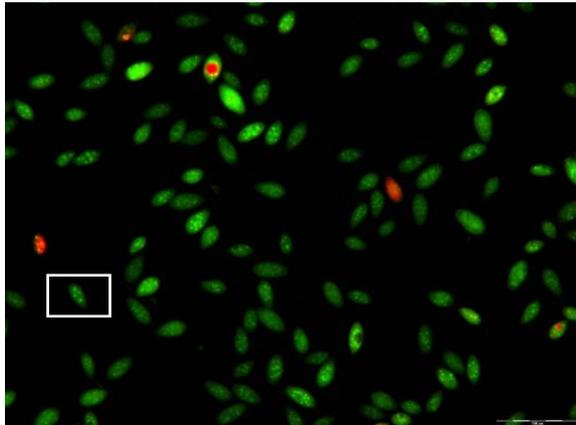
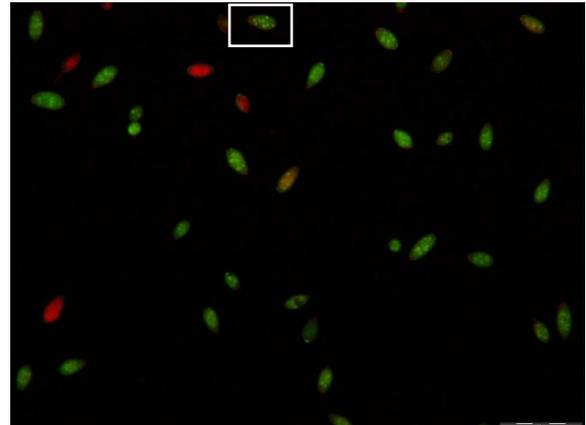


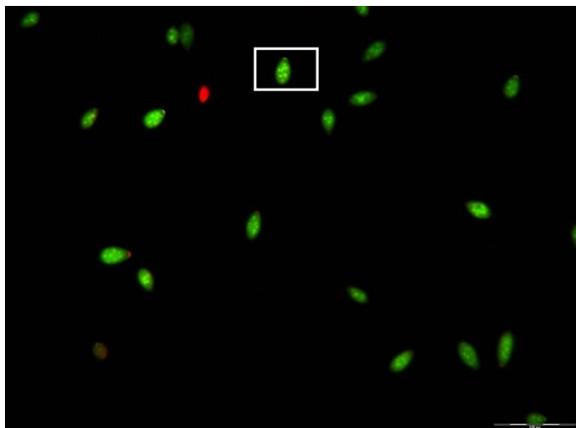
Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopie einer Sporangie von *P. infestans* nach Behandlung mit Wasser (24 h), schlüpfende Zoospore, weißer Pfeil: Kern Zoospore, 8 °C, Färbung mit Acridin-Orange 1:1000, Blau-Exzitation, Vergr. 40 x 10, Maßstab 20 µm.



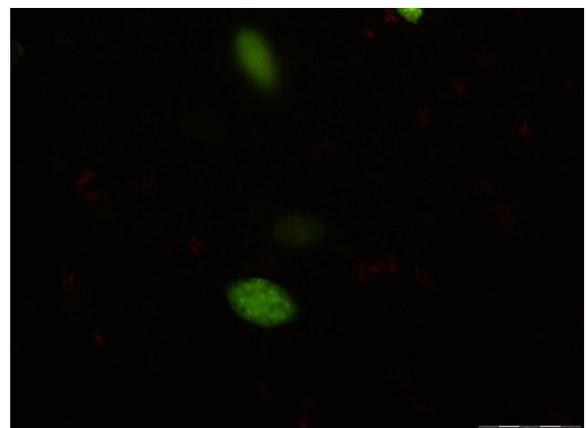
a) Fraktion 4 1 % w/v, 100 μ m, 100 ms, 10 x.



c) K EtOH 1 %, 100 μ m, 100 ms, 10 x.



b) Fraktion 5 1 % w/v, 100 μ m, 50 ms, 10 x.



d) Fraktion 6 1 % w/v, 50 μ m, 20 ms, 25x.

Abbildung 18: Sporangien von *P. infestans* in Fraktionen 4 bis 6 aus *G. glabra* a) bis c) runde, hell-grün leuchtende Bereiche = sichtbare Zoosporenkerne (weiße Rahmen), d) Fraktion 6, keine reifenden Zoosporen erkennbar, inneres diffus granular, schwächer fluoreszierend; 3 h Behandlung in Mitteln bei 8 °C.

Mikroskopische Studien (Abbildungen 13 bis 18) haben gezeigt, dass die aktive Fraktion 6 sowie der Rohextrakt eine direkte und vergleichbare Wirkung auf die behandelten Sporangien und die Zoosporentlassung bzw. Zoosporenenreifeung haben.

Fraktion 4 zeigte bei der eingesetzten Konzentration (1% w/v) keine direkte Wirkung (Abbildung 15, 18a). Es kam ebenso wie in der Wasserkontrolle (Abbildung 14 und 18a) zu einer fortschreitenden Zoosporenenreifeung in den behandelten Sporangien. Die heller fluoreszierenden Zonen wurden dabei den zukünftigen Kernen der Zoosporen zugeordnet.

Am deutlichsten waren sie nach 2-3 Stunden in der Wasserkontrolle zu beobachten (Abbildung 13). Eine Zoosporenenreifeung wie bei Fraktion 4 und Wasser konnte für Fraktion 6 in den angewendeten Konzentrationen nicht im fluoreszenz-mikroskopischen Bild dargestellt werden (1% w/v, 3 h Behandlung).

Da Süßholzextrakt einen starken Fluoreszenz unterdrückenden Effekt hat, konnten P1-behandelte Sporangien bisweilen erst nach sekundenlanger Belichtung (Blauexzitation) im Bild dargestellt werden. Aussagen über eine mögliche Hemmung der Zoosporenenreifeung

(fungistatischer Effekt) bei P1-behandelten Sporangien (1 % w/v, 3 h) und nach Acridin Orange-Färbung konnten daher nicht getroffen werden.

4.5 Wirksamkeit von P1 und Fraktionen *ad planta* : EC₅₀

Mit den *ad planta* aktiven Fraktionen 4 und 6 sowie dem Rohextrakt wurden Versuche zur Ermittlung der EC₅₀ (effektive Konzentration mit 50 % Wirkungsgrad) durchgeführt.

In Gurke sollten Versuche mit der Fraktion 4 erfolgen, da die Daten zur EC₅₀ von P1 und Fraktion 6 in Gurke bereits bekannt waren.

In Tomate sollte erstmalig für den Rohextrakt eine EC₅₀ Bestimmung erfolgen (Fraktion 6 wurde darüber hinaus ebenso in einem Konzentrationsversuch untersucht (cv. 'Campari'), um hier erste Hinweise zu erlangen.

Die Versuchspflanzen wurden wie in 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben angezogen. Die Versuchsbedingungen sind den Punkten 3.5.1 und 3.5.4 für die jeweiligen Kultivare zu entnehmen.

Infektion und Inkubation sowie Bonitur erfolgte analog der Beschreibungen unter den Punkten 3.2 ff. und 3.3 ff.

Statistik und Berechnungen zur EC erfolgten wie unter 3.6 beschrieben.

