

Schlussbericht zum Forschungsprojekt Nr.: 2809OE037 und 2809 OE103

Laufzeit: 01.10.10 – 31.12.13

Berichtszeitraum: 01.10.10 – 31.12.13

## **Erforschung und Entwicklung alternativer Mittelzubereitungen für die Apfelschorfbekämpfung im Falllaub**



Zuwendungsempfänger:

Dr. Andreas Kollar (Projektleitung)  
Julius Kühn-Institut  
Institut für Pflanzenschutz  
in Obst- und Weinbau  
Schwabenheimer Str. 101  
69221 Dossenheim  
Tel.: 06221/8680541  
Fax: 06221/8680515  
E-Mail: [Andreas.Kollar@jki.bund.de](mailto:Andreas.Kollar@jki.bund.de)

Barbara Pfeiffer  
Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt  
für Wein- und Obstbau  
Referat Obstbau  
Traubenplatz 5  
74189 Weinsberg  
Tel.: 07134 / 504 -152  
Fax: 07134 / 504 - 133  
E-Mail: [barbara.pfeiffer@lvwo.bwl.de](mailto:barbara.pfeiffer@lvwo.bwl.de)

Projektbearbeiter:  
Franziska Porsche

Projektbearbeiter:  
Naomi Nietsch  
Sven Bermig

## **Zusammenfassung (deutsch/englisch)**

Der Falllaubabbau im Sinne einer offensiven Bekämpfung des Apfelschorfs tötet oder schwächt die pilzlichen Strukturen, die für die Primärinfektionen im Verlauf der Epidemiologie im Frühjahr verantwortlich sind. Die Aufgabenstellung des Projektes war die Förderung von Mikroben zur Verbesserung des Blattabbaus durch Nährmedien und die Entwicklung fungizider Pflanzenextrakte. Die Effekte im Freiland auf den Blattabbau durch mikrobiologische Zersetzung, Regenwurmaktivität und auf das Ascosporenpotenzial wurden untersucht. Die biochemischen Fraktionen der Medien und der Pflanzenextrakte wurden zur Detektion von Substanzklassen verwendet die für die jeweilige Wirkungsweise verantwortlich waren. Die mikrobiologischen Analysen des Falllaubes ergaben eine deutliche Erhöhung der Organismenzahl sowie der mikrobiologischen Aktivität. In der Mehrzahl der Proben war die Zusammensetzung der Mikroorganismen im Vergleich zu Kontrollblättern nur quantitativ verändert und eine Verschiebung innerhalb der dominanten Species konnte nicht festgestellt werden. Die Falllaubbehandlungen bewirkten in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Medien (Stickstoffverbindungen) eine signifikante Reduktion des Sporenpotenzials bis zu einem vollständigen Verlust. Die Wirksamkeit der Saponine konnte anhand biochemischer Präparationen und pflanzlichen Rohextrakten aufgezeigt werden. Die grundlegenden Ergebnisse der Studie können zur Verbesserung der Bekämpfungsstrategien gegen den Apfelschorf im ökologischen Obstbau im Sinne eines Kupferersatzes führen.

Decomposing leaf litter or fungicidal treatments to achieve offensive control of apple scab kills or weakens fungal structures in fallen leaves which are responsible for the primary infections in course of the epidemiology in spring. The scope of the project was to promote microbes and to enhance leaf decay by the use of microbiologic nutrient media and to develop fungicidal plant extracts. The effects on leaf decay caused by microbiological decomposition or rain worm activity and on ascospore potential were assessed after exposure in the orchard. Biochemical fractions of the media and plant extracts were analyzed to detect classes of substances indicating the mode of action of the constituents. The microbiological analyses showed a significant increase of organisms and microbiological activity in leaf litter. In the majority of samples the microbial composition was changed only quantitatively as compared to control leaves and a shift within the dominant species was not detectable. Leaf litter treatments revealed a significant reduction of the spore potential near by a total loss dependent on the composition of the media (nitrogen compounds). The efficacy of saponins could be demonstrated with biochemical preparations and crude plant extracts. The basic results of the study may improve the strategies in organic fruit production to control apple scab in sense of replacement of copper fungicides

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. EINFÜHRUNG</b>	<b>6.</b>
1.1. <b>Gegenstand des Vorhabens</b>	<b>6.</b>
1.2. <b>Ziele und Aufgabenstellung des Projekts</b>	<b>6.</b>
1.3. <b>Planung und Ablauf des Projektes</b>	<b>7.</b>
<b>2. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND AN DEN ANGEKNÜPFT WURDE</b>	<b>8.</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10.</b>
<b>3.1. Pflanzenextrakte</b>	<b>10.</b>
3.1.1. Extrakte und Abkochungen aus Heilpflanzen	10.
3.1.2. Saponinextraktion	12.
3.1.3. Konidienkeimtests	12.
3.1.4. Wachstumshemmtests und Revival-Test	14.
3.1.5. Antagonist C8	14.
<b>3.2. Nährmedien und Vitaminpräparate</b>	<b>15.</b>
3.2.1. Allgemeines zu verwendeten Nährmedien und Vitaminpräparaten	15.
3.2.2. Quantifizierung von Sacchariden- und Zuckeralkoholen mit der HPLC	16.
3.2.3. Aminosäuren	16.
3.2.3.1. Bestimmung mit der HPLC	16.
3.2.3.2. Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Aminosäuren mit Ninhydrin	17.
3.2.4. Peptide und Proteine	17.
3.2.4.1. Bestimmung mit dem Bradford-Assay	17.
3.2.4.2. Bestimmung mit dem Biuret-Assay	17.
3.2.4.3. Ermittlung der Grössenklassenverteilung mittels Gelfiltration	18.
<b>3.3. Standortvoraussetzungen</b>	<b>18.</b>
<b>3.4. Falllaubbehandlungen im Freiland</b>	<b>18.</b>
3.4.1. Versuchsaufbau	18.
3.4.2. Bonituren	20.
3.4.2.1. Blattabbau	20.
3.4.2.2. Regenwurmaktivität	21.
3.4.2.3. Ascosporenpotenzial	21.
<b>3.5. Bestimmung der mikrobiellen Aktivität</b>	<b>22.</b>
3.5.1. Colony forming units (CFUs)	22.

3.5.2. Biologischer Sauerstoffbedarf	22.
<b>3.6. Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen</b>	<b>23.</b>
3.6.1. Isolierung von Bakterien, Hefen und Pilzen	23.
3.6.2. MALDI- TOF	23.
<b>3.7. Fungizides Potenzial der Bakterien- und Pilzisolat</b>	<b>24.</b>
3.7.1. Dualkultur Testsystem	24.
3.7.2. Hemmtests in Flüssigkultur	24.
3.7.3. Pilzlicher Antagonist C8	24.
<b>3.8. Laborexperimente zur Erfassung der Nahrungspräferenzen von Regenwürmern (<i>L. terrestris</i>) beim Falllaubabbau</b>	<b>24.</b>
<b>3.9. Versuche zur Optimierung des Hefeeinsatzes zur Attraktivitätserhöhung des Falllaubes für Regenwürmer im Freiland</b>	<b>26.</b>
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>30.</b>
<b>4.1. Extrakte und Abkochungen aus Heilpflanzen</b>	<b>30.</b>
4.1.1. Nachweis der fungiziden Wirkung auf die Konidienkeimung	30.
4.1.2. Nachweis der fungiziden Wirkung auf das Mycelwachstum von <i>V. inaequalis</i>	32.
<b>4.2. Analyse der Nährmedienwirkstoffe</b>	<b>33.</b>
4.2.1. Sacchariden- und Zuckeralkohole	33.
4.2.2. Aminosäuren	34.
4.2.3. Peptide und Proteine	35.
4.2.4. Charakterisierung der Zusammensetzung der Präparate	37.
<b>4.3. Falllaubversuche 2010/2011 im Freiland</b>	<b>38.</b>
4.3.1. Dossenheim	38.
4.3.2. Weinsberg	39.
4.3.2.1. Regenwurmaktivität	39.
4.3.2.2. Blattabbau und Ascosporenpotenzial	40.
<b>4.4. Falllaubversuche 2011/2012 im Freiland</b>	<b>43.</b>
4.4.1. Dossenheim	43.
4.4.2. Weinsberg	44.
4.4.2.1. Regenwurmaktivität	44.
4.4.2.2. Blattabbau und Ascosporenpotenzial	45.
<b>4.5. Falllaubversuche 2012/2013 im Freiland</b>	<b>53.</b>
4.5.1. Dossenheim	53.
4.5.2. Weinsberg	56.
4.5.2.1. Regenwurmaktivität und Blattabbau	59.

4.5.2.2. Ascosporenpotenzial	59.
<b>4.6. Auswirkung der Falllaubbehandlung auf die Epiphytengemeinschaft</b>	<b>60.</b>
4.6.1. Colony forming units (CFUs)	60.
4.6.2. Biologischer Sauerstoffbedarf	63.
<b>4.7. Charakterisierung der Epiphytengemeinschaft</b>	<b>66</b>
<b>4.8. Analyse des fungiziden Potenzials von Antagonisten</b>	<b>71.</b>
4.8.1. Dualkultur Test	71.
4.8.2. Hemmtests in Flüssigkultur	72.
4.8.3. Pilzlicher Antagonist C8	72.
<b>4.9. Laborexperimente zur Erfassung der Nahrungspräferenzen von Regenwürmern (<i>L. terrestris</i>) beim Falllaubabbau</b>	<b>73.</b>
<b>4.10. Versuche zur Optimierung des Hefeeinsatzes zur Attraktivitätserhöhung des Falllaubes für Regenwürmer im Freiland</b>	<b>74.</b>
4.10. 1. August/September 2013	74.
4.10.2. Februar 2013	75.
4.10.3. Biobetrieb Föll 2013	83.
4.10.4. September 2013	84
<b>4.11. Ergebnisse der Literaturrecherche</b>	<b>91.</b>
<b>DISKUSSION DER ERGEBNISSE</b>	<b>91.</b>
<b>5. VORRAUSSICHTLICHER NUTZEN UND VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE</b>	<b>100</b>
5.1. Fungizides Potenzial der Pflanzenextrakte	91
5.2. Auswertung des Ascosporenpotenzials und Blattabbau	92.
5.3. Förderung der mikrobiellen Aktivität auf dem Falllaub	94.
5.4. Analyse der Epiphytengemeinschaft	95.
5.5. Potenzielle Antagonisten	96.
5.6. Präparatanalys	97.
5.7. Auswertung der Versuchsparameter Regenwurmaktivität, Blattabbau und Ascosporenpotenzial an der LVWO Weinsberg	97.
<b>6. GEPLANTE – ERREICHTE ZIELE. EINE GEGENÜBERSTELLUNG</b>	<b>101.</b>
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>102.</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>104.</b>
<b>9. VERÖFFENTLICHUNGEN UND AKTIVITÄTEN ZUR VERBREITUNG DER ERGEBNISSE</b>	<b>106.</b>

# 1. EINFÜHRUNG

## 1.1. Gegenstand des Vorhabens

Im ökologischen Obstbau ist die Bekämpfung des Apfelschorfes die kosten- und zeitaufwendigste Pflanzenschutzmaßnahme. Kupferpräparate wirken innerhalb der für den ökologischen Anbau zugelassenen Mittel vergleichsweise gut und sind derzeit nicht zu ersetzen. Der Schorfpilz überwintert auf dem Falllaub, die Überwinterung am Holz ist möglich, spielt jedoch eine untergeordnete Rolle. Die Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel und Verfahren, die zur Abtötung, Schwächung der Überdauerungsorgane im Falllaub führen, waren die Hauptziele des Projektes. Das Ziel aller am Falllaub orientierten Untersuchungen war die Verringerung des Infektionsdruckes im Frühjahr aufgrund einer verminderten Sporenproduktion des Erregers. Die auf diese Weise abgeschwächte Wirkung der Primärinfektionen sollte den Bedarf an fungiziden Maßnahmen reduzieren und/oder die Effizienz bisher unzureichender Fungizide aus dem Bereich des ökologischen Pflanzenschutzes verstärken. Hierbei wurde angestrebt, die Effizienz der Bekämpfungsverfahren soweit zu erhöhen, dass kupferhaltige Pflanzenschutzmittel, in Übereinstimmung mit den Prinzipien des ökologischen Landbaus, zumindest teilweise ersetzt werden können.

## 1.2. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts

Fungizid wirkende Pflanzeninhaltsstoffe und mikrobiologische Nährmedien sollten hinsichtlich ihrer direkten und/oder indirekten Wirkung auf die Fruchtkörperbildung und den Falllaubabbau erforscht werden. Da solche Zubereitungen sehr komplexer Natur hinsichtlich der Inhaltstoffe sind, ist es erforderlich, die Extraktionsverfahren zu optimieren. Letzteres erfordert biochemische Analysen, um entsprechende Konzepte und Strategien im Sinne einer deutlichen Wirkungssteigerung zu entwickeln.