4.5.1 Versuche in Gurke/*P. cubensis*: EC₅₀ von Fraktion 4

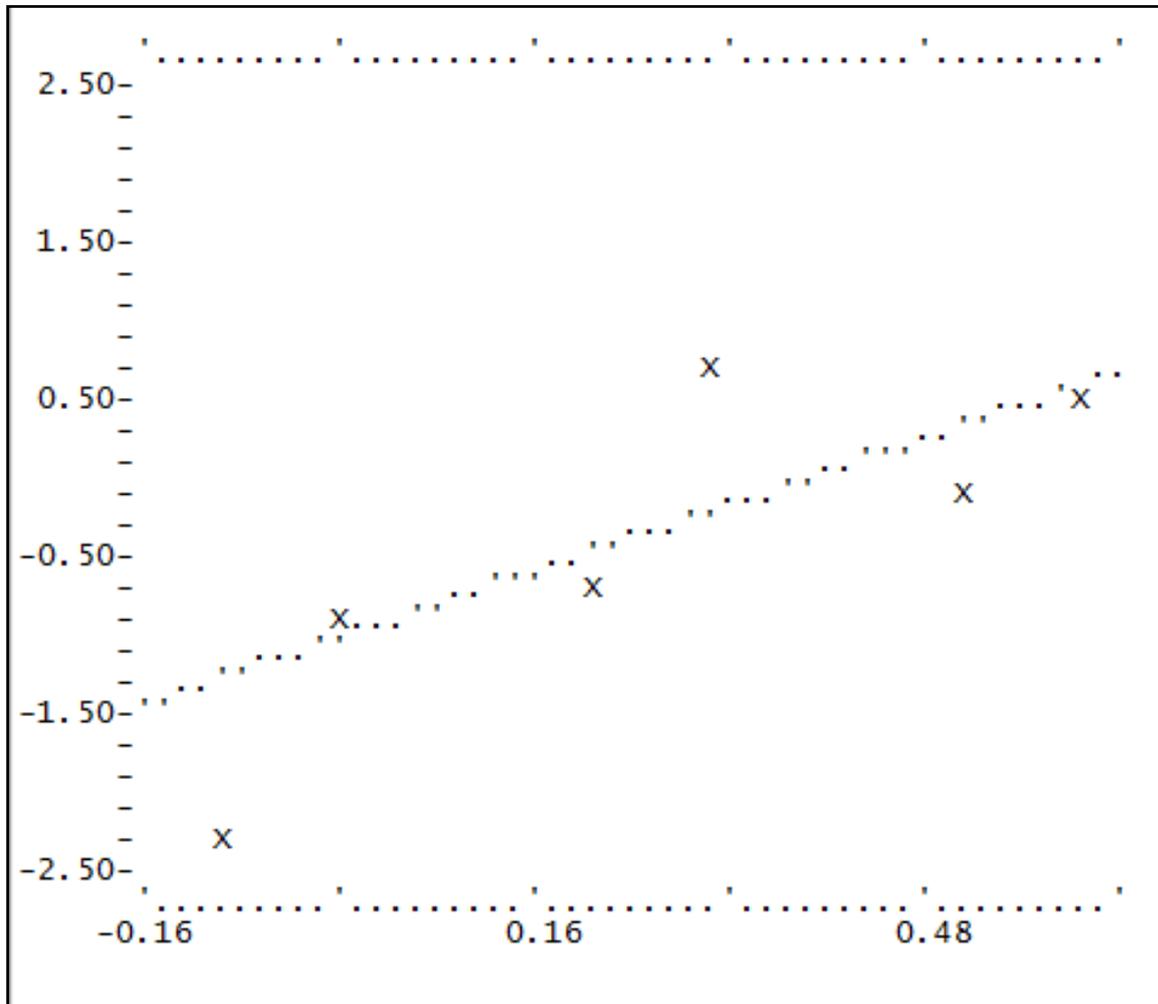


Abbildung 19: Darstellung der Probit-transformierten Daten zur EC₅₀-Berechnung der Wirkung von Fraktion 4 (Terpenoide, Sterole) aus Süßholzextrakt in Gurke/*P. cubensis* (Datensätze aus zwei Versuchen).

Tabelle 9: Versuchsdaten zur Berechnung der EC₅₀ von Fraktion 4 aus Süßholzextrakt in Gurke/*P. cubensis*

Konz. %	0,8	1,0	1,6	2,0	3,2	4,0
WG %	0,98	18,75	22,55	78,44	49,51	66,67
N	6	6	6	4	6	6

N ist Anzahl WDH je Variante im Versuch, WG ist Wirkungsgrad (Abbott), (Datensätze aus zwei Folgeversuchen).

Fraktion 4 zeigte *ad planta* ebenso wie P1 und Fraktion 6 eine deutliche Wirkung, jedoch in höherer Konzentration. Für diese Fraktion 4 (Sterole und Terpenoide) wurden daher ebenso Versuche zur EC₅₀-Bestimmung durchgeführt. Mit Daten aus zwei Konzentrationsversuchen

(Tabelle 9) mit der in Gurke/*P. cubensis* aktiven Fraktion 4 konnte eine EC_{50} von 2,55 % berechnet werden.

4.5.2 Versuche in Tomate/ *P. infestans*: EC_{50} von P1 und Fraktion 6

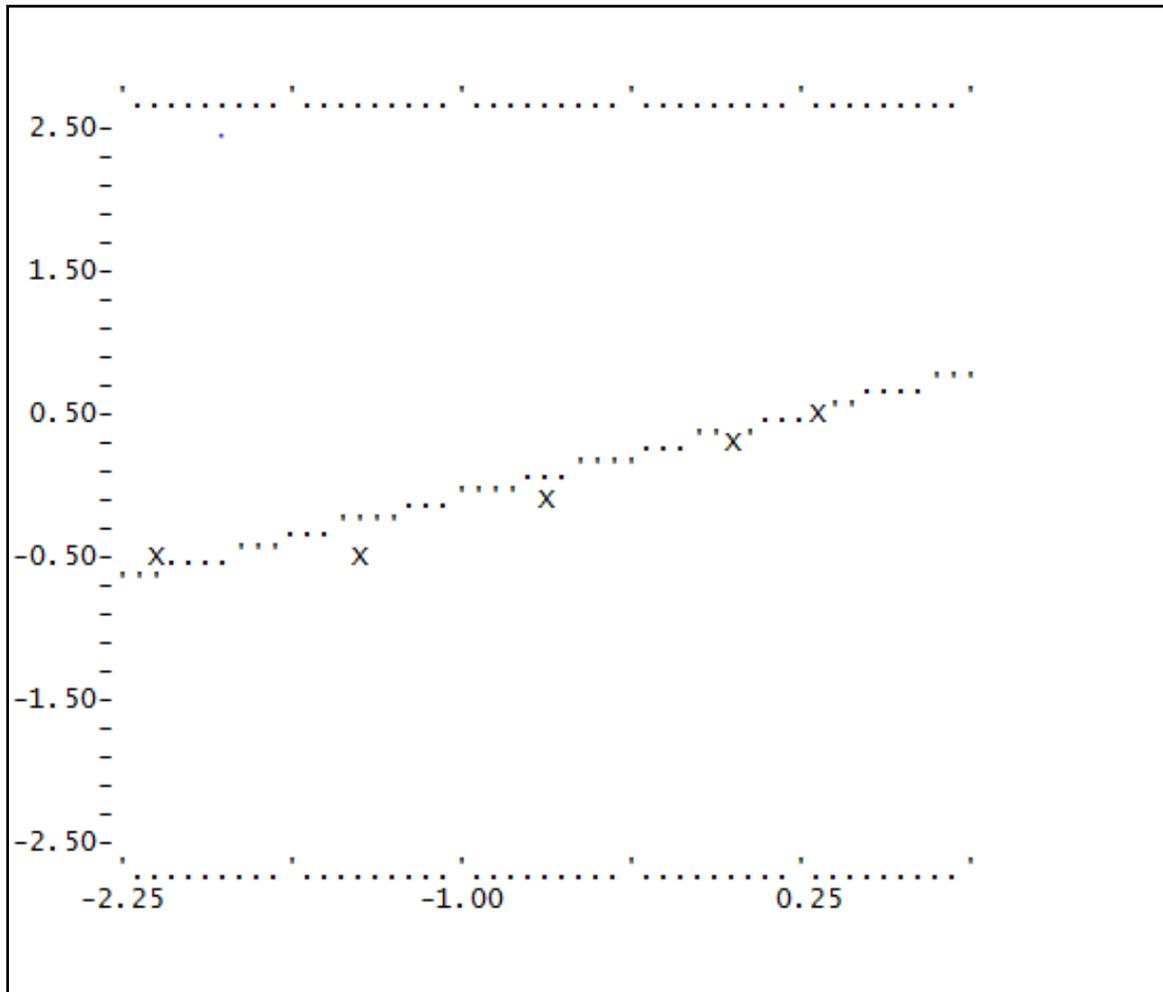


Abbildung 20: Darstellung der Probit-transformierten Daten zur EC_{50} Berechnung der Wirkung von Fraktion 6 aus Süßholzextrakt in Tomate/*P. infestans*.

Tabelle 10: Versuchsdaten zur Berechnung der EC_{50} von F6 in Tomate*/*P. infestans*

Konz. [%]	0,0080	0,0400	0,200	1,000	2,000
WG [%]	33,23	30,28	45,57	64,41	71,58
N	8	8	8	8	8

*'Campari', N ist Anzahl WDH je Variante im Versuch, WG ist Wirkungsgrad (Abbott).

Die Gehalte an wirksamen Inhaltsstoffen von Fraktion 6 über DCM- und über Etherfraktionierung (Fraktionierung siehe 3.7) ergaben für beide Fraktionierungsvarianten keine Unterschiede im Gehalt an wirksamen Inhaltsstoffen (Flavonoide). In Vortests zur EC_{50} Bestimmung wurde eine geeignete Konzentrationsspanne eruiert. Im folgenden Konzentrationsversuch mit Fraktion 6 (über Etherfraktionierung) ergab sich eine effektive Konzentration von 0,185 % mit 50 % Wirkungsgrad im Kultivar 'Campari'.

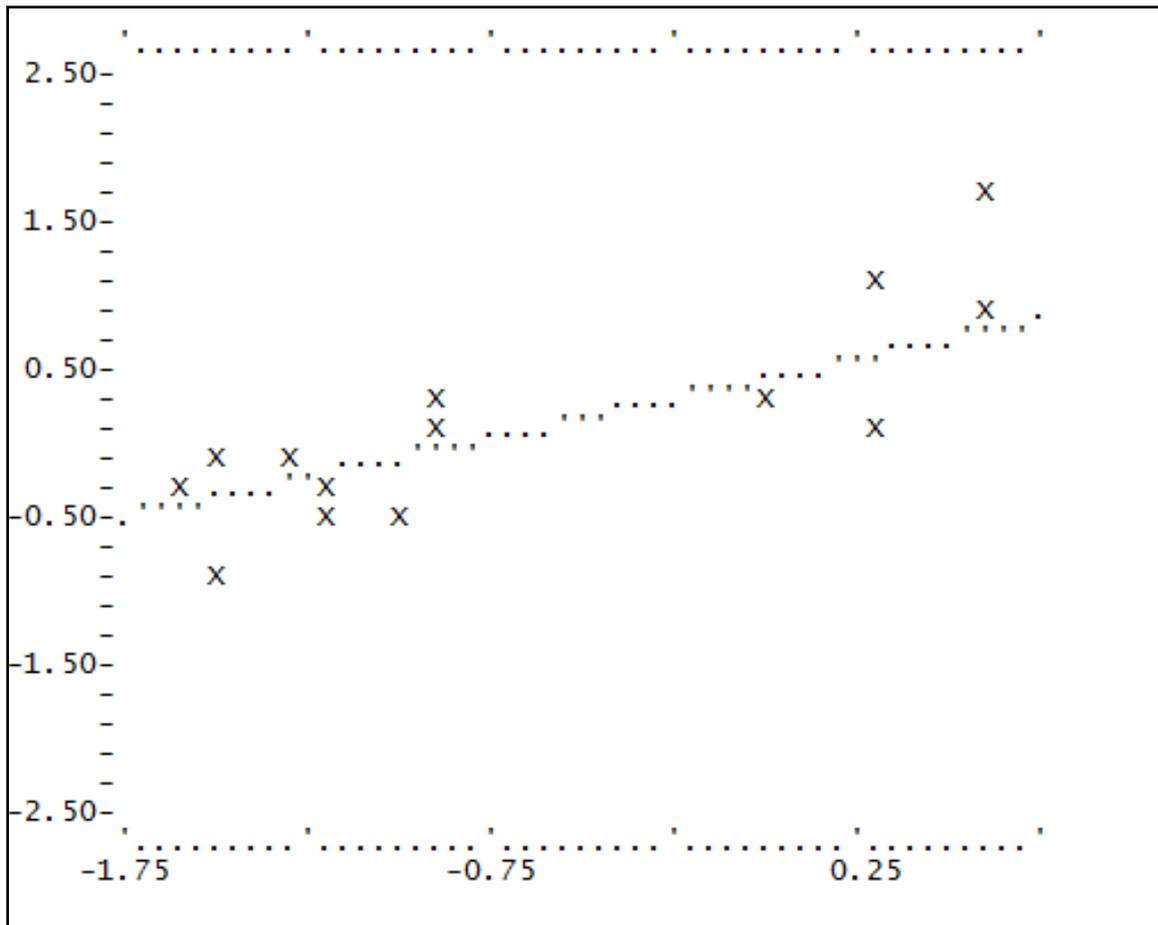


Abbildung 21: Darstellung der Probit-transformierten Daten zur EC_{50} -Berechnung der Wirkung von P1 in Tomate/*P. infestans* (Datensätze aus drei unabhängigen Folgeversuchen).

Tabelle 11: Versuchsdaten zur Berechnung der EC_{50} von Fraktion 6 in Tomate*/*P. infestans*

Konz. [%]	0,0250	0,03125	0,0500	0,0625	0,1000	0,1250	1,000	2,000	4,000
WG [%]	37,39		43,57		31,98		62,13	50,38	
WG [%]		44,30		40,51		60,67		87,22	95,44
WG [%]		15,98		32,26		55,06		54,48	81,24

N = 6 (8) Pflanzen/WDH je Variante im Versuch, drei Folgeversuche, WG ist Wirkungsgrad (Abbott).

Die EC₅₀-Bestimmung des ethanolischen Rohextraktes P1 in Tomate (Sorte 'Minibell') ergab eine Konzentration von 0,187 %. Weitere Versuche zur Absicherung der Daten sind jedoch notwendig.

4.6 Versuche zur indirekten Wirkungsweise nach Extraktbehandlung, Einfluss auf die Photosynthese (F_v/F_m) in Gurke

Die Chlorophyllfluoreszenz von dunkeladaptierten Pflanzen ist ein allgemeiner Stressindikator, der eine Aussage über die Funktionalität des photosynthetischen Systems gibt. Die Chlorophyllfluoreszenz gibt Aufschluss über Störungen im photosynthetischen Geschehen (Stress durch Kälte, Licht, Hitze, Trockenheit, Pathogene etc.).

Gurkenpflanzen wurden mit P1 und den Fraktionen 2 bis 6 behandelt und einen Tag danach mit *P. cubensis* infiziert. Die Auswertung des Befalls erfolgte nach 11 Tagen. Während des Versuchs wurden Messungen der Chlorophyllfluoreszenz mit dem Puls-Amplitude-Modulations-Fluorometer (PAM, Fa. Walz) zum Ende der Dunkelphase durchgeführt. Die Anzucht der Pflanzen und der Versuchsaufbau ist unter den Punkten 3.4.2 sowie 3.5.4 und 3.5.5 beschrieben.

4.6.1 Untersuchungen zu biotischen Faktoren: Pathogeninfektion mit *P. cubensis ad planta*

Im zeitlichen Verlauf der F_v/F_m -Messungen zeigte sich, dass nach Behandlung mit P1, Fraktion 6 und Fraktion 4 der F_v/F_m -Wert nahe am Wert für ungestresste Pflanzen von 0,8 lag. Bei den anderen Fraktionen nahm der Wert dagegen ab dem 6ten bis 7ten Tag nach Inokulation deutlich ab (Abbildung 22).

Trotz eines relativ hohen Befalls bei Fraktion 4 behandelten Gurken (50 %) war der Wert für F_v/F_m (0,76) nur geringfügig niedriger als in den gering befallenen Varianten, die mit P1 und Fraktion 6 behandelt waren, die F_v/F_m -Werte um 0,8 zeigten (Abbildung 23). Die anderen Fraktionen und auch die nicht infizierte Kontrolle fielen bis zu Versuchsende auf Werte unter 0,5 ab.

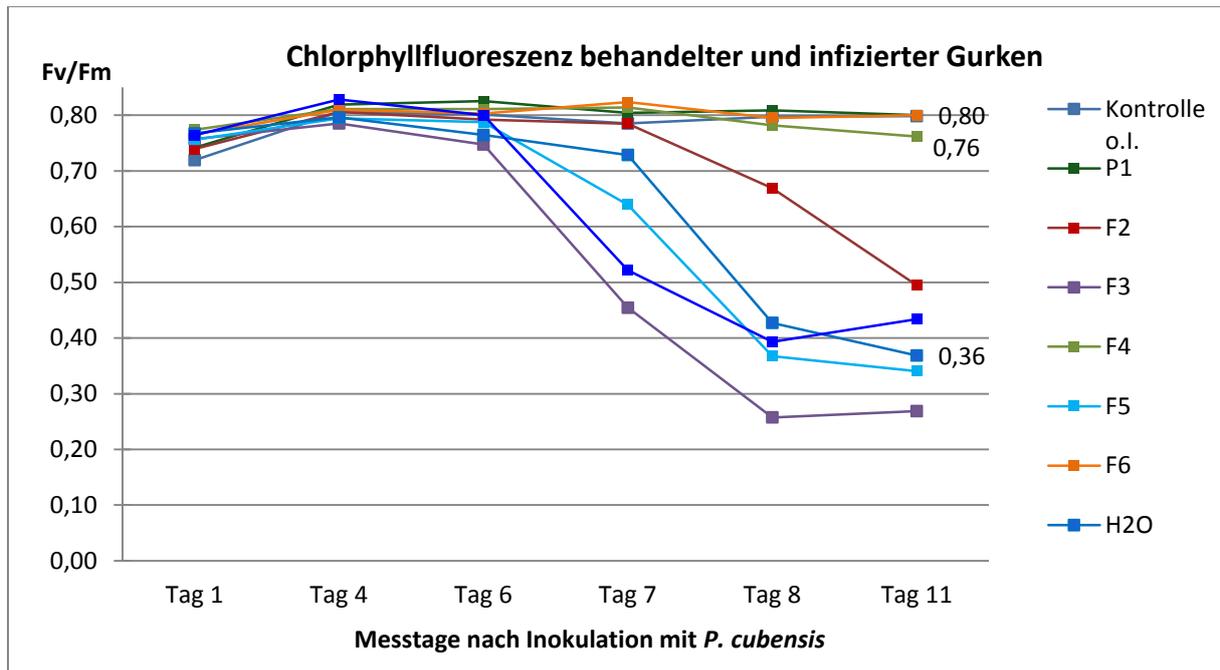


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der F_v/F_m -Messungen protektiv behandelter Gurkenpflanzen (P1 und seine Fraktionen (F)), $N = 3 \times 2$ WDH (24 Messpunkte je Variante), Infektion 1 dpa (*P. cubensis*); Messungen mit PAM-Fluorometer, Fa. Waltz, Germany.

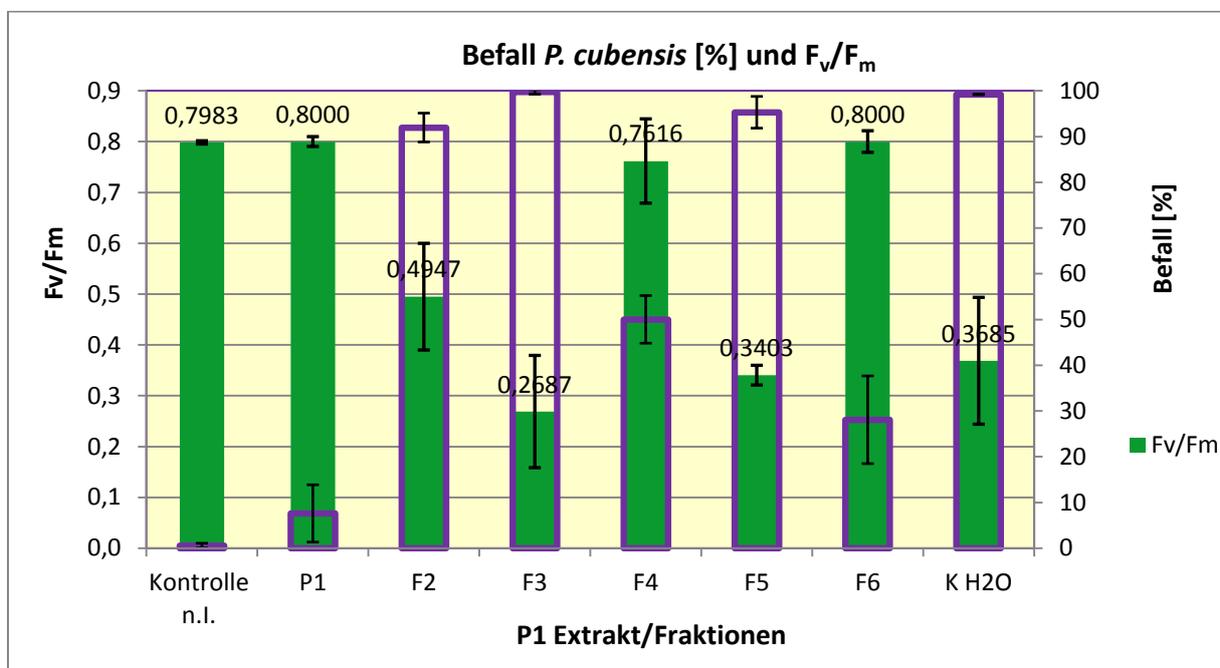


Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der F_v/F_m -Messungen mit der Junior-PAM (Fa. Waltz, Germany) an Tag 11 bei 21 °C, Befall in % in Ganzpflanzen: Rahmen; im Vergleich dazu Chlorophyllfluoreszenz an Tag 11 nach Infektion: grüne Säulen. Messung F_v/F_m mit PAM-Fluorometer, Fa. Waltz Germany.