Prinzipiell sollten in den hier geplanten Arbeiten zwei Ziele verfolgt werden:

1. Effektive Reduktion des Ascosporenpotenzials durch fungizide Wirkungen auf den Schorfpilz selbst bzw. durch Förderung der mikrobiellen Konkurrenz (natürlicher Antagonismus, Laubzersetzung)
2. Förderung der Attraktivität der behandelten Blätter für Regenwürmer durch Optimierung der Extrakte (Hefe, Pflanzen. Medien), dadurch indirekte Reduktion des Ascosporenpotenzials

Das mikrobiologische Medium auf Casein- und Soja-Basis (TSB) erreichte in Vorversuchen offenbar durch die Förderung von laubzersetzenden natürlichen Mikroben eine effiziente Bekämpfung der sexuellen Vorgänge, Fruchtkörperbildung und/oder Sporenausschleuderung.

Das Wirkprinzip des Präparates sollte durch die Untersuchung folgender Fragestellungen aufgeklärt werden:

- Welche qualitative Mikrobenezusammensetzung ist für die Wirkung verantwortlich?
- Gibt es quantitative Verschiebungen innerhalb der Epiphytengemeinschaft?
- Können Leitorganismen festgestellt werden?
- Wie ist die Wirkung der saprophytischen Mikroorganismen auf den Erreger des Apfelschorfs zu verstehen (Nahrungskonkurrenz, enzymatische Laubzersetzung,

Parasitierung)?

- Können die Anforderungen des ökologischen Anbaus eingehalten werden (Unbedenklichkeit z.B. des Rohmaterials, der Extraktionsmittel)?

Ebenso sollten die Wirkbestandteile des komplexen Mediums bestimmt werden. Hierzu sollten zunächst die effektiven Substanzklassen bestimmt werden, die das Wachstum der „antagonistischen Mikroben“ bewirken. Anhand der bestimmten Leitorganismen und der gewonnenen Erkenntnisse könnte eine Optimierung und Weiterentwicklung dieses Mediums aus vergleichbaren Naturstoffen erfolgen, die den Anforderungen des ökologischen Anbaus bei der Zubereitung und der Auswahl der Ausgangsstoffe entsprechen.

Ein weiteres Teilziel war die Identifizierung von Wirkkomponenten aus Pflanzenextrakten bei der direkten Bekämpfung im Falllaub. Hier sollten biochemische Analysen in Verbindung mit Biotests (Sporenceimung, Mycelwachstum) die Charakteristik der Wirkung von Pflanzenextrakten aufzeigen. Hinsichtlich der Wirkstoffe sollten folgende Aufgabenstellungen experimentell geklärt werden:

- Einordnung der Wirkstoffe in Substanzklassen, Entwicklung von Leitsubstanzen
- Entwicklung gezielte Extraktionsverfahren (u.a. physikalisch, Lösungsmittel, thermisch)
- Präextraktion oder differentielle Extraktion nicht wirkender Substanzklassen
- Stabilität der Wirkung oder Wirkungserhöhung (Temperatur, Oxidation, Lagerung)
- Wirkung nativer Stoffe oder durch den Extraktionsvorgang „sekundär“ entstandener Stoffe (z.B. heiße Auszüge, Gärungen)

Alle genannten Charakterisierungen sollten es ermöglichen, gezielte Extraktionsverfahren für die Naturstoffe zu entwickeln, um zu erreichen, dass

- Wirkstoffe in höheren Konzentration bzw. geeigneten Verhältnissen mehr Effizienz zeigen
- Unwirksame Stoffe nicht störend wirken (u.a. Präzipitationen, negative Synergie, Konzentrierbarkeit)
- Reproduzierbarkeit bezüglich Extraktion, Ausgangsmaterial und fungizider Wirkung erhöht wird
- Prinzipien des ökologischen Anbaus nicht unbeabsichtigt verletzt werden (z.B.: unerwünschte Extraktion „ungewünschter“ bzw. „kritischer“ Stoffe)

### **1.3. Planung und Ablauf des Projektes**

Die jeweils im Herbst gesammelten, stark schorfbefallenen Apfelblätter sollen als Einzeldepots mit den jeweiligen Nährmedien, Pflanzenextrakten und Antagonisten behandelt werden. Die Blätter sollten über den Winter im Freien mit Bodenkontakt gelagert (LVWO Weinsberg) bzw. ohne Bodenkontakt (Dossenheim) aufgestellt werden, um den natürlichen Witterungsbedingungen ausgesetzt zu sein. Die einzelnen Wirkungen der Behandlungen auf das Ascosporenpotenzial sollen zeigen, welche Stoffklassen - im Sinne einer gezielten Rezeptur für nachfolgende Versuche - für die gute Wirkung verantwortlich sind. Klassische Kulturversuche sollten das Spektrum der Mikroben (Bakterien, Pilze) in Qualität und Quantität aufzeigen, die für die Unterdrückung der Ascosporenbildung im Falllaub verantwortlich sind. Die Analyse der Nährmedien hinsichtlich der Wirkstoffgruppen, sollte aufzeigen welche Stoffklassen für die Förderung der

Epiphytengemeinschaft verantwortlich sind. Das fungizide Potenzial von Pflanzenextrakten sollte in Konidien- und Wachstumshemmtests nachgewiesen werden, um die Konzentrationen für die Falllaubbehandlungen festzulegen. Nach der Behandlung des Falllaubs sollten die Blattabbauraten in Weinsberg regelmäßig bonitiert werden, um die Attraktivität der verwendeten Nährmedien und Pflanzenextrakte auf die Regenwurmaktivität zu evaluieren. Begleitend sollen die Witterungsdaten der Wetterstation Heuchlingen ausgewertet werden (v. a. Bodentemperatur), um Anhaltspunkte für die optimalen Einsatzzeitpunkte der Falllaubbehandlungen hinsichtlich der Förderung des Blattabbaus durch die Regenwürmer zu gewinnen.

## **2. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND AN DEN ANGEKNÜPFT WURDE**

Die Bedeutung der ersten primären Apfelschorfinfektionen im Frühjahr durch die Ascosporen aus dem Falllaub ist unbestritten (Kohl et al. 1994). Die Bekämpfung dieser Primärfinfektionen sollte in der Praxis eine weitgehende Befallsfreiheit im Frühjahr bewirken, damit eine deutliche Reduktion der Schorfbekämpfung für den Rest des Jahres erfolgen kann. Diese oft als „defensive“ Bekämpfung bezeichnete Strategie steht der „offensiven“, direkten Bekämpfung der Schorffruchtkörper in den überwinterten Blättern gegenüber. In diesem Sinne wird derzeit im ökologischen Obstbau das Mulchen des Laubes eingesetzt. Allerdings ist die Motivation für solche Maßnahmen oft gering, da eine Reduktion der Spritzungen im nächsten Jahr nicht möglich ist, und der Eintrag von Ascosporen aus der näheren Umgebung erheblich sein kann (Kollar und Pfeiffer, 2003). Eine Reduktion des Ascosporenpotenzials zum Frühjahr verringert den Infektionsdruck und erhöht indirekt die Wirksamkeit von fungiziden Maßnahmen. Dies ist insbesondere für den ökologischen Anbau wichtig, bei dem neben Pflanzenstärkungsmitteln nur Kupfer- und Schwefelpräparate eingesetzt werden dürfen. Im ökologischen Anbau wären neben dem Mulchen wirkungsvolle neuartige Methoden wünschenswert, da in der Regel ein höherer Herbstbefall der Blätter vorliegt und die Anwendung von Harnstoff nicht möglich ist.

Mit der Verfügbarkeit der organischen, hochwirksamen Fungizide wurde die Grundlagenforschung zur „offensiven“ Bekämpfung der Fruchtkörper weniger bedeutend und notwendig. Vielversprechende Ansätze zur effektiven biologischen Bekämpfung der Schorffruchtkörper mit speziellen pilzlichen Antagonisten (Behandlungen vor oder nach dem Blattfall) erwiesen sich in Freilandversuchen als zu schwach. Die Suche nach wirksamen Organismen wird in der Forschung weiter betrieben. Eine mechanische Alternative wird mit einem entsprechend dimensioniertem und technisch aufwändigem Laubsauger (z.B.: „Elise“, „Emma“) oder Kombinationen aus Laubgebläse + Sammelbehälter erprobt.

Es wurden zahlreiche Versuche zur Bekämpfung des Apfelschorfs im ökologischen Anbau mit einer Vielzahl von Pflanzenstärkungsmitteln sowohl auf mineralischer als auch auf organischer Basis durchgeführt, die jedoch nur unter geringem Infektionsdruck zufriedenstellende Ergebnisse zeigten (Golba, 2001). Derzeit sind die einzigen hinreichend wirksamen Präparate Kupfermittel, Netzschwefel und Schwefelkalk, jedoch gibt es bei allen Einschränkungen in der Wirkung und unerwünschte Nebenwirkungen. Daher besteht dringender Forschungsbedarf zu alternativen Pilzbekämpfungsmitteln und Bekämpfungsstrategien für den ökologischen Obstbau. Pflanzenextrakte wurden meist empirisch in Tastversuchen untersucht. Das weltweite Screening von Extrakten aus Pflanzen wie Yucca, Sojabohne, Spargel, Quillajabaum, Ocimum-Arten, Schlüsselblume, Bockshornklee oder Inula gegen zahlreiche Pilzkrankheiten (Apfelschorf, Mehltau, Colletotrichum, Rostpilze, Weißfleckenkrankheit, Schwarzfäule) an verschiedensten

landwirtschaftlichen Nutzpflanzen weist auf ein hohes Potenzial hin. Hervorzuheben sind beispielsweise Pflanzen mit Inhaltsstoffen aus der Gruppe der Saponine, die in den Pflanzen als natürlicher Schutz vor Pilzbefall vorkommen.

Forschungsarbeiten zu Pflanzenextrakten als Alternativen zu Kupfer erfolgten u.a. im Rahmen von BÖL-Projekten (Pfeiffer, 2002; Pfeiffer und Kollar 2004) oder dem von der EU geförderten Repco-Programm. In der Regel wurde mit einem bestimmten Extraktionsverfahren gearbeitet und anschließend die Konzentration variiert. Es besteht Optimierungsbedarf bei verschiedenen Extrakten, insbesondere hinsichtlich der Extraktionsverfahren und bei der Formulierung der Präparate. Da die Wirkprinzipien oft nur unzureichend bekannt sind, kann eine gezielte, verbesserte Extraktion kaum erfolgen. Das Potenzial der Pflanzenextrakte verbunden mit einer hohen Effektivität ist noch nicht ausreichend ausgeschöpft.

In der Forschung werden Falllaubzersetzungsversuche und damit Zerstörung der Schorfruchtkörper bisher mit chemischen (Harnstoff), mechanischen Verfahren (Mulchen), sehr energieaufwändigen thermischen Verfahren (Abflammen) und auch mit mikrobiellen Antagonisten durchgeführt (Golba, 2001). Die Wirkung des Mulchens besteht offenbar aus der Erdbedeckung der Blätter und durch einen erhöhten biologischen Abbau der Blätter durch Zerkleinerung und Erdkontakt. Harnstoff wird in der Wirkung als „Stickstoffdünger“ eingeschätzt, der die Mikroben und damit den Laubabbau fördert, darf aber im ökologischen Obstbau nicht verwendet werden. Die Mikroben auf den Blättern entstammen dem Aeroplankton, das sich auf den Oberflächen ansammelt. Nach dem Blattfall im Herbst findet eine weitere Anreicherung der Organismen durch die Nähe zum Boden statt. Im Verlauf des Absterbens der Blätter und bis zum Frühjahr erfolgt eine aktive Besiedlung der Blätter sowohl durch den fruchtkörperbildenden Apfelschorfpilz als auch durch saprophytische, blattabbauende Mikroben. Eine nährstoffbedingte Förderung dieser konkurrierenden Mikroben wurde bisher nicht erforscht. Nachteil war bisher die mangelnde Nachprüfbarkeit der Wirkung, die mit der entwickelten Ascosporenauswaschmethode (Kollar, 1998, 2000) einfach zu bestimmen ist.

Das Aeroplankton verursacht das Auftreten von residenten Mikrobenarten (aktives Wachstum und Bindung an den Wirt) und weiteren Arten, die entsprechend der Jahreszeit und der Witterung eine bestimmte Sukzession der oberflächlichen Besiedlung auslösen. Die Zusammensetzung des Aeroplanktons ist wenig variabel und kann qualitativ sogar im Hochgebirge identisch sein. Selbst bei geringen Abweichungen folgt dem Mikroben-Niederschlag auf die Apfelblätter die Selektion durch die Blattökologie. Standortübergreifende Aussagen können auch deshalb gemacht werden, weil die klimatischen Bedingungen für den Apfelanbau einen gewissen Rahmen erfüllen müssen. Weiterhin werden die Phyllospärenorganismen im Verlauf der Laubzersetzung im Sinne ihres Aufschlussvermögens für Nährstoffe in den Blättern und z.B. Kälteresistenz selektioniert. Es wird daher in der Fachwelt von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Standorte ausgegangen. Die hinsichtlich des Ascosporenpotenzials gleichartig wirkenden mikrobienfördernden Medien an den beiden Standorten der Antragsteller wiesen auch auf eine ähnliche Mikrobienzusammensetzung hin. Zur weiteren Absicherungen sind vergleichende Mikrobenuntersuchungen an beiden Standorten vorgesehen.