4.6.2 Untersuchungen zu abiotischen Faktoren: Temperatur und Seneszenz *in vivo*

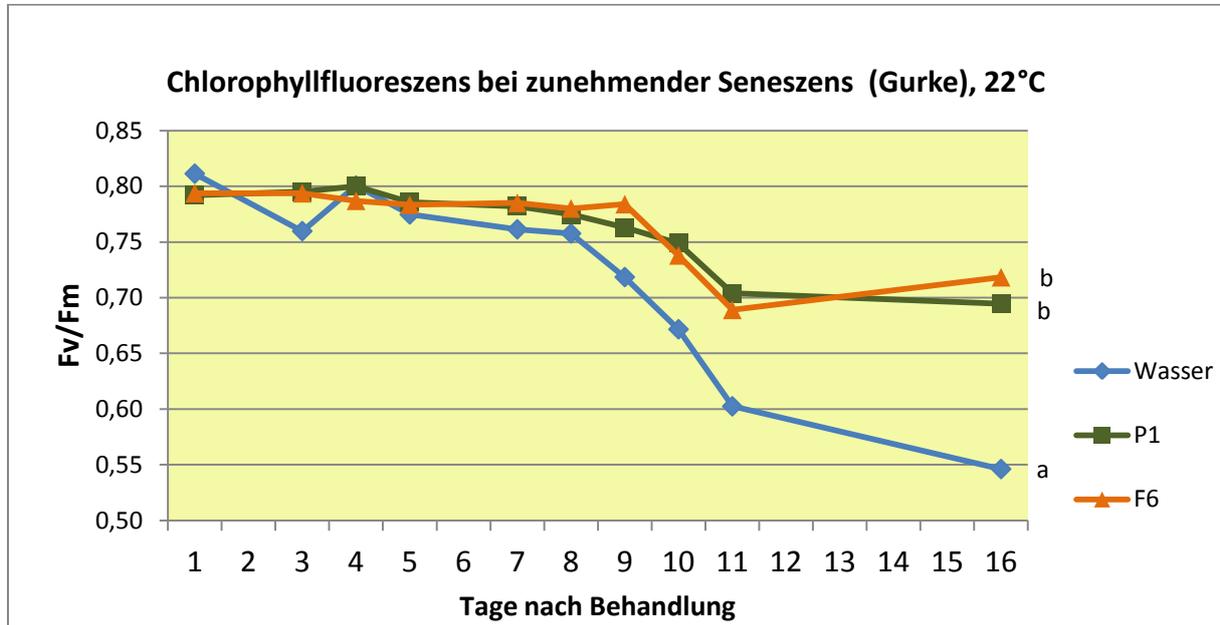


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der F_v/F_m -Messungen an Bs protektiv behandelter Gurkenpflanzen, P1 und Fraktion 6 (F6), über 16 Tage bei 22 °C, N = 5 WDH mit 4 Bs je Pflanze (20 Messpunkte je Variante), PAM-Fluorometer, P1 und Fraktion 6 (b) an Tag 16 21 signifikant verschieden zur Kontrolle (a), Tukey Test: $p < 0,05$ zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$.

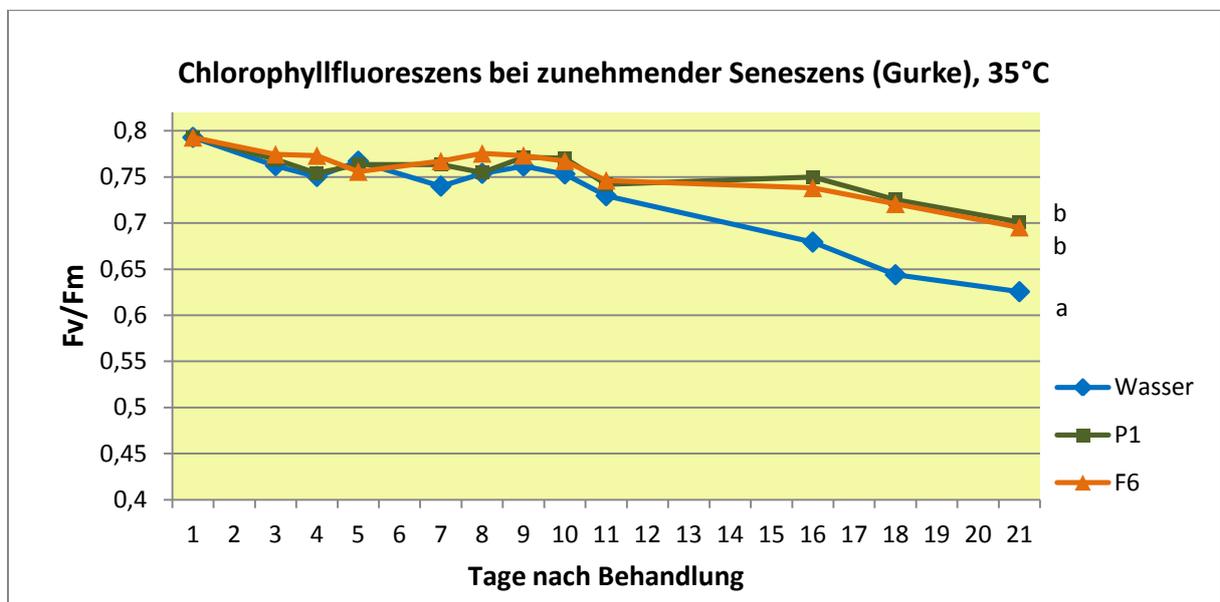


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der F_v/F_m -Messungen an Bs protektiv behandelter Gurkenpflanzen, P1 und Fraktion 6 (F6), über 21 Tage bei 35 °C, N = 5 WDH mit 4 Bs je Pflanze (20 Messpunkte je Variante), PAM-Fluorometer, Fa. Waltz, Germany, P1 und Fraktion 6 (b) an Tag 21 signifikant verschieden zur Kontrolle (a), Tukey Test: $p < 0,05$ zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$.

Im zeitlichen Verlauf der F_v/F_m -Messungen an nicht-infizierten Gurken-Blattscheiben über 16 Tage bei 22 °C (Abbildung 24) und über 21 Tage bei 35 °C (Abbildung 25), zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen P1- und Fraktion 6-Behandlung und der wasserbehandelten Kontrolle. Bei 22°C zeigten P1 und Fraktion 6 einen Abfall von 0,8 auf ca. 0,7 nach 21 Tagen. Die Wasser behandelte Kontrolle fiel hingegen auf einen Wert von ca. 0,55 für F_v/F_m .

Ein ähnliches Bild vermittelten die Ergebnisse bei 35 °C. F_v/F_m fiel im gleichen Zeitraum bei P1 und Fraktion 6 behandelten Bs ebenso nur auf ca. 0,7, bei Wasser behandelten Bs jedoch auf ca. 0,62. Bei beiden Versuchen waren die Unterschiede zwischen P1- und Fraktion 6-Behandlung und der Kontrolle am Versuchsende signifikant (Abbildung 24, 25).

4.7 Untersuchung indirekter Wirkmechanismen:

4.7.1 Qualitative Untersuchung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Applikation von P1/Fraktionen:

Im Allgemeinen gilt H_2O_2 (ROS) auch als eine frühe Antwort (Signal) der Pflanze bei der Aktivierung und Regulierung von Abwehrprozessen, nach Kontakt zu Pathogenen (biotischem Stress) sowie nach abiotischem Stress oder "Wounding". Ebenso durch Kontakt zu Resistenzinduktoren (indirekt wirkende Substanzen) wie z. B. Salizylsäure, BION, beta-Aminobuttersäure (β BABA), DCINA, Milsana. Solche Signalstoffe (z. T. als Signale) bewirken in Pflanzen eine Induktion von Abwehrprozessen, darunter auch einen Anstieg in der H_2O_2 -Produktion (subzellulär) in pflanzlichen Geweben und Zellen/Apoplasten oder im Interstitium. Süßholzwurzelextrakt könnte in die Signalkette dieser Abwehrreaktionen eingreifen und so indirekt induzierend wirken über Auslösung eines "Oxidative Burst". Der Nachweis kann mit einem DAB-Test (Indikatortest) erfolgen.