Die Bedeutung von Maßnahmen zur Reduzierung des Ascosporenpotenzials auf dem Falllaub ist unumstritten und für die Zukunft sehr wichtig, da ohne Kupfer ein wichtiger Baustein in einer Öko-Schorfregulierung fehlt und mit unterschiedlichen Alternativpräparaten erst in mehreren Jahren Erfahrungen in der Praxis unter unterschiedlichsten Wetterbedingungen gesammelt werden müssen.

Ein einfacher Weg ist die Behandlung der bereits abgefallenen Blätter. In einem BÖL-Forschungsprojekt (Kollar und Pfeiffer, 2005; Pfeiffer und Kollar, 2004) wurden hier vielversprechende Ergebnisse mit dem Einsatz von TSB (Sojabohnen-Medium) erzielt, das die Verrottung des Falllaubs deutlich förderte und die Ascosporenmenge sehr stark verringerte. Bei TSB, einem komplexen, käuflichen mikrobiologischen Nährmedium, besteht Forschungsbedarf hinsichtlich der Charakterisierung der wirksamen Bestandteile und der Wirkungsweise (z. B. Förderung von Mikroorganismen, Antagonismus). Ebenso fehlen die Erkenntnisse zur Herstellung eines vereinfachten Präparates, das in allen Komponenten ökotauglich ist, das Ascosporenpotenzial effektiv reduziert und so die Anwendungssicherheit für den Obstbauern erhöht.

Die Behandlung der abgefallenen Blätter mit speziellen Nährmedien zur Aktivierung der natürlichen mikrobiellen Zersetzung wäre eine neue Strategie in der obstbaulichen Praxis, die ohne eine Applikation von Mikroorganismen auskommt und im Sprühverfahren ausgeführt werden kann. Auch vor dem Hintergrund der bereits erzielten hohen Wirkungsgrade hinsichtlich der Reduktion des Ascosporenpotenzials und der erhöhten Regenwurmattraktivität der Blätter bleiben jedoch wichtige Herausforderungen zur Verbesserung der Methoden und der Mittel bestehen. Daher kann eine entsprechende Empfehlung für die Praxis derzeit noch nicht erfolgen.

Behandlungen mit verschiedenen Hefeextrakten wurden in mehreren Versuchen an der LVWO Weinsberg als sehr attraktiv für Regenwürmer bewertet, so dass ein schnellerer Abbau der Blätter durch die Regenwürmer erfolgte und das organische Material nicht aus der Obstanlage entfernt werden müsste. Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen aus dem o.g. Projekt wurde in den letzten Jahren in Weinsberg in Tastversuchen Hefeextrakte bearbeitet, so dass mittlerweile eine Hefeextrakt-Rezeptur gefunden wurde, die im Öko-Anbau einsetzbar wäre und beispielsweise mit der Kulturmaßnahme „Mulchen des Falllaubs“ kombiniert werden könnte. Letztere sollte noch hinsichtlich Aufwandmengen und Einsatzterminen optimiert werden.

An der LVWO Weinsberg wurden (Späth, 2000) verschiedene Pflanzenextrakte, z. B. auf der Basis von in der Humanmedizin genutzten Pflanzen wie Königskerze, Quecke, Schlüsselblume, Spitzwegerich, Salbei, Tormentill und Seifenkraut, auf ihre Wirkung gegen Apfelschorf getestet. Gute Wirkungen zeigten besonders Extrakte aus Seifenwurzel und Quecke. Eine andere Mischung, in der *Quillaja*-Saponin verwendet wurde, zeigte ebenfalls eine deutliche Wirkung gegen Apfelschorf. Daneben zeigten sich vielversprechende Ansätze auch bei Extrakten aus Engelswurz (*Polypodium vulgare*) (Pfeiffer, 2002; Pfeiffer und Kollar 2004). Beide genannten Arzneipflanzen werden beim Menschen gegen Bronchialleiden eingesetzt (Pahlow, 1993). Konidientests, Gewächshausversuche mit Apfelsämlingen sowie Freilandversuche zeigten eine hemmende Wirkung von Yucca-Saponin auf den Schorfpilz.

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Pflanzenextrakte**

##### **3.1.1. Extrakte und Abkochungen aus Heilpflanzen**

Für die Freilandversuch in Dossenheim wurde bei der Herstellung der Extrakte wie folgt verfahren: Jeweils 20 g Primelwurzel (*Primula veris*), Quillajarinde (*Quillaja saponaria*) und Saponariawurzel (*Saponaria officinalis*, Heinrich Klenk, Schwebheim) wurden in 200 ml destilliertem Wasser aufgekocht und 10 min ziehen gelassen. Von diesem Tee wurden jeweils 6% (v/v) für die

Fallaubbehandlung eingesetzt. Bei dem Aescinpräparat ( $\geq 97,9\%$ , Euro OTC Pharma GmbH, Bönen), der Glycyrrhizinsäure ( $\geq 98\%$ ), dem Yuccasaponin (DeruNed Bv., Bleiswijk, Niederlande) und dem Quillajasaponin (10-11 %, Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) handelt es sich um käufliche Saponinpräparate die in der angegebenen Prozentigkeit (Tabelle 6) in A. dest. in Lösung gebracht wurden.

In Weinsberg (2010) wurden für die Herstellung des Primelwurzelextraktes 10 g der Droge in 100 ml Wasser kalt angesetzt, aufgeköcht und 10 min ziehen gelassen. Für die Applikation auf das Falllaub erfolgte die Verdünnung des Primelwurzelextraktes auf 6% (v/v) in Wasser. Yuccasaponin, welches in Form eines flüssigen Pflanzenhilfsstoffes (DeruNed B.V., Bleiswijk, Niederlande) käuflich erworben worden war, wurde für die Applikation auf das Falllaub auf 1,5% (v/v) mit Wasser verdünnt.

2011 wurde in der Versuchsanlage am Obstversuchsgut Heuchlingen Zimtöl in 0,1%iger und 3%iger Konzentration verwendet (Tabelle 7). Das Zimtöl (Oleum Cinnamomi ceylanici) wurde käuflich erworben (Caeol), und entsprechend der angegebenen Konzentration in kaltem Wasser mit 0,17% Rimulgan gelöst. Bei dem verwendeten Baldrianextrakt handelt es sich um einen milchsauervergorenen Auszug aus Baldrianblüten (biologisch-dynamische Präparatezentrale, Mäusdorf).

Zur Herstellung des Galgantextraktes für die Versuche 2012 wurden 50 g frisches Rhizom in 100 ml Wasser 10 min geblendert und die Lösung anschließend durch ein Filtervlies abfiltriert. Diese wurde für die Falllaubbehandlung mit Wasser zu einer 10%igen Lösung verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung bzw. Verdünnung mit Wasser wurde die Lösung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zur Herstellung des Mangostanextraktes wurde das Perikarp reifer Früchte zu einem grobem Pulver zerkleinert und bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wurde das Pulver mit einer Konzentration von 8% in  $70^{\circ}\text{C}$  warmem Wasser gelöst und dieser Ansatz 30 min ziehen gelassen und danach durch ein Filtervlies abgeseiht.

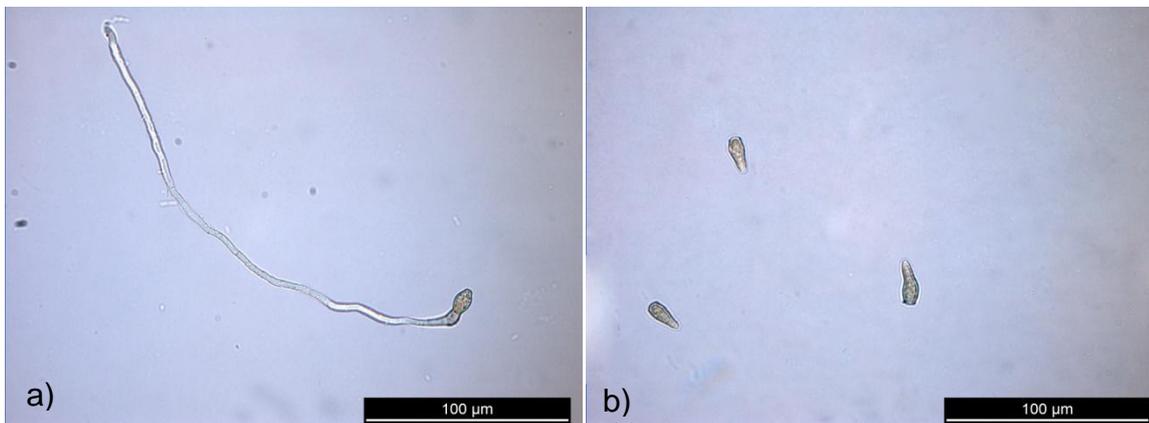
An der LVWO Weinsberg wurden 2013 Infektionsversuche an Apfelsämlingen durchgeführt. Es kamen verschiedene Pflanzenextrakte zum Einsatz deren fungizide Wirkung als vorbeugende Behandlung getestet werden sollte. Dazu wurden 50 g getrocknetes Galgant Rhizom (Reformhaus Jena) mit 500 ml Leitungswasser 10 Minuten gekocht. Anschließend wurde der Extrakt abgeseiht und in einer Verdünnung von 10% verwendet. Darüber hinaus wurden 30 g frisches Rhizom ebenfalls für 10 Minuten mit 300 ml Leitungswasser gekocht und genauso wie der Trockenextrakt in einer Verdünnung von 10% verwendet. Außerdem wurde mit *Polygonum hydropiper*, dem Japanischen Wasserpfeffer, gearbeitet, bei dem sowohl Trocken- als auch Frischextrakte Verwendung fanden. Hierbei wurden Blätter und Stiele der einjährigen, krautigen Pflanze verwendet, die im Gewächshaus des Obstversuchsgutes Heuchlingen kultiviert wurde. Beide Extrakte wurden als Tee zubereitet. Der Tee für den Frischextrakt wurde aus 50 g frischen Blättern und Stielen 15 Minuten lang gekocht und anschließend abgeseiht. Analog verfuhr man bei der Gewinnung des Tees aus getrocknetem Pflanzenmaterial. Die beiden Teezubereitungen kamen in 8 und 10%iger Verdünnung zum Einsatz. Bei den anderen in Tabelle 7 genannten Präparaten handelt es sich um käuflich erworbene Produkte die in der angegebenen Konzentration in Lösung gebracht wurden.

### 3.1.2 Saponinextraktion

In Dossenheim wurden aus dem Pericarp der indischen Waschnuss (*Sapindus mukorossi*) (Handelsvertretung für Naturprodukte, Leisnig), den Samen der Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*), Saponariawurzeln (*Saponaria officinalis*) und gekauftem Yuccasaponin (*Yucca shidigera*) nach einem modifizierten Protokoll von Saha et al. (2010) Saponine extrahiert. Das Pflanzenmaterial wurde mechanisch zerkleinert (Ausnahme: Yuccasaponin), bei -20°C eingefroren, für 2-3 d lyophilisiert und zu einem feinen Pulver gemahlen. Das Pulver wurde mit n-Hexan entfettet. Die Saponine wurden mit Methanol und n-Butanol extrahiert. In einem weiteren Extraktionsschritt wurden die Saponine mit Aceton ausgefällt. Das dabei entstandene honigartige Pellet wurde lyophilisiert und konnte dann zu einem feinen Pulver (Saponinextrakt) gemahlen werden. Für die Falllaubbehandlungen wurden die Extrakte in der gewünschten Konzentration gelöst..

### 3.1.3. Konidienkeimtests

Bei den Konidienkeimtests wurde die keimhemmende Wirkung verschiedener Pflanzenextrakte, v. a. aus saponinhaltigen Pflanzen, gegenüber Konidien von *V. inaequalis* geprüft. Ausgangsbasis für den Keimtest war eine aus Schorfläsionen (4-5 schorfbefallene Blätter) gewonnene, frische Konidiensuspension ( $10^5$  /ml). Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an Extrakt wurde die gewünschte Konzentration eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Lösung wurde in sterile Mikrowellplatten pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 20°C wurden jeweils 100 Konidien mikroskopisch untersucht, wobei diejenigen Konidien, bei denen der Keimschlauch mindestens doppelt so lang war wie die Konidie, als gekeimt betrachtet wurden (Abbildung 1 a + b). Der Anteil nicht gekeimter Konidien in den Extraktvarianten und in der Kontrolle wurde dokumentiert und der Wirkungsgrad, sowie die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) berechnet. In Weinsberg wurde eine Einteilung in nicht gekeimte, kurz gekeimte oder lang gekeimte Konidien vorgenommen.