DAB-Test mit Süßholzwurzelextrakt P1 und Fraktionen:

Zum Zeitpunkt der höchsten Akkumulation von H_2O_2 in Behandlungslösung von Fraktion 6, Fraktion 4 und dem Rohextrakt P1 entwickelte sich zunehmend ein braunes beständiges Präzipitat. Es konnte so gezeigt werden (Abbildung 26), dass im Indikatortest (DAB-Test) an Bs von Gurke nach bis zu 8 h Behandlung eine vermehrte Produktion von H_2O_2 stattfand. Dies zeigte sich in einer deutlichen Braunfärbung der so behandelten Blattscheiben. In Tomate fanden dazu Vorteste statt, die jedoch noch keine eindeutige Aussage für dieses Kultivar zuließen.

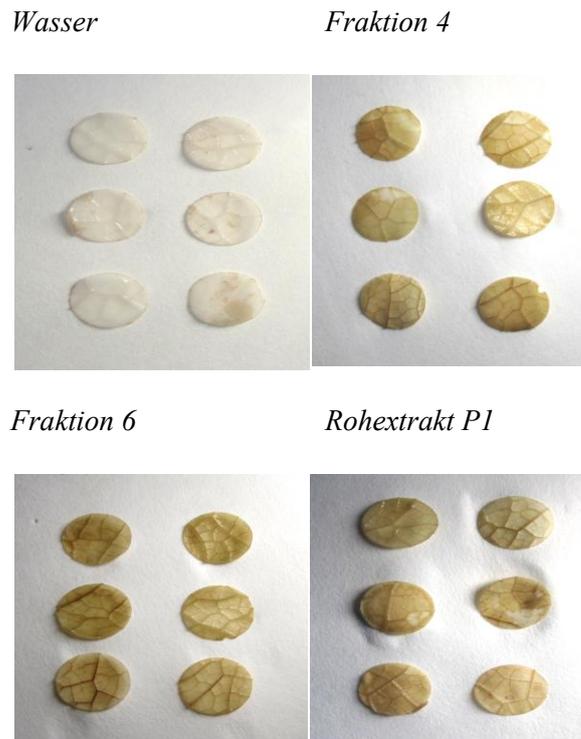


Abbildung 26: DAB-Färbung mit Blattscheiben (Gurke), nach 6 bis 8 Stunden Behandlung mit P1-Extrakt und Fraktionen (3 % w/v, in Suspension) bildete sich eine braune Färbung, Hinweis auf H₂O₂.

4.7.2 Versuche zu ROS mit Radikalfängern nach P1-Behandlung:

Versuche mit Plantacur-E (α -Tocopherol) wurden durchgeführt. Ziel der Versuche war es, mittels des Radikalfängers α -Tocopherol gebildete ROS abzufangen und so die Bedeutung der ROS-Bildung an der Wirkung von P1 und seiner aktiven Fraktionen 6 und 4 zu klären. Bei kausalem Zusammenhang zwischen ROS-Bildung und Wirkung auf den Pathogenbefall müsste die Reduktion von ROS durch Radikalfänger zu einer erhöhten Infektion führen. Darüber sollte eine Aussage über den Anteil indirekter Wirkmechanismen an der Gesamtwirkung getroffen werden. Es zeigte sich aber, dass Plantacur-E selbst bei Verdünnung 1:1000 noch eine geringe befallsreduzierende Wirkung in Tomate hatte. Eine abschließende Beurteilung zur Bildung von ROS an der Wirkungsweise *ad planta* von Süßholz behandelten Pflanzen konnte daher noch nicht erfolgen.

5 Diskussion der Ergebnisse

5.1 Wirksamkeitsprüfungen ausgewählter Süßholzformulierungen im Klimaraum in Gurke/*P. cubensis*

Bei Anwendung von 2 % w/v konnte für alle getesteten Süßholzformulierungen ein hoher Wirkungsgrad bei guter Pflanzenverträglichkeit nachgewiesen werden. Bei weiter reduzierter Konzentration (1,5 % w/v) konnte die Wirkung der einzelnen Formulierungen besser differenziert werden. Hier waren einige Formulierungen wesentlich wirksamer als der Rohextrakt. Insgesamt zeigte sich, dass die Formulierungen, die von Trifolio-M entwickelt und in Tomate vorgetestet wurden, auch im System Gurke/*P. cubensis* im Klimaraum sehr wirksam waren. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Praxisanwendung in verschiedenen Kulturen.

5.2 Wirksamkeitsteste ausgewählter Süßholzformulierungen im Semifreiland in Gurke/*P. cubensis* und Tomate/*P. infestans*

Mit den im Klimaraum getesteten Formulierungen wurden darauffolgend erste Versuche im Semifreiland durchgeführt. Dabei kamen die Einflussgrößen Sonnenstunden und Regenmengen zum Tragen.

Bereits bei 12 h Sonne und 9 mm Niederschlag zeigten der Rohextrakt und die Formulierungen, die in diesem Versuch getestet wurden, keine Wirkung mehr (G20). Wobei ca. 20 h Sonne (G3) kaum einen Einfluss auf den Rohextrakt und die Vergleichsformulierungen hatten. Im Versuch mit 25 mm Niederschlag und kumulativ 24 h Sonneneinfluss war ebenso ein starker Wirkungsabbau beim Rohextrakt und den getesteten Formulierungen zu verzeichnen. Ab 40 h Sonne und 35 mm Regen konnte keine Wirkung mehr nachgewiesen werden (G5) (Tabelle 2).

Diese ersten Versuche deuten darauf hin, dass bereits geringe Niederschlagsereignisse einen starken Einfluss auf die Wirksamkeit haben. Aber auch Morgentauereignisse (G10) ohne direkte Niederschläge führten bei kumulativ 18 h Sonne in einer Woche zu einem starken Abbau des Rohextraktes sowie der Vergleichsformulierungen (Frühherbst) (Tabelle 2).

In Gurke deutete sich daher an, dass eine UV-Beständigkeit für die getesteten Formulierungen nur für relativ kurze Dauer bestand. Geringe bis moderate Regenereignisse führten dann zu einem stärkeren Wirkungsverlust. Im Allgemeinen treffen diese Aussagen für die UV-Stabilität und Regenfestigkeit von Süßholzextrakt und den getesteten Formulierungen in Tomate ebenso zu. Niederschläge bis 12 mm (ohne direkte Sonne) führten in einem Versuch nur zu einer geringen Wirkungsabnahme. Bis zu 30 h Sonne (mit 10 mm Niederschlag) hatten einen geringen Einfluss, jedoch führten 60 h Sonne (mit 10 mm Regen) in dem entsprechenden Versuch zu einem starken Wirkungsverlust (T 8, Tabelle 3).

Süßholzextrakt in der Anwendung unter natürlichen Witterungseinflüssen ist daher auf eine hohe UV-Stabilität mit gleichzeitiger Regenfestigkeit durch die Formulierungshilfsstoffe angewiesen. Der Rohextrakt (sowie die in diesem Vorversuchen getesteten Formulierungen) zeigten bei moderaten Witterungseinflüssen jedoch keine für die Praxisanwendung ausreichende Wirkungsstabilität.

Ansätze für eine verbesserte Wirkung unter natürlichen Wettereinflüssen konnten in den hier durchgeführten Versuchen v. a. mit der Formulierung KW32-6 + SF aufgezeigt werden. Die eigentliche Freilandtestung verschiedener Formulierungen erfolgte bei den Projektpartnern im Arbeitsschwerpunkt 2 und wird in den entsprechenden Berichten dargestellt.

5.3 Wirksamkeitsprüfungen ausgewählter Formulierungen im Klimaraum mit künstlicher UV-Strahlung in Tomate/*P. infestans*:

Da im Arbeitsschwerpunkt 1 das Hauptaugenmerk auf die UV-Beständigkeit gelegt wurde, wurden weiterentwickelte Formulierungen im 2. und 3. Projektjahr im Klimaraum unter künstlicher UV-Strahlung an Tomaten getestet.

Dabei waren 50 % der 23 getesteten Formulierungen ebenso wirksam oder etwas wirksamer als der Rohextrakt. Eine besonders wirkungsstabile Formulierung unter UV-Einfluss (nach 7 Tagen UV-Behandlung) konnte jedoch nicht selektiert werden.

Es zeigte sich, dass unterschiedliche Aufwandmengen einen Einfluss auf den Wirkungsgrad der getesteten Formulierung hatten. So führte eine gesteigerte Aufwandmenge Richtung 'run-off' (1200 L/ha) nicht zur besseren Wirksamkeit in Tomate, da es hier offenbar eher zum Abfließen von Formulierung von den Blättern kam. Eine Aufwandmenge von 800 L/ha hat sich als wirksamste Aufwandmenge gezeigt.

Für die Freilandanwendung ist dies von Bedeutung, da Pflanzenschutz z. B. in Kartoffeln i.d.R. mit 400 L/ha ausgebracht wird, was für Süßholzformulierungen zu gering wäre.

Eine der vier mittels standardisierter Applikationstechnik und unter UV-Einfluss geprüften Formulierungen wurde ebenso im Semifreiland 2013 (JKI Darmstadt) getestet. Es stellte sich heraus, dass die getestete Süßholzformulierung, P1SC-149, im Vergleich zum Rohextrakt einen leicht höheren Wirkungsgrad unter Freiland ähnlichen Bedingungen (natürlicher Einfluss von Sonne und Regenmengen) aufwies (s. Abbildung 10). Die Formulierung erreichte zu Versuchsende einen WG von über 40 %, der Rohextrakt ca. 25 %. Der WG von Cuprozin war über den gesamten Versuch mit 75-88 % sehr stabil.