**Abb. 1 a + b:** Gekeimte (a) und nicht gekeimten Konidien (b) von *V. inaequalis*

Im Dezember 2010 wurden mehrere Versuche zur Hemmung der Konidienkeimung an der LVWO Weinsberg durchgeführt, um einen Überblick über potenziell wirksame Pflanzenextrakte zur Reduktion des Ascosporenpotenzials zu bekommen. Diese sollten als Vorversuche für die Falllaubbehandlungen im Freiland dienen. Im Wesentlichen wurde an die Vorversuche aus dem Forschungsprojekt FKZ BÖLN 2809OE103 zu Extraktionsverfahren von *Primula veris* angeknüpft. Im Mittelpunkt der Prüfung standen verschiedene Varianten der Extrakterstellung bei *Primula veris* (Tabelle 1) und *Saponaria officinalis* (Tabelle 2) und Kombinationen aus beiden Pflanzen. Bei

*Primula veris* hatte sich ein Kaltansatz als wirksamer erwiesen als ein Tee (2003).

**Tab.1 :** *Primula veris* Extrakt in unterschiedlichen Konzentrationen und Aufwandmengen, 12/2010

Var.	Beschreibung	g trockene Wurzel / dest. Wasser	Konzentration	alte Rezeptur Nr.
1	Kontrolle (keine Zusatz Pflanzenextrakt)			
2	kalt ansetzen, bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	2 g / 100 ml	4%	4
3	kalt ansetzen, bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	2 g / 100 ml	6%	4
4	kalt ansetzen, bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	5 g /100 ml	4%	neu 6
5	kalt ansetzen, bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	5 g /100 ml	6%	neu 6
6	kalt ansetzen, bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	10 g /100 ml	4%	5
7	kalt ansetzen, bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	10 g /100 ml	6%	5
8	Tee, mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben	10 g /100 ml	4%	3
9	Tee, mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben	10 g /100 ml	6%	3

Der zweite Versuch widmete sich der Fragestellung, ob es eine vergleichbare Wirkung von Extrakten aus *Primula veris* und *Saponaria officinalis* in Abhängigkeit von der Menge trockene Pflanze je 100 ml Wasser gibt, und ob bei der Seifenkrautwurzel ein Kaltansatz oder ein Tee besser wirkt. Hierzu wurden folgende Varianten verglichen (Tabelle 2):

**Tab. 2:** Seifenwurzelextrakt in unterschiedlichen Konzentrationen und Aufwandmengen, 12/2010

Var.	Beschreibung	g trockene Wurzel / dest. Wasser	Konzentration
1	Kontrolle (keine Zusatz Pflanzenextrakt)		
2	<b>kalt ansetzen</b> , bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	10 g Seifenwurzel/ 100 ml	6%
3	<b>kalt ansetzen</b> , bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	12 g Seifenwurzel/ 100 ml	6%
4	<b>kalt ansetzen</b> , bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	16 g Seifenwurzel/ 100 ml	6%
5	<b>Tee</b> , mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben	10 g Seifenwurzel/ 100 ml	6%
6	<b>Tee</b> , mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben	12 g Seifenwurzel/ 100 ml	6%
7	<b>Tee</b> , mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben	16 g Seifenwurzel/ 100 ml	6%
8	kalt ansetzen, bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	10 g Primelwurzel/100 ml <b>(wie Var. 6 Versuch 1)</b>	6%
9	Tee, mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben	10 g Primelwurzel/100 ml <b>(wie Var. 9 Versuch 1)</b>	6%

Der dritte Vorversuch in dieser Serie erfolgte unter dem Gesichtspunkt der Herstellung eines kostengünstigeren Extraktes aus einer Mischung von Primelwurzel und Seifenwurzel mit einer hohen sporenkeimungshemmenden Wirkung. Beiden Drogen wurden zusammen gekocht. Aus den Ergebnissen der Versuche 1 und 2 wurde der 3. Versuch konzipiert. Die Mischungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Der fertige Tee wurde anschließend in der angegebenen Konzentration mit der Konidiensuspension gemischt.

**Tab. 3:** Seifenwurzel und/oder Primelwurzelextrakt in unterschiedlichen Konzentrationen und Aufwandmengen, 12/2010

Var.	Beschreibung	g trockene Wurzel / 100 ml dest. Wasser		Konzentration
1	Kontrolle (keine Zusatz Pflanzenextrakt)			
2	<b>kalt ansetzen</b> , bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	10 g Primelwurzel		6%
3	<b>Tee</b> , mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben	10 g Primelwurzel		6%
4	<b>kalt ansetzen</b> , bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben		12 g Seifenwurzel	4%
5	<b>Tee</b> , mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben		12 g Seifenwurzel	4%
6	<b>kalt ansetzen</b> , bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben		12 g Seifenwurzel	6%
7	<b>Tee</b> , mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben		12 g Seifenwurzel	6%
9	<b>kalt ansetzen</b> , bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	4 g Primelwurzel	6 g Seifenwurzel	6%
9	<b>Tee</b> , mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben	4 g Primelwurzel	6 g Seifenwurzel	6%
10	<b>kalt ansetzen</b> , bis zum Sieden erhitzen, zugedeckt 10 min ziehen lassen, absieben	6 g Primelwurzel	4 g Seifenwurzel	6%
11	<b>Tee</b> , mit kochend heißem Wasser überbrühen, 10 min ziehen lassen, absieben	6 g Primelwurzel	4 g Seifenwurzel	6%

Zwei Tastversuche wurden zusätzlich zur Frage durchgeführt, ob es möglich ist, durch den Zusatz von Extrakten aus *Primula veris* oder von Palmarosa-Öl, das in der Humanmedizin gegen Hautkrankheiten eingesetzt wird, bereits keimende Schorfkonidien im Wachstum zu stoppen.

### 3.1.4. Wachstumshemmtests und Revival-Test

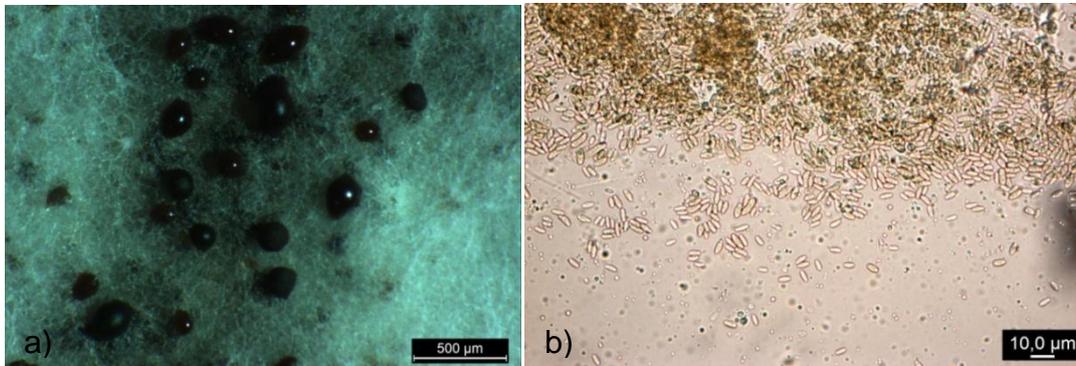
Um die fungizide Wirkung der Saponinextrakte auf das Mycelwachstum des Apfelschorfs zu untersuchen, wurden Wachstumshemmtests auf Agarplatten durchgeführt. Die gewählten Saponinkonzentrationen lagen im Bereich von 10.000 bis 1 ppm. Jeweils 1 ml der entsprechend konzentrierten Saponinlösung wurde mit 19 ml flüssigem PDA (ca. 40°C) zu einer homogenen Suspension vermischt und in Petrischalen gegossen. Nachdem die Platten ausgehärtet waren wurde ein ausgestanztes Mycelstück (Durchmesser: 0,8 cm), einer 14 Tage alten *V. inaequalis* Kultur mittig auf die Agarplatte gesetzt. Die angeimpften Platten wurden bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Der Durchmesser der Schorfmycelien wurde nach 21 Tagen gemessen, um die Hemmung des Mycelwachstums und die IC<sub>50</sub> zu berechnen.

Revival-Tests wurden mit allen Schorfmycelien durchgeführt, die auf den Saponinagarplatten nach 21 d kein Wachstum zeigten. Die Mycelstücke wurden mit einer Impföse abgenommen und auf frische PDA-Platten überführt. Die Platten wurden für 21 d bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Der Durchmesser der Schorfmycelien wurde nach 21 d gemessen. Anhand der Ergebnisse konnte eine Aussage über die fungizide bzw. fungistatische Wirkung der Saponinextrakte getroffen werden.

### 3.1.5 Antagonist C8

Für den von TSB 9% behandeltem Falllaub isolierten Antagonisten C8 erfolgte eine Sequenzierung der ITS rDNA. Das Isolat konnte als *Leptosphaeria* sp. identifiziert werden. Von dem Pilz wurden

Einsporenisolate auf PDA-Platten angelegt. Diese wurden bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von etwa zwei Monaten begann der Pilz zu sporulieren (Abb.2 a +b). Die Sporen wurden mit einigen Tropfen A. dest. abgewaschen und mikroskopisch ausgezählt. *Leptosphaeria* sp. wurde mit  $8 \cdot 10^4$  Sporen/100 ml einmalig am 21.11.12 auf dem Falllaub appliziert. In einer zweiten Variante wurde das Falllaubdepot einmalig mit der Sporenlösung und an allen vier Applikationsterminen mit der 1:4 verdünnten Präparation der LEIBER Hefe behandelt.



**Abb. 2 a + b:** Fruchtkörper und Sporen von *Leptosphaeria* sp.

### 3.2. Nährmedien- und Vitaminpräparate

#### 3.2.1. Allgemeines zu verwendeten Nährmedien und Vitaminpräparaten

Für die Herstellung der Nährstoffpräparate wurden die jeweiligen Medien in der angegebenen Konzentration (Tabelle 6) in A. dest. unter rühren in Lösung gebracht. Für die Herstellung des TSB- und Hefeethanolextraktes/-präzipitates wurden je 40,5 g Tryptic Soy Broth (TSB) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) bzw. 5 g Hefeextrakt (Bouillon N, LS, yeast extract, LEIBER GmbH, Bramsche) in vier Zentrifugenröhrchen (250 ml) eingewogen und mit 200 ml 80% Ethanol für 1,5 h auf einem Magnetprüher extrahiert. Diese Suspension wurde für 10 min, bei 20°C und  $15\ 300 \times g$  zentrifugiert (Beckman JA-14, Beckman Coulter). Die Überstände wurden abdekantiert und die Pellets erneut 1,5 h, mit je 200 ml 80% Ethanol extrahiert und zentrifugiert. Die Überstände aus dem ersten und zweiten Zentrifugationsschritt wurden zusammengeführt (ca. 1,6 l) und am Rotationsverdampfer unter mechanischem Vakuum (100 mbar, 40°C) eingeengt. Die viskose Flüssigkeit wurde mit 1,8 l Wasser rückverdünnt. Sie stellte das 80% Ethanolextrakt dar. Die gesammelten Pellets wurden im Exsikkator getrocknet und anschließend in 1,8 l A. dest. aufgenommen. Sie stellten das 80% Ethanolpräzipitat dar.

Für die Herstellung der hitzebehandelten Nährstoffpräparate wurde 9%iges TSB bzw. 1,1%iges LEIBER Hefeextrakt für zwei Stunden gekocht und anschließend aliquotiert. Die Präparation des konzentrierten LEIBER Hefeextraktes erfolgte indem 600 g Hefeextrakt in 1 l A. dest. für 1 h mit einem Magnetprüher in Lösung gebracht wurden. Die homogene Suspension wurde 30 min bei  $15300 \times g$  und 21°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und erneut für 30 min zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde in Whirl-Paks® abgefüllt, wie auch die Hefepellets. Zur Herstellung des Aminosäuregemisches wurden 18 essentielle Aminosäuren in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, mit A. dest auf 1 l aufgefüllt, in Lösung gebracht und aliquotiert. Die Aminosäurekonzentrationsverhältnisse entsprachen qualitativ und quantitativ denen im käuflichen Caseinpräparat (6%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) (Tabelle 4). Für den Vitamin-Mix wurden 0,5% Thiamin Hydrochlorid (Vit. B<sub>1</sub>, ≥ 98,5%), 0,2% Riboflavin (Vitamin B<sub>2</sub>, ≥ 97%), 4,2 % Nicotinsäure (Vitamin B<sub>3</sub>, ≥ 99%, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) und 0,2%

Pyridoxin (Vitamin B<sub>6</sub>, Serva, Heidelberg) in Lösung gebracht. Das Konzentrationsverhältnis entsprach dabei qualitativ der Zusammensetzung der Vitamine in der LEIBER Hefe. Für die Behandlungen 2012/13 wurde zudem ein Vitamin-Mix mit einer niedrigeren Konzentration (1/1000) eingesetzt.

**Tab. 4:** Zusammensetzung der Aminosäuren im Pepton Casein

Aminosäure	Konzentration (%)
Isoleucin	2,8
Leucin	4,6
Lysin	3,5
Methionin	11,3
Cystein	0,3
Phenylalanin	2,2
Tyrosin	2,2
Threonin	2,0
Tryptophan	6,4
Valin	3,0
Arginin	1,6
Histidin	1,2
Alanin	1,6
Asparaginsäure	3,6
Glutaminsäure	9,9
Glycin	1,0
Prolin	4,6
Serin	2,5

In Weinsberg wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Nährstoffpräparate Hefeextrakt Foodgreen (Bäckerhefe - Autolysat), LEIBER Bouillon N LS (Bierhefe - Autolysat) und TSB in der entsprechenden Konzentration in Lösung gebracht.

### 3.2.2 Quantifizierung von Sacchariden- und Zuckeralkoholen mit der HPLC

Die Identifizierung und Quantifizierung der wichtigsten Saccharide und Zuckeralkohole der Nährmedien erfolgte mit der HPLC (high-performance liquid chromatography). Die Auftrennung der Proben erfolgte mit einer Aminex<sup>®</sup> HPX-87C (Bio Rad, 7,8 x 300 mm) Säule, bei einer Flussrate von 0,35 ml/min und einer Temperatur von 85°C. Der Druck betrug ca. 25 bar. Als Eluent wurde steril filtriertes A. dest. verwendet. Für die Identifizierung der Substanzen wurde die Retentionszeit herangezogen und mit der von käuflichen Standards verglichen. Die Konzentration der jeweiligen Substanzen konnte mittels einer Zwei-Punkt-Kalibrierung über die Peakfläche berechnet werden.

### 3.2.3 Aminosäuren

#### 3.2.3.1. Bestimmung mit der HPLC

Die Auftrennung und Charakterisierung der wichtigsten Aminosäuren erfolgte mit einer Aminex<sup>®</sup> HPX-87C Säule (Bio Rad, 7,8 x 300 mm) bei einer Flussrate von 0,8 ml/min und einer Temperatur von 85°C. Als Eluent wurde eine 10 mM CaSO<sub>4</sub>-Lösung verwendet. Der Druck lag bei etwa 50 bar. Die Identifizierung und Quantifizierung der wichtigsten Aminosäuren erfolgte durch die

vergleichende Analyse mit einem Aminosäuren-Standard. Dieser beinhaltete eine Lösung aus Glutaminsäure, Asparaginsäure, Threonin, Serin, Alanin, Glycin, Valin, Aspartat, Prolin und Leucin mit jeweils 100 µg/10 µl.

### **3.2.3.2. Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Aminosäuren mit Ninhydrin**

Um das Vorhandensein von Dipeptiden in den Nährstoffpräparaten zu überprüfen und die Ergebnisse der Aminosäureanalyse mit der HPLC zu bestätigen wurden die Nährstoffpräparate mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getrennt. Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus 98% EtOH und 25%iger Ammoniaklösung im Verhältnis 60:40 ml hergestellt und in eine DC-Kammer eingefüllt. Die Proben wurden mit Kapillarpipetten bandenförmig auf die DC-Platten (Kieselgel 60, Adamant, 20 x 20 cm<sup>2</sup>) aufgetragen. Als Standardsubstanzen wurden käufliche Aminosäuren, sowie ein Dipeptid (Val-Tyr), verwendet. Die Platte mit den getrockneten Probenflecken wurde in die mit Laufmittel gesättigte DC-Kammer gestellt und horizontal entwickelt. Die Derivatisierung der Proben erfolgte durch ein Tauchbad mit Ninhydrin-Lösung. Die Platten wurden nach dem Tauchen 10 min bei 120°C im Wärmeschrank entwickelt. Die Identifizierung der Aminosäuren und Dipeptide erfolgte durch den Vergleich der R<sub>f</sub>-Werte von den Aminosäure-Standards mit denen der aufgetrennten Probe. Die Farbintensität der Flecken erlaubte dabei einen Rückschluss auf die Konzentration der enthaltenen Aminosäuren.

### **3.2.4 Peptide und Proteine**

#### **3.2.4.1. Bestimmung mit dem Bradford-Assay**

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Proben erfolgte photometrisch mit dem Bradford-Test (Bradford, 1976). Zur Kalibrierung der Proteineichgeraden wurde Rinderserum Albumin (BSA) verwendet. Jeweils 600 µl der Nährmedien wurden 1:2 verdünnt und in ein Zentrifugal-Filtrerröhrchen (Amicon<sup>®</sup> Ultra-0,5, Millipore) mit einem Ausschlussvolumen von 5 kDa pipettiert. Die Röhrchen wurden bei 16 060 x g und 4°C so lange zentrifugiert, bis die gesamte Probenflüssigkeit durch die Filtertasche gelaufen war. Diese wurde gegebenenfalls bis zu dreimal mit wenigen µl A. dest. gespült. Das erhaltene Permeat wurde, bei Verlusten durch die Zentrifugation, auf die Probenausgangsmenge von 600 µl aufgefüllt und anschließend 1:5 verdünnt, damit die Proteinkonzentrationen im linearen Messbereich von BSA (0-20 µg/ml) lag. Jeweils 800 µl Probe bzw. Proteinstandard wurden mit 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) durch vortexen vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Standards und Proben wurden in Halb-Micro-Küvetten aus Polyacryl (10 x 4 x 45 mm, Sarstedt) überführt und am Photometer (Specord 200, Analytik Jena) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Für alle Proben und Standards wurde dabei eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die unbekannt Proteinkonzentrationen der Proben konnte über die Standardeichgerade von BSA ermittelt werden.

#### **3.2.4.2. Bestimmung mit dem Biuret-Assay**

Zur quantitativen Bestimmung von Polypeptiden bis hin zum Tripeptid wurde das Biuret-Assay verwendet. Als Protein-Stammlösung zur Kalibrierung einer Eichgeraden wurde eine 1%ige BSA Lösung in 0,1 M NaOH angesetzt. Von den Proben, sowie von den Standards der Eichgerade wurden jeweils 0,5 ml in ein Reagenzglas gegeben und mit 2,5 ml Biuret-Reagenz für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben und Standards in Halb-Micro-Küvetten aus Polyacryl überführt und am Photometer bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Die Peptidkonzentration der Proben konnte über die Eichgerade von BSA berechnet werden.

### 3.2.4.3. Ermittlung der Grössenklassenverteilung mittels Gelfiltration

Mittels Gelfiltration wurde die Größenklassenverteilung der Proteine und Peptide in den jeweiligen Nährmedien bestimmt. Verwendet wurde dafür eine Hiloal 16/600 Superdex 30 PG Säule (GE Healthcare). Über die Eichgerade eines Molekulargewichtstandards (Sigma) (Tabelle 5) konnte die gesammelten Fraktionen verschiedenen Größenklasse von > 3000 Da, 1000-3000 Da, 500-1000 Da und 500-300 Da zugeordnet werden. Der Protein-/Peptidgehalt der gesammelten Fraktionen wurde mit dem Biuret-Assay bestimmt. Peptide < 300 Da, sowie Aminosäuren wurden nicht bestimmt, da diese außerhalb des Biuret-Messbereich lagen.

**Tab. 5:** Molekulargewichts-Standard für die Gelfiltration

Standard	MW (Da)	Konzentration (%)
Blue Dextran	2. 000. 000	0,100
Cytochrom C, (Pferdeherz)	12. 400	0,020
Aprotinin (Rinderlunge)	6. 500	0,020
Angiotensin II Acetat	1. 046	0,020
Val-Tyr	280	0,020
Tryptophan	186	0,002

### 3.3 Standortvoraussetzungen

Die Versuche der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt für Wein und Obstbau Weinsberg wurden auf den Flächen des Obstversuchsgutes Heuchlingen durchgeführt. Die Anlage befindet sich auf einer Höhe von 200 m über NN. Die Jahresdurchschnittstemperatur beträgt ca. 9,5°C, der Jahresniederschlag liegt im Durchschnitt bei 620 mm. Der Boden des Versuchsstandortes Heuchlingen weist einen pH-Wert von 7,3 und einen Humusgehalt von 2% auf. Es handelt sich um schluffigen Lehm mit einer Lößauflagefläche von ca. 12 m. Das C:N Verhältnis beträgt 10,5. Im Vergleich dazu liegt in der Region um Dossenheim die monatliche Durchschnittstemperatur in der Regel um etwa 1°C höher als in Heuchlingen. Besonders in den Monaten April und Mai fielen in Dossenheim wesentlich mehr Niederschläge, teilweise bis zu 100 mm mehr im Monat, so dass die Bedingungen für die Reife und die Ausschleuderung der Ascosporen sich leicht unterschieden. Die Reifung der Ascosporen im Frühjahr war in Heuchlingen, im Vergleich zu Dossenheim, um 10-14 Tage verzögert.

### 3.4. Falllaubbehandlungen im Freiland

#### 3.4.1. Versuchsaufbau

Mit beginnendem Laubfall wurden im Herbst stark schorfbefallene Blätter gesammelt. In Dossenheim wurden jeweils 80 g der getrockneten Blätter in Plastikschaalen eingewogen. Die Schalen waren mit Drainagelöchern versehen, um das Abfließen von Regenwasser zu ermöglichen und wurden im Freiland auf einem Sarannetz exponiert, um Regenwürmer fernzuhalten. In Weinsberg wurden die Blätter mit direktem Kontakt zum Boden unter Drahtgittern ausgelegt, um die Blattabbaurate durch Regenwürmer zu bonitieren. Zum besseren Vergleich der Ergebnisse aus Dossenheim und Weinsberg wurden auch in Weinsberg im Versuch 2012/2013 die wichtigsten Varianten in Schalen ohne Bodenkontakt ausgelegt.

Die Falllaubdepots in Dossenheim wurden an vier Terminen im Herbst und Winter mit verschiedenen Nährmedien, Fungiziden und Antagonisten behandelt (Tabelle 6). Die Applikation erfolgte mit einer Handsprühflasche bis zum ersten Abflauen an der Blattoberfläche. Im Herbst des darauffolgenden Jahres, wurden neue Versuche zur Hemmung der Ascosporenausschleuderung und zum Falllaubabbau angelegt. Es wurden jeweils die aussichtsreichsten Varianten des Vorjahres, sowie neue Varianten und Konzentrationen getestet.

**Tab. 6:** Präparate für die Falllaubbehandlungen 2010-13 in Dossenheim

<b>Behandlungen</b>	<b>2010/11</b>	<b>2011/12</b>	<b>2012/13</b>
<b>Kontrolle, 2x</b>	unbehandelte Kontrolle (Wasser)	unbehandelte Kontrolle (Wasser)	unbehandelte Kontrolle (Wasser)
<b>Nährstoff- und Vitaminpräparate</b>	TSB 9%	TSB 9%	Vitamin-Mix
	TSB 80% Ethanolextrakt	TSB 9 % + Saccharose 6%	Vitamin-Mix (1/1000)
	TSB 80% Ethanolpräzipitat	TSB 9% + Hefeextrakt LEIBER 6%	Vitamin B <sub>3</sub>
	TSB 9% hitzebehandelt	Vitamin-Mix	Vitamin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub>
	TSB 4,5%	Aminosäuregemisch (18As)	Casaminoacids 6%
	Pepton Casein 6%	Pepton Casein 6%	Hefeextrakt LEIBER 6%
	Pepton Soja 6%	Pepton Casein 6% + Waschnussextrakt 0,1%	Hefeextrakt LEIBER konzentriert
	Casaminoacids 6%	Casaminoacids 6%	Hefeextrakt LEIBER konzentriert (1:4 verd.)
	Hefeextrakt LEIBER 1,1%	Hefeextrakt LEIBER 6%	Hefeextrakt LEIBER konzentriert + Saccharose 6%
	Hefeextrakt LEIBER 80% Ethanolextrakt		Hefeextrakt LEIBER konzentriert (1:4 verd.) + Saccharose 6%
	Hefeextrakt LEIBER 80% Ethanolpräzipitat		Pellet Hefeextrakt LEIBER konzentriert
	Hefeextrakt LEIBER hitzebehandelt		Pellet Hefeextrakt LEIBER konzentriert (1:4 verd.)
<b>Saponine/ Fungizide</b>	Yuccasaponin 1,5%	Yuccasaponinextrakt 0,1%	Waschnussextrakt 0,1%
	Primelwurzelttee	Kastanienextrakt 0,1%	Waschnussextrakt 1%
	Quillajarindentee	Waschnussextrakt 0,1%	Aescin 0,1%
	Saponariawurzelttee	Waschnussextrakt 0,1% + Kastanienextrakt 0,1%	Aescin 1%
		Aescin 0,1%	Waschnussextrakt 1% 2 x (Nov.,Dez.)
		Saponariaextrakt 0,1%	Waschnussextrakt 1% 2 x (Jan.,Feb.)
		Quillajasaponin 1%	Aescin 1% 2 x (Nov.,Dez.)
		Glycyrrhizinsäure 0,1%	Aescin 1% 2 x (Jan.,Feb.)
		Harnstoff 5%	Waschnussextrakt 1% + Netzschwefel Stulln 1%
			Netzschwefel Stulln 1%
<b>Behandlungen</b>	<b>2010/11</b>	<b>2011/12</b>	<b>2012/13</b>
			Harnstoff 5%
<b>Antagonist</b>			C8 1 x (Nov.)
			C8 1 x (Nov.) + 4 x Hefeextrakt LEIBER konzentriert, (1:4 verd.)
<b>Behandlungstermine</b>	<b>11.01.2011</b>	<b>21.11.2011</b>	<b>21.11.2012</b>
	<b>27.01.2011</b>	<b>19.12.2011</b>	<b>19.12.2012</b>
	<b>16.02.2011</b>	<b>16.01.2012</b>	<b>15.01.2013</b>
	<b>07.03.2011</b>	<b>16.02.2012</b>	<b>13.02.2013</b>

Die Versuche in Weinsberg, bei denen sowohl die Attraktivität für Regenwürmer als auch der Effekt auf das Ascosporenpotenzial untersucht werden sollten, wurden mit 3 Wiederholungen je Variante angelegt, um Bodenunterschiede ausgleichen zu können (Tabelle 7). Prinzipiell wurde bei der Terminierung darauf geachtet, dass die Witterungsverhältnisse auch eine Behandlung in einer großen Obstanlage zugelassen hätten (Tabelle 8).