Wie schon im Bericht von Trifolio-M beschrieben, konnte in diesem Arbeitsschwerpunkt keine bereits für die Praxisanwendung taugliche ausreichend UV-stabile Formulierung mit Süßholz als Wirksubstanz gefunden werden. Die gewonnenen Erkenntnisse finden jedoch in einem nationalen und internationalen Projekt Eingang. Dabei geht es u.a. um die Entwicklung

einer Formulierung auf der Basis der innovativen Methode der Verkapselung des Extrakts in einer Fettmatrix.

5.4 Direkte fungizide Wirkung von P1-Extrakt und Fraktionen *in vitro*:

Mikroskopische Studien mit *P. infestans*:

In fluoreszenzmikroskopischen Studien mit *P. infestans* zeigte Fraktion 4 bei 1 % w/v eine ungehinderte Zoosporenreifung bei 8 °C nach 3 h Wirkzeit in Lösung (Abbildungen 13, 15, 18 (a)).

Fraktion 6 (DCM-Fraktionierung) zeigte bei 1 % w/v eine starke sporozide Wirkung, ebenso wie der Rohextrakt P1. Höhere Anwendungskonzentrationen (2 % w/v) für Fraktion 4 und 6 sowie P1 vermittelten das gleiche Bild (Daten nicht gezeigt).

Die Fraktion 5 blieb bei 1 % w/v wirkungslos (18).

Auch versus *P. cubensis* (Sporangien) trat in Tests mit Fraktion 4 in Konzentrationen bis 3 % w/v keine deutliche direkte fungizide Wirkung auf (Daten nicht gezeigt).

Schlupfassays Fraktionen *in vitro* und Vergleich zur EC_{50} *ad planta* :

In Schlupfassays mit P1 und Fraktionen zeigten die Fraktionen 6 und der Rohextrakt bis zu 24 h stark hemmende Wirkung auf den Zoosporenschlupf von *P. infestans*, auch in geringsten Konzentrationen mit 0,01 bzw. 0,04 % w/v.

Die Fraktion 4 hat im Schlupfassay keine direkte Wirkung gezeigt, wies an der Pflanze jedoch eine EC_{50} bei ca. 2,55 % in Gurke/*P. cubensis* auf.

Die Fraktionen 2, 3, sowie 5 wiesen keine deutliche Schlupfhemmung nach 24 h in Lösungen gegen *P. infestans* auf (Daten nicht gezeigt).

Verglichen mit der Wasserkontrolle trat bei 1 % EtOH in Lösung keine Unterdrückung der Zoosporenreifung (*P. infestans*) auf (Abbildung 18). Da in dem getesteten Extrakt bzw. den Fraktionen ebenfalls 1 % EtOH enthalten war, ist ein Effekt des Lösungsmittels auf den Zoosporenschlupf auszuschließen..

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass für die Fraktion 4 (Terpenoide/Sterole) *in vitro* keine direkte Wirkung vorlag.

Die Fraktion 6 sowie der Rohextrakt P1 haben eine starke direkte Wirkung *in vitro*, sowie eine starke Wirksamkeit an der Pflanze (Gurke, Tomate) gezeigt.

Die Fraktionen 5, sowie 2 und 3, zeigten keinerlei Wirkung *in vitro* und auch nicht *ad planta* .

Mit Fraktion 4 liegt demnach eine Fraktion von Süßholz vor, die nur eine indirekte Wirkung an der Pflanze zeigte und daher für weiterführende Versuche zum Wirkungsmechanismus besonders geeignet erscheint.

5.5 Wirksamkeit von P1 und Fraktionen *ad planta* : EC₅₀

Für die Wirksamkeitsversuche zur EC₅₀-Berechnung wurden die aktiven Fraktionen 4 (Terpene und Sterole) und 6 (Flavonoide) sowie der Rohextrakt eingesetzt. Die Fraktionen stammten aus der naßchemischen Fraktionierung der Methode A (über Dichlormethan) und Methode B (über Ether) (s. Abbildung 2). Ziel war es, das Intermedium zwischen den Phasen weitestgehend zu reduzieren, um eine scharfe Trennung der Fraktionen zu erhalten, was mit Ether gelang (tert.-Butylmethylether).

Um sicher zu stellen, dass die Umstellung der Fraktionierung auf Ether nicht zur Verschleppungen von Inhaltsstoffen aus der aktiven Fraktion 6 führte, wurde die Fraktion 4 durch Trifolio-M untersucht. Es waren keine aus Fraktion 6 bekannten Polyphenole (Flavonoide) mit fungizider Wirkung in wirksamen Mengen in Fraktion 4 zu finden (Tabelle 8). Ebenso erschienen die Bandenmuster der Dünnschichtchromatographie von Fraktion 6 und Fraktion 4 (über Ether, Methode B) bei unterschiedlichen Wellenlängen sowie nach Anfärben der DC-Platten mit den üblichen Bandenmustern der Fraktionen 6 und 4 (Methode A, über DCM-Fraktionierung) vergleichbar zu sein.

Die R_F-Werte von Fraktion 6 (Methode A) stimmten mit den in zahlreichen Versuchen ermittelten R_F-Standards überein. Pinocembrin (käufliche Testsubstanz) war in der DC von Fraktion 6 (B, Ether) mit der entsprechenden Bande nachweisbar. Daher wurde davon ausgegangen, dass nach Substitution von DCM durch Ether die übrigen, nicht näher bekannten Inhaltsstoffe der Fraktion 4 ebenso in gewohnter Weise in dieser vertreten waren. Die Fraktionen gingen darauf in die EC₅₀ Versuche.

Fraktion 4:

Fraktion 4 (B) erreichte bei 2,55 % w/v eine 50 %-ige Wirkung gegen *P. cubensis* in Gurke. Sie zeigte keine direkte Wirkung *in vitro*.

Es lag nunmehr eine Fraktion vor, die ausschließlich eine indirekte Wirkung besaß, dies im Gegensatz zur Fraktion 6 , die *in vitro* sowie *ad planta* effektiv war.

Fraktion 6 und P1:

Die Fraktion 6 wies in Tomate in einem ersten Versuch im cv. 'Campari' eine EC₅₀ von ca. 0,19 % auf. Den gleichen EC₅₀-Wert erreichte der Rohextrakt in Tomate im cv. 'Minibell'.

Scherf *et al.* (2012) berechneten für den Rohextrakt einen EC₅₀-Wert in Gurke/*P. cubensis* von 1 %, für Fraktion 6 von 0,6 %. Der hier ermittelte Wert zur Erreichung von 50 % WG lag für Fraktion 4 mit 2,55 % deutlich höher. Dies spricht dafür, dass eine indirekte Wirkung durch Süßholz (P1) *ad planta* durch eine starke direkte Wirkung überlagert wird. Der Anteil der indirekt wirksamen Inhaltsstoffe an der Gesamtwirkung von Süßholzextrakt (HERBA) tritt vermutlich hinter dieser starken direkten Wirkung, wie sie in Fraktion 6 zu finden war, zurück. Insgesamt scheint die Wirkung von P1 und Fraktion 6 in Tomaten gegen *P. infestans* ca. 5-fach bzw. 3-fach höher zu sein als gegen *P. cubensis* in Gurke. Auch wenn Fraktion 4 bislang nicht in Tomate getestet wurde, sprechen die bislang gewonnenen Ergebnisse dafür, dass auch in Tomate direkte und indirekte Wirkprinzipien vorliegen.

5.6 Versuche zu indirekten Wirkmechanismen *in vivo*: ROS

Die massive Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist als sog. „Oxidative Burst“ oft Bestandteil von Abwehrreaktionen in Pflanzen nach abiotischen (z. B. "Wounding", Trockenstress, Temperaturstress etc.) und biotischen Einflüssen (z. B. Infektion, Fraß durch Herbivoren).

In Versuchen mit Gurke (Bs) und Behandlung in P1, Fraktion 6 und Fraktion 4 konnte gezeigt werden, dass nach 6-8 Stunden in Behandlungslösung eine maximale Akkumulation von H₂O₂ stattfand. Das braune Präzipitat der Färbereaktion in den Geweben deutete so auch auf eine mögliche indirekte Wirkung von Süßholz im Wirkmechanismus hin.

Besondere Bedeutung kommt dabei der Fraktion 4 (Terpenoide und Sterole) zu, da diese *in vitro* keine direkte Wirkung auf Sporangien von *P. cubensis* und *P. infestans* hatte, wohl aber in Versuchen in Gurke eine 50 %-ige Wirkung bei 2,55 % w/v Anwendungskonzentration erreichte. Diese Unterfraktion von Süßholzextrakt hat im DAB-Test ebenso eine positive Reaktion in Tomate (Bs) hervorgerufen.

Im weiteren Fortgang der Arbeiten zu 'indirekten Wirkmechanismen' wurde begonnen, in Tomate (Gurke) verschiedene bekannte Resistenzinduktoren einzusetzen, um mögliches subzelluläres, apoplastisches H₂O₂, nach Induktion mit Süßholz und Vergleichsinduktoren, nachweisen zu können (Daten nicht gezeigt).

Desweiteren wurde eine Methode, die ursprünglich in Arabidopsis verwendet wird, genutzt und an Gurke und Tomate angepasst, um subzelluläres H₂O₂ nachzuweisen und zu lokalisieren. Dabei kam Vakuumfiltration der Lösungen (P1, Fraktionen) sowie der DAB-Reagenz im Assay zum Tragen (Daten nicht gezeigt). Dieses Protokoll muss jedoch weiter optimiert werden, und hat noch keine schlüssigen Ergebnisse auf apoplastisches H₂O₂ in Tomate (Fiederblättchen) und in Gurke (Blätter) erbracht. Abschließende Ergebnisse zur Beteiligung von ROS an der Wirkung in Gurken oder Tomaten können hier in diesem Bericht noch nicht dargestellt werden.