**Tab. 7:** Präparate für die Falllaubbehandlungen 2010- 2013 in Weinsberg

<b>Behandlungen</b>	<b>2010/11</b>	<b>2011/12</b>	<b>2012/13</b>
<b>Kontrolle</b>	Kontrolle unbehandelt	Kontrolle unbehandelt	Kontrolle unbehandelt
<b>Nährstoff- und Vitaminpräparate</b>	Hefe Foodgreen 1,1%	TSB 9%	Pellet Leiber Hefe
	Hefe Foodgreen 1,1%	TSB + Saccharose 9%	Leiber Hefe konzentriert 60%
	Leiberhefe S- NS1,1%	Vitaminmix	Casaminoacids 6%
	Leiberhefe S- NS 1,1%	Leiberhefe S- NS 6%	Vitaminmix
	TSB 1,5%	Leiberhefe S- NS 6% + Pepton Casein 6%/	2B Fermcontrol Bio (Weinhefe 6%)
		Pepton Casein 6%	
		Casaminoacids 6%	
<b>Saponine/ Fungizide/ Pflanzenextrakte</b>	Primelwurzelextrakt 10%	Zimtöl 0,1%	Galgant 10%
	Yuccasaponin 1,5 vol. %	Galgantextrakt 3%	Mangostanpulver 8%
		Kastanie 0,1%	Waschnuss 1%
		Waschnuss 0,1%	
		Baldrianextrakt 3%	

**Tab. 8:** Daten zur Versuchsanlage und Behandlungstermine in Weinsberg / Obstversuchsgut Heuchlingen

<b>Versuchsanlage</b>	<b>2010/2011</b>	<b>2011/2012</b>	<b>2012/2013</b>
<b>Größe der Gitter</b>	85 cm x 59 cm = 0,5 qm Innenfläche	85 cm x 59 cm = 0,5 qm Innenfläche	85 cm x 59 cm = 0,5 qm Innenfläche
<b>Blattmenge</b>	200 g trocken	200 g trocken	200 g trocken, Schalen: 80g
<b>Blätter der Sorten</b>	Jonagold, Elstar, Sortenmix, GoldRush	Jonagold	Jonagold
<b>Herkunft der Blätter</b>	Rheinland, mittlerer Neckarraum, Dossenheim, Bodensee	Großraum Würzburg	Großraum Heilbronn (nur Gitter)
<b>Wasseraufwandmenge</b>	Mittelgrobtropfig behandelt, nicht klatschnass, ca. 150 ml pro 0,5 qm Gitter, Handsprüngerät	Mittelgrobtropfig behandelt, nicht klatschnass, ca. 150 ml pro 0,5 qm Gitter	Mittelgrobtropfig behandelt, nicht klatschnass, ca. 150 ml pro 0,5 qm Gitter
<b>Behandlungstermine</b>	17.01.2011, 23.02.2012, 25.03.2011	25.11.2011, 12.01./16.01.2011, 05.03.2012, 22.03.2012	23.11.2012, 08.01.2013, 13.2.2013, 22.3.13 (nur Schalen)

### 3.4.2. Bonituren

#### 3.4.2.1. Blattabbau

In Dossenheim wurde der Zersetzungsgrad der behandelten Blätter in unregelmäßigen Abständen von Ende Januar bis Mitte April ermittelt und photographisch dokumentiert.

Regelmäßig wurden die Blattabbaurate der in Heuchlingen angelegten Versuche optisch bonitiert. Dabei diente das 0,5 qm Drahtgitter als Hilfsmittel, um den prozentualen Füllungsgrad der Gitter in

Prozent der Ausgangsmenge zu bestimmen. Die Bonituren erfolgten optisch zusammen mit der Bestimmung der Regenwurmaktivität, beginnend mit der Anlage der Versuche im Herbst. Auf Blattentnahmen wurde verzichtet, um die Regenwurmaktivität nicht zu beeinträchtigen.

### 3.4.2.2. Regenwurmaktivität

Über den gesamten Versuchszeitraum an der LVWO Weinsberg erfolgten die Bonituren der Regenwurmstellen 3-4 x pro Monat, sobald eine Aktivität erkennbar wurde. Die Regenwurmaktivität wurde fotografisch festgehalten, um im Anschluss, durch Zusammenfügen der Bilder (siehe Kapitel 4. Ergebnisse) einen Überblick über die Abbaugeschwindigkeiten der einzelnen Varianten zu erhalten.

Gleichzeitig mit der Abnahme der Blattmasse wurde auch die Zahl der Regenwurmstellen optisch erfasst und dokumentiert. Hierbei konnte das charakteristische Zusammenziehen des Falllaubes auf Haufen durch die Regenwürmer zu Hilfe genommen werden (Abbildung 3). Jedes „Häufchen“ zusammengezogener Blätter wurde dabei als eine Regenwurmstelle bewertet. In einigen Versuchen wurde die Regenwurmaktivität auch mittels einer Zeitrafferaufnahme (Garden Watch Cam, Brinno) dokumentiert.



**Abb. 3:** Zusammenziehen der Blätter auf Haufen am 8.3.13 bei der Variante Mangostan 8 %

### 3.4.2.3. Ascosporenpotenzial

Mit Beginn der Schorfprimärsaison (Ende März/Anfang April) wurden wöchentlich Blattproben aus den Falllaubdepots entnommen, um das Ascosporenpotenzial mit der Wasserbadmethode (Kollar, A. 2000) zu bestimmen. Dabei wurde je ein Gramm Blattaliquot in 50 ml destilliertes Wasser eingewogen und 1 h auf einem Horizontalschüttler (Rotationsfrequenz: 50/min; Radius 3,5 cm) geschwenkt. Die Sporensuspension wurde anschließend durch Miracloth abfiltriert und in eine Kolkwitz Zählkammer (0,5 ml, Hydro-Bios) gegeben. Nach kurzem Absetzen der Sporenlösung konnten die Ascosporen mikroskopisch ausgezählt werden. Für jede Probe wurde dabei in Dossenheim eine Doppelbestimmung durchgeführt. Das wöchentliche Ascosporenpotenzial der Falllaubdepots wurde kumulativ aufsummiert und die Hemmung der Ascosporenfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle berechnet. Der pH-Wert der abgewaschenen Sporensuspension wurde gemessen (Dossenheim).

Bei den Versuchen am Obstversuchsgut Heuchlingen der LVWO Weinsberg wurden ab Ende März in regelmäßigen Abständen (etwa 3 bis 4 x pro Monat, je nach Wetterlage) das Ascosporenpotenzial möglichst zeitnah vor dem nächsten prognostizierten Niederschlagsereignis mit Hilfe der Wasserbadmethode bestimmt. Die ermittelten Werte in den unbehandelten Kontrollen wurden regelmäßig Beratungsorganisationen zur Verfügung gestellt, um die jeweilige Schorfinfektionsgefahr einschätzen zu können. Begleitend wurde der Blattabbau fotografisch dokumentiert.

### **3.5. Bestimmung der mikrobiellen Aktivität**

Der Effekt der Falllaubbehandlungen auf das Wachstum der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft wurde untersucht. Zu diesem Zweck wurden im Winter und Frühjahr des jeweiligen Versuchsjahres Blattproben aus den Falllaubdepots entnommen und bis zu ihrer späteren Analyse bei -20°C eingefroren.

#### **3.5.1. Colony forming units (CFUs)**

Die Quantifizierung der Bakterien und Pilzen auf den behandelten Blättern erfolgte mit 1 g Blattmaterial aus dem jeweiligen Falllaubdepot. Das Blattmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert und in 100 ml destilliertem Wasser aufgenommen. Diese Suspension wurde für 15 min auf dem Horizontalschüttler gestellt, um die Mikroorganismen von der Blattoberfläche abzulösen. Ausgehend von dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe bis zu einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  angelegt. Jeweils 100 µl der entsprechenden Verdünnung wurden auf TSA und PDA ausplattiert. Den Agaransätzen wurden zusätzlich Antibiotika zugegeben, um einerseits mit Cycloheximid (0,4 µg) das Wachstum von Pilzen und andererseits mit Chloramphenicol (0,4 µg) das Wachstum von Bakterien zu unterdrücken. Nach einer dreitägigen Inkubationszeit bei 20°C konnten die Kolonien auf den Agarplatten ausgezählt werden. Durch einen Vergleich mit den CFUs der Kontrolle konnte festgestellt werden, ob die Falllaubbehandlungen das Wachstum der Mikroorganismen förderten, hemmten oder keinen Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft hatten. Der Vergleich der CFU-Werte vom Winter und Frühjahr eines Falllaubdepots sollte Aufschluss über den optimalen Zeitpunkt der Nährmedienapplikation liefern.

#### **3.5.2. Biologischer Sauerstoffbedarf**

Als Parameter für die mikrobielle Aktivität wurde der biologische Sauerstoffbedarf (BSB) der behandelten Blätter ermittelt. Jeweils 1 g Blattmaterial wurde mit 10 ml A.dest. in ein Oxi -Top Messgerät (WTW, Weilheim) gegeben. Das Messgerät bestand aus einer mit Sauerstoff gesättigten Glasflasche und einem Messkopf. Das Messprinzip basiert darauf, dass von den Mikroorganismen freigesetztes Kohlendioxid an Natriumhydroxid, welches in einem Gummiköcher im Messkopf enthalten ist, bindet. Es kommt zu einer Kondensationsreaktion bei der Natriumcarbonat ausfällt und ein Unterdruck in der Flasche entsteht. Dieser kann vom Messkopf detektiert werden. Der BSB (mg/ml) wurde im 24 h Rhythmus über einen Zeitraum von 5 Tagen gemessen und konnte am Messkopf abgelesen werden. Im Versuchsjahr 2011/12 wurden jeweils 0,5 g Blattmaterial mit 5 ml Wasser in eine Messflasche gegeben. Für jede Falllaubprobe wurde der BSB<sub>5</sub> von zwei Versuchsansätzen gemessen. In einem wurden 50 µl Cycloheximid, im anderen 50 µl Chloramphenicol hinzugefügt, um eine Differenzierung zwischen dem Sauerstoffbedarf der Bakterien und dem der Pilze zu erhalten. Die gemessenen BSB- Werte wurden mit dem der Kontrolle verglichen.

Im Jahr 2013 wurde analog zu den Versuchen in Dossenheim auch bei einem Versuch an der LVWO Weinsberg der biologische Sauerstoffbedarf ermittelt. Die Blattproben wurden aus einem am 2. Februar angelegten Versuch, mit 5 Varianten, Mitte April (nach der letzten Hefebehandlung), entnommen. Dabei gab es 2 LEIBER Hefepulver N – LS Varianten (3% und 6%). Darüber hinaus war eine Flüssighefevariante (ebenfalls 3% und 6%) vertreten, die am JKI Dossenheim entwickelt wurde. Alle Proben für die BSB-Wert-Bestimmung stellten Mischproben aus den Wiederholungen der Varianten dar (Tabelle 8). Die Durchführung der BSB-Wert-Bestimmung fand wie oben beschrieben statt. Allerdings wurden zu einem Gramm Blattmasse 20 ml Aqua dest. hinzugefügt.

### **3.6. Isolierung und Identifizierung von Mikroorganismen**

#### **3.6.1. Isolierung von Bakterien, Hefen und Pilzen**

Von den Agarplatten der CFUs (3.5.1.) wurden morphologisch unterschiedliche Kolonien isoliert. Dazu wurde mit einer Impföse Zellmaterial der gewachsenen Bakterien- und Hefekolonien abgenommen und auf frischen TSA und PDA -Platten ausgestrichen. Die angeimpften Platten wurden für 48 h bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden durch Reinheitsausstriche vereinzelt. Die Reinheitsausstriche wurden für jedes Isolat mindestens dreimal wiederholt, um sicher zu stellen, dass es sich um Reinkulturen der Isolate handelte. Gewachsene Mycelien auf den CFU-Platten wurden mit dem Korkbohrer ausgestanzt und auf eine neue PDA Platte überführt. Die Platten wurden bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Nach 6 Tagen Wachstum wurde erneut ein kreisrundes Mycelstück ausgestanzt und auf eine frische PDA-Platte aufgebracht. Die isolierten Mikroorganismen wurden zur mittelfristigen Stammkonservierung bei 4°C gelagert (Kühlraum) und alle 4 Wochen auf neue Platten überführt.