5.7 Versuche zur indirekten Wirkungsweise nach Extraktbehandlung, Einfluss auf die Photosynthese

Im Versuch in Ganzpflanzen (Gurke) mit den Fraktionen 2 bis 6 (Fraktionierung Methode A) und P1 zeigte sich, dass neben der Fraktion 6, auch eine weitere Fraktion (4) *ad planta* eine Wirkung aufwies. Diese reduzierte den Befall zwar nicht so deutlich wie P1 und Fraktion 6, führte aber dazu, dass der F_v/F_m -Wert ebenso hoch blieb, trotz moderaten Befalls mit *P. cubensis*.

Der F_v/F_m -Wert von P1/Fraktion 6 war erwartungsgemäß mit ca. 0,8 im Bereich von ungestressten Pflanzen, da die Behandlung mit P1/Fraktion 6 durch starke Infektionsabwehr in den Pflanzen (Befall von unter 30 % im Vergleich zu fast 100 % in der Kontrolle) somit auch den biotischen Stress reduzierte.

Die Variante mit Fraktion 4-Behandlung war an Tag 11 dagegen zu ca. 50 % befallen. Im Vergleich dazu lag der F_v/F_m -Wert an Tag 11 nach Infektion jedoch ebenso nahe 0,8 (Abbildung 22). Dies spricht für eine starke Stressminderung in Gurke durch die in Fraktion 4 enthaltenen Sterole, bzw. Terpene.

Der Seneszenz mindernde Effekt (F_v/F_m -Messungen an gesunden Blattscheiben, Gurke) der Fraktion 6 und von P1 (s. 4.7.2), sowie die Erhöhung der biotischen Stresstoleranz durch Fraktion 6, den Rohextrakt und Fraktion 4 (Abbildung 22, 24, 25) nach Infektion mit *P. cubensis* wiesen neben der starken direkten Wirkung des Extraktes in Gurke zusätzliche auf ein Potential hin, das für PST bedeutsam ist: Erhöhung der Stresstoleranz nach biotischen und abiotischen Einflüssen. Inwieweit dies nach Extraktbehandlung für Tomate ebenso zutrifft, ist noch zu prüfen.

6 Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse

6.1 Voraussichtlicher Nutzen der Ergebnisse

Im Rahmen des Projektes bestand eine enge Verzahnung der Aktivitäten in Teilprojekt 1 und 2. Die Aktivitäten reichten von der industriellen Herstellung über die Untersuchung der Wirkungsgrundlagen bis hin zur Freilandanwendung des Süßholzextraktes, was einen intensiven Wissenstransfer zwischen den beteiligten Institutionen mit sich brachte. Das Ziel der Arbeiten, die Entwicklung eines freilandtauglichen formulierten Präparats, das in der Praxis eingesetzt werden kann, wurde im Rahmen dieses Projektes noch nicht erreicht. Die bereits erarbeiteten Ergebnisse werden jedoch Eingang in ein weiterführendes nationales und internationales Projekt finden. Die Untersuchungsergebnisse insbesondere zu den beteiligten Wirkmechanismen wurden dem wissenschaftlichen Fachpublikum auf Tagungen und in Form von Veröffentlichungen bekannt gemacht.

6.2 Wurden im Projekt praxisrelevante Ergebnisse erzielt?

Die im Projekt erreichten Teilziele und Ziele gehen derzeit noch nicht direkt in die Praxis ein, da aufgrund fehlender Stabilität des Extraktes unter Freilandbedingungen (UV-Stabilität, Regenfestigkeit) noch kein markttaugliches Präparat entwickelt werden konnte.

Ein auf dieses Projekt aufbauendes nationales und ein internationales FuE-Projekt wird die hier erarbeiteten Ergebnisse jedoch aufgreifen. Insbesondere geht es dabei darum, den Extrakt über eine Matrix zu verkapseln um die UV-Stabilität zu steigern und die Freisetzung (Haftung und Penetration) der Wirkstoffe zu optimieren.

Die Ergebnisse zur Beteiligung stressmindernder Effekte des Süßholzextraktes und verschiedener Fraktionen sind für die Anwendung des Extraktes über einen Einsatz als Pflanzenschutzmittel hinaus von Bedeutung.

Mit der Testung der Formulierungen mittels standardisierter Applikationstechnik mit einer Applikationsanlage (SCHACHTNER) unter Einsatz praxisrelevanter Spritzdüsen, sowie mit der Bestimmung einer geeigneten Wasseraufwandmenge für die Ausbringung, sind wichtige Informationen für die spätere Praxisnutzung erarbeitet worden.

7 Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen (unter Berücksichtigung des geänderten Arbeitsplans)

Wie oben angegeben, haben sich einzelne Arbeiten aufgrund des verspäteten Projektstarts und durch die prioritäre Durchführung von Versuchen zur Selektion von Süßholzformulierung für die Freilandversuche in Arbeitsschwerpunkt 2 zeitlich verschoben. Somit verspätete sich der Abschluss der Arbeiten unter Punkt b, c, f und g (geänderter Arbeitsplan, s.o.) auf 2013.

Darüber hinaus wurde der Arbeitsplan vordringlich an die bis zum Projektende zu realisierenden und zur Erreichung der Ziele prioritären Versuchsfragen in Abstimmung mit dem Projektträger angepasst (s. 1.2). Daraus ergaben sich jedoch keine grundsätzlichen Änderungen für die Erreichbarkeit der Ziele im Projekt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Geplante und tatsächlich erreichte Projektziele (basierend auf dem geänderten Arbeitsplan)

Geplante Ziele	Tatsächlich erreichte Ziele
Vergleich der wirksamen Fraktionen aus <i>G. glabra</i> mit Wirkung gegen <i>P. cubensis</i> an Gurke und <i>P. infestans</i> an Tomate	In Gurke und Tomate wurden die aktiven Fraktionen aus Süßholz getestet und die Wirkung miteinander verglichen. Die EC ₅₀ -Werte wurden bestimmt.
Selektion einer geeigneten Formulierung des Extraktes	Es wurden insgesamt 29 Formulierungen auf Wirkung bzw. UV-Beständigkeit geprüft. Einige vielversprechenden Formulierungen konnten basierend auf den Versuchen mit künstlicher UV-Strahlung selektiert werden. Die Wirkstabilität war im Freiland jedoch gegenüber dem Kupferstandard v. a. in ihrer Wirkungsdauer (UV-Beständigkeit, Regenfestigkeit) noch nicht optimal.
Klärung des "Mode of action"	In <i>in vitro</i> Versuchen wurde die fungizide/ fungistatische Wirkung des Süßholzextraktes und Fraktion 6 (Flavonoide) gegenüber <i>P. cubensis</i> und <i>P. infestans</i> nachgewiesen. Eine Fraktion (4, Terpene/Sterole) zeigte keine direkten Effekte auf den Zoosporenschlupf von <i>P. infestans</i> , bewirkte im Pflanzenversuch in Gurke jedoch eine ca. 50 %ige Wirkung. Diese Fraktion sowie F6 und der Rohextrakt hatten eine stressmindernde Wirkung auf Gurkenblätter (mit und ohne Infektion). Die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an der indirekten Wirkung des Extrakts bzw. der beiden Fraktionen wird vermutet.
Selektion eines nach "upscaling" entstandenen hochwirksamen Extraktes	Da die Art der Extraktproduktion von der verwendeten Formulierung abhängig ist, die Optimierung der Formulierung jedoch noch nicht abgeschlossen ist, konnte das Upscaling nicht mehr während der Laufzeit des Projekts abgeschlossen werden. Eine abschließende Selektion einer Extraktformulierung soll in einem Anschlußprojekt stattfinden, unter Einbeziehung von neuartiger Verkapselungstechnik mittels Formulierung in einer Trägermatrix

8 Zusammenfassung

In diesem Arbeitsschwerpunkt „Industrielle Forschung und Grundlagen“ im Teilprojekt 2 (09OE101) „Wirkungsmechanismen und Vorprüfungen für Freilandanwendungen“ des Kooperationsprojektes wurden 29 wirksame Formulierungen an der Pflanze in verschiedenen Testsystemen geprüft und aus diesen Kandidaten für die Verwendung im Teilprojekt 2 zur Freilandprüfung vorselektioniert. Insgesamt zeigte sich, dass die Formulierungen im Klimaraum sowohl in Tomate gegen *P. infestans* als auch im System Gurke gegen *P. cubensis* sehr wirksam waren. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die Praxisanwendung in verschiedenen Kulturen.

Der Fokus der Arbeiten lag hauptsächlich auf der UV-Beständigkeit des formulierten Süßholzextraktes. Dazu wurden ausgewählte Formulierungen in einem dafür entwickelten UV-Testsystem mit jungen Tomaten getestet. Die behandelten Pflanzen wurden erhöhter UV-Strahlung im Klimaraum ausgesetzt.

Während der Projektlaufzeit konnte noch keine in der Praxis nutzbare ausreichend UV-stabile Formulierung gefunden werden. Die gewonnenen Erkenntnisse werden jedoch in einem nationalen und internationalen Projekt Eingang finden. Dabei geht es u.a. um die Entwicklung einer Formulierung auf der Basis der innovativen Methode der Verkapselung des Wirkstoffs in einer Fettmatrix.