#### **3.6.2. MALDI-TOF**

Die Identifizierung der Bakterien- und Pilzisolat erfolgte mittels MALDI-TOF (matrix assistend laser-desorption/ionisation (MALDI) and time of flight, (TOF)). Bei diesem Verfahren werden die zuvor aufgeschlossenen Zellen auf eine Maldy-Probeplatte (Targetplatte) pipettiert, mit einer Matrix (Dihydroxybenzoesäure) überschichtet und dann in das MALDI-TOF-MS-Gerät eingeführt. Die Probe wird im Hochvakuum mit einem fokussierten Laserstrahl beschossen, wodurch es zum explosionsartigen verdampfen der Matrix mit den Bestandteilen der eingebetteten Mikroorganismen kommt. Gleichzeitig findet eine Ionisierung statt. Die Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt und die Flugzeit der Analytmoleküle bis zu einem Ionendetektor wird gemessen. Aus der resultierenden Flugzeit lassen sich die Massen der einzelnen Analyte bestimmen, die dann ein Gesamtspektrum liefern, welches für jeden Mikroorganismus einzigartig ist (molekularer Fingerabdruck). Die ermittelten Spektren wurden mit einer Referenzdatenbank von Bakterien und Pilzen verglichen, um die Identität der Isolate bis auf Gattungs- bzw. Speziesebene zu bestimmen. Die Spektren der identifizierten Mikroorganismen wurden auch untereinander abgeglichen, um die Verwandtschaftsverhältnisse zu analysieren. Isolate bei denen keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Gattung oder Art vorlagen, wurden als nicht identifiziert gewertet. Mit Hilfe der Bruker Biotyper 2.0. Software konnte anhand der identifizierten Arten und Gattungen ein Stammbaum erstellt werden. Nah verwandte Arten bzw. Gattungen wiesen ähnliche Proteinspektren auf und wurden zu systematischen Einheiten zusammengefasst.

### **3.7. Fungizides Potenzials der Bakterien- und Pilzisolat**

#### **3.7.1. Dualkultur Testsystem**

Das antagonistische Potenzial der 2011/12 vom Falllaub isolierten Mikroorganismen wurde mit einem Dualkultur Test untersucht. Zur Überprüfung der Hemmwirkung der Hefe-, sowie der filamentösen Pilzisolat wurden mit dem Korkbohrer ein Mycelstücke einer 14 d alten Kultur von *V. inaequalis* ausgestanzt und auf PDA-Platten übertragen. Im Abstand von 2 cm wurde jeweils der Mycelplug eines Pilzisolates platziert bzw. Zellmaterial einer 24 h alten Hefekolonie, mit einem geraden Impfstich (Abstand 1 cm), ausgestrichen.

Das antagonistische Potenzial der Bakterienisolat wurde auf TSA untersucht. Ein Mycelstück von *V. inaequalis* wurde auf die Agarplatte gesetzt und im Abstand von 1 cm wurde mit einem geraden Impfstich etwas Zellmaterial einer 24 h alten Bakterienkolonie ausgestrichen. Die beimpften Platten wurden bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Nach 21 d wurde der Radius der Apfelschorfmycele gemessen. Die hemmende Wirkung der Mikroorganismen auf das Wachstum von *V. inaequalis* konnte durch den Vergleich mit einer Kontrollplatte prozentual berechnet werden.

#### **3.7.2. Hemmtests in Flüssigkultur**

Für Isolate, die in den Dual-culture Tests eine stark hemmende Wirkung aufwiesen, wurden Hemmtests in Flüssigkultur angelegt. Bei den Pilzen wurden 250 ml Erlenmeyerkolben mit jeweils 50 ml PDB befüllt und autoklaviert. Das Flüssigmedium wurde mit einem Mycelstück einer 14 alten PDA-Kultur angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden für 35 d bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände steril in 15 ml Falconröhrchen filtriert und mit dem Mycelstück einer 14 d alten V1-Kolonie angeimpft. Für die Bakterien- und Hefeisolat wurden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben 10 ml Kulturen angelegt. Die angeimpften Kolben wurden über Nacht auf einem Schüttler bei einer Temperatur von 26°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde am Photometer die OD<sub>600</sub> bestimmt und mittels Verdünnung auf einen Wert von 1,0 eingestellt. Als Referenz wurde das entsprechende Nährmedium verwendet. Das Kulturfiltrat wurde steril in ein 15 ml Falconröhrchen pipettiert und mit einem Agarmycelstück von *V. inaequalis* angeimpft. Alle Falconröhrchen wurden bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Nach 21 Tagen wurde das Wachstum der Schorfmycelien im Vergleich zur Kontrolle dokumentiert und bewertet.

#### **3.7.3. Antagonist C8**

Für den Antagonisten C8 (*Leptosphaeria* sp.) wurden Hemmtests in Dualkultur angelegt (Kapitel 3.5.4.1.). Als Medium wurde dabei PDA, sowie ein natürliches Blattmedium (1 g Falllaub/100 ml A. dest./15 g Agar) verwendet.

### **3.8. Laborexperimente zur Erfassung der Nahrungspräferenzen von Regenwürmern (*L. terrestris*) beim Falllaubabbau**

Zur Ergänzung der im Freiland durchgeführten Versuche zum Falllaubabbau wurden am Standort Weinsberg im Sommer 2011 Regenwürmer der Art *Lumbricus terrestris* unter kontrollierten Bedingungen in Vermarien gehalten. Verwendet wurden hierzu ausgewachsene (mit Klitellum) kanadische Tauwürmer, die käuflich erworben (Anglerbedarf) wurden.

Ziel dieser Untersuchung war die Entwicklung einer Methode, mit der Nahrungspräferenzen von

Regenwürmern unter künstlichen Laborbedingungen untersucht werden können. Laut Literaturangaben sollten sich auf diese Weise, die unter Freilandbedingungen auftretenden Störgrößen (kleinräumige Bodenunterschiede, heterogene Verteilung von Regenwurmpopulationen, wechselnde Witterungsbedingungen etc.) eliminieren lassen, sodass Unterschiede zwischen verschiedene Mittelapplikationen besser statistisch abzusichern und nicht auf eine natürliche Varianz der abhängigen Variable Blattabbau zurückzuführen sind.

Für das Laborexperiment wurden PVC-Boxen mit einem Innenvolumen von 52 l (50 x 40 x 38 cm) verwendet. Um eine ausreichende Belüftung der Kunststoffcontainer zu gewährleisten und Staunässe vorzubeugen, wurden in Boden und Deckel der PVC-Boxen Löcher mit einem Durchmesser von 5 mm gebohrt (104 bzw. 12 Stück). Der Boden der Vermarien wurde mit einer dünnen Drainageschicht aus Blähton ausgelegt, die mit einem Vlies abgedeckt wurde, um eine Vermischung von Substrat und Blähton zu verhindern. Auf das Vlies wurde feuchtes gehäckseltes Stroh aufgebracht, auf welches die eigentliche Substratschicht folgte. Als Substrat wurde Erde aus dem Ökoquartier des Standortes Heuchlingen verwendet, in welchem auch die Freilandexperimente durchgeführt wurden. Bevor jedes Vermarium mit jeweils etwa 27 l Erde befüllt wurde (Höhe der Substratschicht: 22 cm), wurde diese aufgelockert, homogenisiert und von natürlich vorkommenden Regenwurmartens befreit. Zur Befeuchtung der Erde wurden jeder Box langsam innerhalb von 20 min 2 l Wasser zugeführt. Um mehrere cm Abstand zum Boden zu gewährleisten, wurden die Kunststoffcontainer auf Holzpaletten gestellt. In jedes Vermarium (6 Stück) wurden 15 Individuen von *L. terrestris* gelegt, die sich in das Substrat eingraben konnten, bevor das Blattmaterial auf die Oberfläche gelegt wurde. Das Experiment wurde in einem Kellerflur mit einer durchschnittlichen Temperatur von ca. 16 C im Dunkeln durchgeführt. Dem Substrat in den PVC-Boxen wurde regelmäßig Wasser zugeführt um eine ausreichende Feuchtigkeit des Bodens zu garantieren. Für die im Folgenden aufgeführten Versuchsreihen wurden mittels Laubsauger eingesammelte Apfelblätter der Sorte 'Elstar' verwendet. Die Applikation der Testsubstanzen erfolgte vor dem Auslegen der Blätter in den Kisten mit Hilfe eines Handsprühgerätes.

#### **Versuchsaufbau 1:**

In jedem Vermarium wurden 52 g Blattmaterial ausgelegt. Die Kisten wurden in 4 Quadrate unterteilt, in die jeweils 13 g Blattmaterial gelegt wurde (Abbildung 4). Je zwei diagonal gegenüberliegende Quadrate dienten als unbehandelte Kontrollvarianten, die Blätter der beiden anderen Quadrate wurden mit der entsprechenden Testsubstanz behandelt (10 ml Lösung/13 g Blattmaterial). Getestet wurden folgende Varianten: Baldrianblütenextrakt 1% (vol/vol), LEIBER hitzebehandelt, LEIBER, TSB 9 %, Casaminoacids 6% und Peptone aus Casein 6%.



**Abb. 4:** Vermarium am 06. September 2011. Unten links und oben rechts: unbehandelte Blätter der Kontrolle, oben links und unten rechts: Blätter behandelt mit Hefeextrakt Leiber.

### Versuchsaufbau 2a:

In jeder Kiste wurde 10 g Blattmaterial ausgelegt, welches mit 7,5 ml der entsprechenden Spritzlösung behandelt wurde. Es erfolgte keine Unterteilung in behandelte Blätter und unbehandelte Kontrolle, sondern jede Variante wurde einer Kiste zugeordnet. Getestet wurde der Einfluss auf den Blattabbau von folgenden Präparaten: Baldrianblütenextrakt 1% (vol/vol), LEIBER, TSB 9%, Casaminoacids 6% und Peptone aus Casein 6%. Eine der sechs Kisten enthielt unbehandelte Blätter der Kontrollvariante.

### Versuchsaufbau 2b:

In jede Box wurden 40 g Blätter gelegt, die zuvor mit jeweils 30 ml Spritzlösung behandelt wurden. Untersucht wurden 5 verschiedene Varianten, die jeweils einer Kiste zugeordnet wurden: TSB 9%, Casaminoacids 6%, LEIBER 6%, Baldrian 3% (vol/vol) und Peptone aus Casein 6%.

## 3.9. Versuche zur Optimierung des Hefeinsatzes zur Attraktivitätserhöhung des Falllaubes für Regenwürmer im Freiland

Begleitend zu den zentralen Falllaubversuchen in Weinsberg, die jeweils im November angelegt wurden, um den Effekt auf das Ascosporenpotenzial zu untersuchen, wurden mehrere, kleinere Versuche im Frühjahr/Herbst 2012 und 2013 angelegt, um Aussagen zur Förderung der Attraktivität des Falllaubes für Regenwürmer durch die vergleichenden Varianten treffen zu können (Tabelle 9). Die Blattabbauraten und die Regenwurmaktivität wurden dokumentiert. Das Ascosporenpotenzial konnte nicht bestimmt werden, da es sich um gemischtes Blattmaterial (nicht auf Schorfbefall selektiert) handelte.

**Tab. 9:** Präparate und Behandlungstermine für die Falllaubbehandlungen zum Blattabbau in den Versuchsjahren 2012-2013 in Weinsberg

<u>Behandlungen/Thema</u>	<u>August 2012</u>	<u>Februar 2013</u>	<u>September 2013</u>
<b>Thema des Versuchs</b>	Vorversuch zur Mischung versch. Präparate	Testung unterschiedlich konzentrierter Hefen	Kann die auf den Falllaubabbau hemmende Wirkung der Saponine durch eine Hefebehandlung aufgehoben werden?
<b>Kontrolle</b>	Kontrolle unbehandelt	Kontrolle unbehandelt	Kontrolle unbehandelt
<b>Nährstoff- und Vitaminpräparate, teilweise mit Pflanzenextrakten gemischt</b>	Pepton Casein 8%	LEIBER Hefe N LS 3%	LEIBER Hefe N LS 4%
	Glucose 10% + Pepton Casein 8%	LEIBER Hefe N LS 6%	Aescin pur 0,1%
	Galgant 12%* + Pepton Casein 8%	Hefe flüssig (JKI Dossenheim) 3%	Waschnuss pur 0,1%
	Glucose 10%	Hefe flüssig (JKI Dossenheim) 6%	Waschnuss + LEIBER Hefe N LS 4%
			Aescin + LEIBER Hefe N LS 4%
<b>Behandlungstermine</b>	28.09.2012	12.02.2013 08.03.2013 27.03.2013	30.09.2013 08.10.2013 16.10.2013

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse im Falllaubversuch (siehe 4. Ergebnisse) im Winter 2012/2013, dessen Ergebnisse auf der ökologischen Obstbautagung Ende Januar 2013 in Weinsberg vorgestellt wurden, ergab sich die Möglichkeit auf einem Öko- Obstbaubetrieb in Ilsfeld-Wüstenhausen auf einer Fläche von etwa 2,77 ha Hektar Apfel einen Praxisversuch durchzuführen (Behandelt wurde nur der Baumstreifen, also etwa 1/3 der gesamten Fläche). In der Apfelanlage (Herbst 2012) lag starker Schorfbefall vor, auch bei robusten Sorten wie 'Rubinola'. Die Falllaubmenge wurde als hoch eingeschätzt. Aus betriebswirtschaftlichen Überlegungen wurde „nur“ mit einer 4%igen Anwendung des LEIBER Hefepräparate N-LS gearbeitet. Drei kleine Teilstücke wurde als Kontrolle von der Behandlung ausgenommen.