In den Versuchen wurde zur Simulation der im Freiland verwendeten Applikationstechnik eine Applikationsanlage mit standardmäßigen Düsen verwendet. Dabei zeigte sich, dass anders als im Kartoffelanbau in der Praxis üblich, höhere Aufwandmengen (analog ca. 800 L/ha) für die Süßholzformulierungen (Anwendungskonzentration 2 % w/v) notwendig waren, um hohe Anfangswirkungen zu erreichen. Diese Ergebnisse gingen in die Versuche im Arbeitsschwerpunkt 2 (Freilandtestung) ein.

Mikroskopische Studien (Fluoreszenzmikroskopie) *in vitro* zeigten für Fraktion 6 (*ad planta* wirksame Flavonoide) und den Rohextrakt P1 noch bei 0,04 % w/v (P1) bzw. 0,1 % w/v (Fraktion 6) Anwendungskonzentration deutlich fungistatische Wirkung gegenüber *P. infestans*. Mittels Vitalfärbungen konnte gezeigt werden, dass der Rohextrakt auch fungizide (sporozide) Eigenschaften besitzt. *In vitro* zeigte Fraktion 4 (Terpene / Sterole) keine direkte fungizide Wirkung zwischen 0,001 % und 1 % w/v gegen Sporangien von *P. infestans*, und bis 3 % gegen Sporangien von *P. cubensis*. Die Fraktionen 5 (Lipide / Wachse), sowie 2 und 3 (Alkaloide/Zucker) zeigten keinerlei Wirkung *in vitro* und auch nicht *ad planta*.

Fraktion 4 erreichte in Gurke einen 50 %-igen Wirkungsgrad bei einer Konzentration von 2,55 % w/v (EC₅₀). Mit Fraktion 4 liegt somit eine Fraktion von Süßholz vor, die nur eine indirekte Wirkung an der Pflanze zeigte und daher für weiterführende Versuche zum indirekten Wirkungsmechanismus besonders geeignet erscheint.

In Blattscheiben von Gurke wurde die Akkumulation von H₂O₂ nach Inkubation in Fraktion 6, Fraktion 4 und dem Rohextrakt P1 nachgewiesen. Eine abschließende Beurteilung der Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an der Wirkung in Gurken oder Tomaten kann noch nicht gegeben werden.

In Versuchen zum Einfluss auf die physiologische Leistungsfähigkeit von Gurken (Photosyntheseleistung, über F_v/F_m-Messungen) konnte dargestellt werden, dass Extrakt, Fraktion 6 und Fraktion 4 eine positive Wirkung auf behandelte Gurkenpflanzen hatten. Dies zeigte sich in einer Erhöhung der Stresstoleranz der behandelten Pflanzen gegen biotischen (*P. cubensis*) und abiotischen Stress (Seneszenz). Der Einfluss auf die Seneszenz wurde bislang nur für Fraktion 6 und den Rohextrakt geprüft. Inwieweit diese Beobachtungen auch für Extraktbehandlungen in Tomate zutreffen, ist noch zu testen.

9 Literaturverzeichnis

- Abbott, W.S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2009): Zugelassene Pflanzenschutzmittel – Auswahl für den Ökologischen Landbau nach der Verordnung (EG) Nr. 834/2007, www.bvl.bund.de.
- Kofoet, A., Fischer, K. (2004): Regulierung Falscher Mehltau Pilze an Gemüsekulturen im ökologischen Landbau am Beispiel von Salat und Zwiebeln. <http://forschung.oekolandbau.de>, BÖL-Bericht-ID 13561. 85 S.
- Kofoet, A., Fischer, K. (2007): Evaluation of plant resistance improvers to control *Peronospora destructor*, *P. parasitica*, *Bremia lactucae* and *Pseudoperonospora cubensis*. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114 (2), 54-61.
- Mattmüller, H., Rupp, J., Schubert, W., Marx, P. (2010): Anbaustrategien für Einlegegurken im ökologischen Freilandgemüseanbau. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, Julius-Kühn-Archiv 428, 453.
- Scherf A., Poidevin S., Orlik M., Mauch-Mani B. & Schmitt A. (2013): Indications for resistance induction by *Glycyrrhiza glabra* (licorice) leaf extract in cucumbers. *Bulletin IOBC-WPRS* 88, 159.
- Scherf, A., Schuster, C., Marx, P., Gärber, U., Konstantinidou-Doltsinis, S. & Schmitt, A. (2010): Control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of greenhouse grown cucumbers with alternative biological agents. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 75(4), 541-554.
- Scherf, A., Treutwein, J., Kleeberg, H., & Schmitt, A. (2012): Efficacy of leaf extract fractions of *Glycyrrhiza glabra* L. against downy mildew of cucumber (*Pseudoperonospora cubensis*). *European Journal of Plant Pathology* 134, 755–762.
- Schmitt, A., Nowak, A. Schuster, C., Gärber, U., Marx, P., Rupp, J., Leinhos, G., Konstantinidou-Doltsinis, S. (2010): Möglichkeiten der Nutzung von Extrakten aus *Glyzyrrhiza glabra* (Süßholz) bei der Kupfervermeidung im ökologischen Gemüseanbau. 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, Julius-Kühn-Archiv 428, 81-82.
- Schubert, W. (2009): Weder Vorkultur noch Behandlung mit Pflanzenstärkungsmittel überzeugten. Versuche im Deutschen Gartenbau, Versuchsbericht der LWG Veitshöchheim/Bamberg, 5 S.

- Schuster, C., Konstantinidou-Doltsinis, S., Schmitt, A. (2010): *Glycyrrhiza glabra* extract protects plants against important phytopathogenic fungus. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 75(4), 531-540.
- Schuster, C. (2012): Biologische Bekämpfung des Falschen Mehltaus an der Gurke (*Pseudoperonospora cubensis*). Dissertation an der TU Darmstadt.
- Schuster, C. (2008): Untersuchung der Wirksamkeit eines Extraktes aus *Glycyrrhiza glabra* gegen luft-, boden- und samenbürtige Pathogene. Diplomarbeit an der TU Darmstadt.
- Sharma, K., Schulte-Geldermann, E., Bruns, C., Finckh, M.R. (2009): Resistenzinduktion bei Tomaten gegen *Phytophthora infestans* durch Biodüngemittel und Pflanzenstärkungsmittel. In: Mayer, J.; Alföldi, T.; Leiber, F.; Dubois, D.; Fried, P.; Heckendorn, F.; Hillmann, E.; Klocke, P.; Lüscher, A.; Riedel, S.; Stolze, M.; Strasser, F.; van der Heijden, M. und Willer, H. (Hrsg.): Werte - Wege - Wirkungen: Biolandbau im Spannungsfeld zwischen Ernährungssicherung, Markt und Klimawandel. Beiträge zur 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau, ETH Zürich, 11.-13. Februar 2009. Band 1: Boden, Pflanzenbau, Agrartechnik, Umwelt- und Naturschutz, Biolandbau international, Wissensmanagement, 360-363.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D.B. (1997): Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. The Plant Journal 11 (6), 1187-1194.
- Thürig, B. (2004): The effect of an extract from *Penicillium chrysogenum* on plant-pathogen interactions and characterisation of elicitors in this extract. Diss. Universität Basel (DissB_7156, online).
- Thürig, B., Binder, A., Boller, TH., Guyer, U., Jimenez, S., Rentsch, Ch. und Tamm, L. (2006): An aqueous extract of dry mycelium of *Penicillium chrysogenum* induces resistance in several crops under controlled and field conditions. Summary, <http://orgprints.org/9077>.
- Unger, C., Wilhelm, I., Jünger, R., und Thalmann, R. (2006): Evidence of induced resistance of tomato plants against *Phytophthora infestans* by a water extract of dried biomass of *Penicillium*. Journal of Plant Diseases and Protection 113 (5), 225-233.

10 Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt (Printmedien, Newsletter usw.), bisherige und geplante Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

Posterbeiträge:

IOBC-WPRS Tagung in Neu-Châtel, Schweiz: 2011

Indications for resistance induction by *Glycyrrhiza glabra* (licorice) leaf extract in cucumbers

Scherf, A., Poidevin, S., Orlik, M., Mauch Mani, B. and Schmitt, A.

Deutsche Pflanzenschutztagung in Braunschweig: 2012

Biologisches Pflanzenschutzmittel aus Süßholz – Einfluss auf Stresstoleranz und Pathogenabwehr in Gurkenpflanzen

Orlik, M., Scherf, A. und Schmitt, A.

IOBC-WPRS Tagung in Avignon, Frankreich: 2013

Induction of resistance and stress reduction by *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) leaf extract in cucumber and tomato

Orlik, M., Scherf, A., Bartels, S., Mazzotta, S., Schmitt, A.

geplant:

Deutsche Pflanzenschutztagung in Freiburg: 2014

Wirkung und Wirkungsweise eines Extraktes aus Süßholzblättern (*G. glabra* L.) in den Wirt- Pathogenbeziehungen Gurke - *Pseudoperonospora cubensis* und Tomate - *Phytophthora infestans*.

Orlik, M., Scherf, A., Mazzotta, S., Schmitt, A.

Abstracts:

Scherf A., Poidevin S., Orlik M., Mauch-Mani B. & Schmitt A. (2013): Indications for resistance induction by *Glycyrrhiza glabra* (licorice) leaf extract in cucumbers. Bulletin IOBC-WPRS 88, 159.

Orlik, M., Scherf, A., Bartels, S., Mazzotta, S., Schmitt, A. (2013): Induction of resistance and stress reduction by *Glycyrrhiza glabra* L. (licorice) leaf extract in cucumber and tomato. Bulletin IOBC-WPRS 89, 153-157.