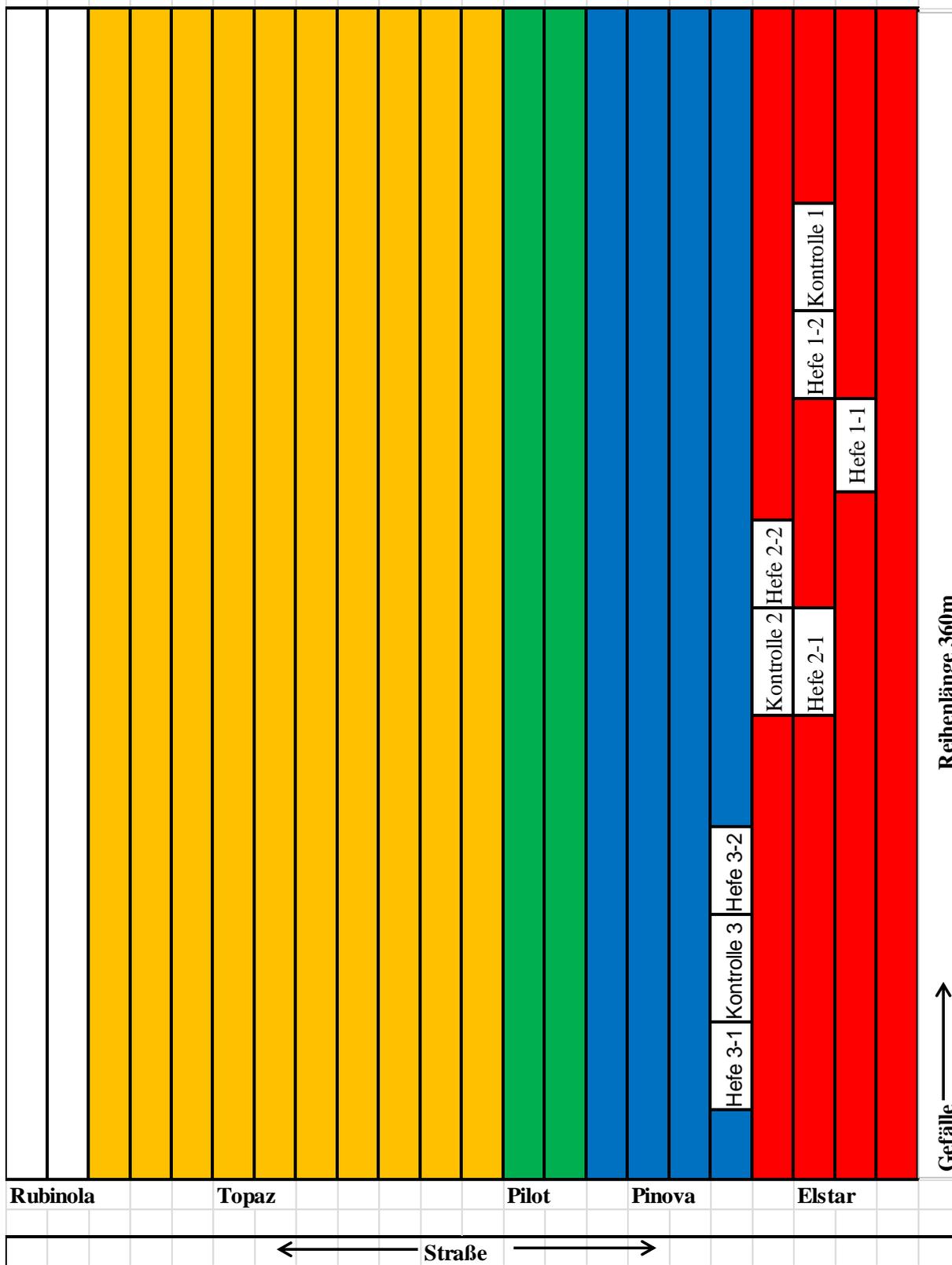
Im Jahresverlauf wurden Bonituren zur Blattrestmenge (Bedeckungsgrad in % der Bodenoberfläche des Baumstreifens) vorgenommen, um einen Überblick über die Wirksamkeit der behandelten Baumreihen zu erlangen. Dazu wurden innerhalb der ersten 5 Baumreihen 9 Parzellen á 10 Bäumen markiert, in denen die Hefebehandlungen in 2 Apfelsorten im Vergleich zur Kontrollvariante bonitiert wurden. Um den Einfluss der Hanglage auf die Vergleichbarkeit gering zu halten, wurden diese Parzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander ausgewählt (Abbildung 5).

Am 28. Februar 2013 wurde die erste von zwei Hefebehandlungen mit dem Hefepräparat der Firma Leiber Hefe Bouillon N LS in 4%iger Verdünnung in der Apfelanlage des Biohof Föll mit einer Rückenspritze (Typ Mesto, grobporige Düse) auf das Falllaub unter den Bäumen ausgebracht. Insgesamt wurden 24 Baumreihen behandelt. Bei den letzten Reihen wurde nur wenig Falllaub festgestellt, so dass weniger als eine Spritzenfüllung von 16 l pro Reihe benötigt wurde. Die Behandlung erfolgte gezielt auf Falllaubreste, Bereiche ohne Laub am Boden wurde ausgelassen. Die Temperatur am Tag der ersten Behandlung betrug um die 3°C bei trockenen Bedingungen.

Am 4. April des Jahres 2013 erfolgte die zweite Hefebehandlung ebenfalls in 4%iger Ausbringung. Allerdings wurde die Wassermenge reduziert, da nicht mehr überall Laub lag, sodass für 12 l Wasser für eine Reihe mit 360 m Länge ausreichend waren. In 20 Reihen wurden insgesamt 16 x 480 g Hefe verbraucht, was einer Gesamtmenge von 7,68 kg Hefe bei der 2. Behandlung entspricht. In den Baumreihen 1 bis 5 wurden 12 l pro Reihe verwendet. Das entspricht einer Wasseraufwandmenge von rund 100l/ha. In den darauffolgenden Reihen 6 bis 20 wurde weniger verwendet, da hier augenscheinlich weniger Blattmasse in der Reihe vorhanden war. Die Wetterbedingungen während der Ausbringung waren von mäßigem O-NO- Wind geprägt und darüber hinaus herrschten sehr trockene Boden wie auch Luftverhältnisse, einhergehend mit einer niedrigen Luftfeuchte.

**Übersicht zum Apferversuch im Biobetrieb Föll**

Pflanzenabstand 3,5 x 1 m  
Baumstreifen 1,2m



Es wurden 3 unbehandelte Kontrollen angelegt. Dazu kamen 3 mit Hefe behandelte Varianten unterschiedlicher Sorten in 2facher Wiederholung:

Hefe 1-1 Reihe 2 zwischen Pfosten 20 und 21	}	`Elstar`
Hefe 1-2 Reihe 3 zwischen Pfosten 19 und 20		
Kontrolle 1 Reihe 3 zwischen Pfosten 20 und 21		
Hefe 2-1 Reihe 3 zwischen Pfosten 14 und 15	}	`Elstar`
Hefe 2-2 Reihe 4 zwischen Pfosten 15 und 16		
Kontrolle 2 Reihe 4 zwischen Pfosten 14 und 15		
Hefe 3-1 Reihe 5 zwischen Pfosten 6 und 7	}	`Pinova`
Hefe 3-2 Reihe 5 zwischen Pfosten 8 und 9		
Kontrolle 3 Reihe 5 zwischen Pfosten 7 und 8		

Das Falllaub der Sorten `Topaz` und `Rubinola` wurde ebenfalls mit Hefeextrakt behandelt, da diese Sorten 2012 deutliche Schorfssymptome zeigten. Während der Vegetationszeit ist normalerweise das Hagelnetz geschlossen, so dass sich etwas andere Feuchtigkeitsverhältnisse ergeben und möglicherweise die Bäume auch später ihre Blätter fallen lassen.



**Abb. 6:** Reihe 22, Sorte `Rubinola`

Vor dem Hintergrund, dass das Falllaub der Versuchsanlage am Obstversuchsgut Heuchlingen wegen der warmen und feuchten Witterung im Dezember 2012 und Januar 2013 schnell abgebaut war und nicht sehr viele Blätter zur Bestimmung des Ascosporenpotenzials übrig waren, sollte ein später Hefeinsatz mit Beginn der Behandlungen erst im Februar und März erprobt werden.

Daher wurde im Februar 2013 ein neuer Versuch angelegt (Tabelle 9). Der Versuch vom September 2013 wurde unter dem Aspekt angelegt, dass der Blattabbau durch manche saponinhaltige Pflanzenextrakte, die das Potenzial hätten, die Ascosporenenreife sehr stark zu hemmen, gebremst wird, die Blätter also für die Regenwürmer nicht sehr attraktiv sind. Im Versuch wurde getestet, ob dieser Effekt einer zweimaligen Behandlung mit Aescin oder Waschnusssaponin durch eine nachfolgende Hefebehandlung umkehrbar ist. Als Vergleichsvarianten dienten eine unbehandelte Kontrolle, eine Saponinbehandlung, sowie eine Hefebehandlung.



**Abb. 7 -10** : Versuchspartellen im Biobetrieb Föll, blaue Markierung = unbehandelte Kontrolle

#### 4. Ergebnisse

##### 4.1. Extrakte und Abkochungen aus Heilpflanzen

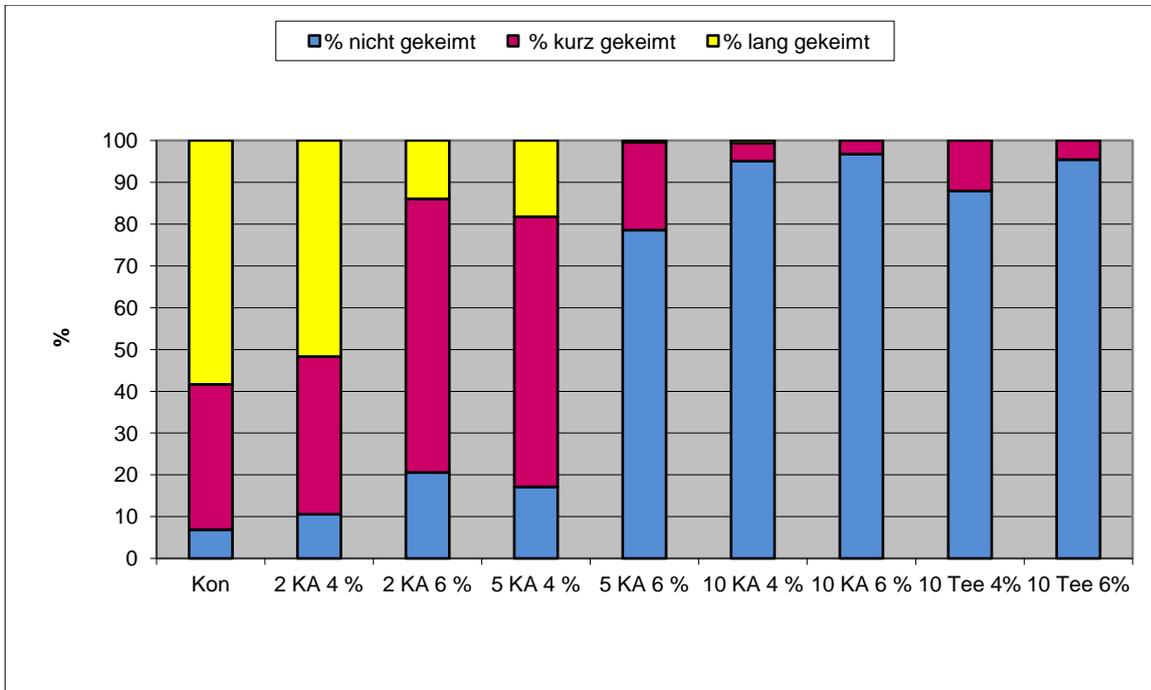
##### 4.1.1. Nachweis der fungiziden Wirkung auf die Konidienkeimung

Die effektivsten Saponinextrakte in den Konidienkeimtests in Dossenheim waren Yuccasaponin und Waschnuss, die die Keimung der Konidien, bei einer Konzentration von 20 bzw. 60 ppm, zu 50% hemmten. Das Kastanien und das Saponariaextrakt zeigten ebenfalls hohe Wirkungsgrade. Die  $IC_{50}$  lag zwischen 210 und 240 ppm. Die konzentrierten Saponinstandards von Aescin (Kastanie) und Quillaja wiesen Wirkkonzentrationen von 30 bzw. 2160 ppm auf.

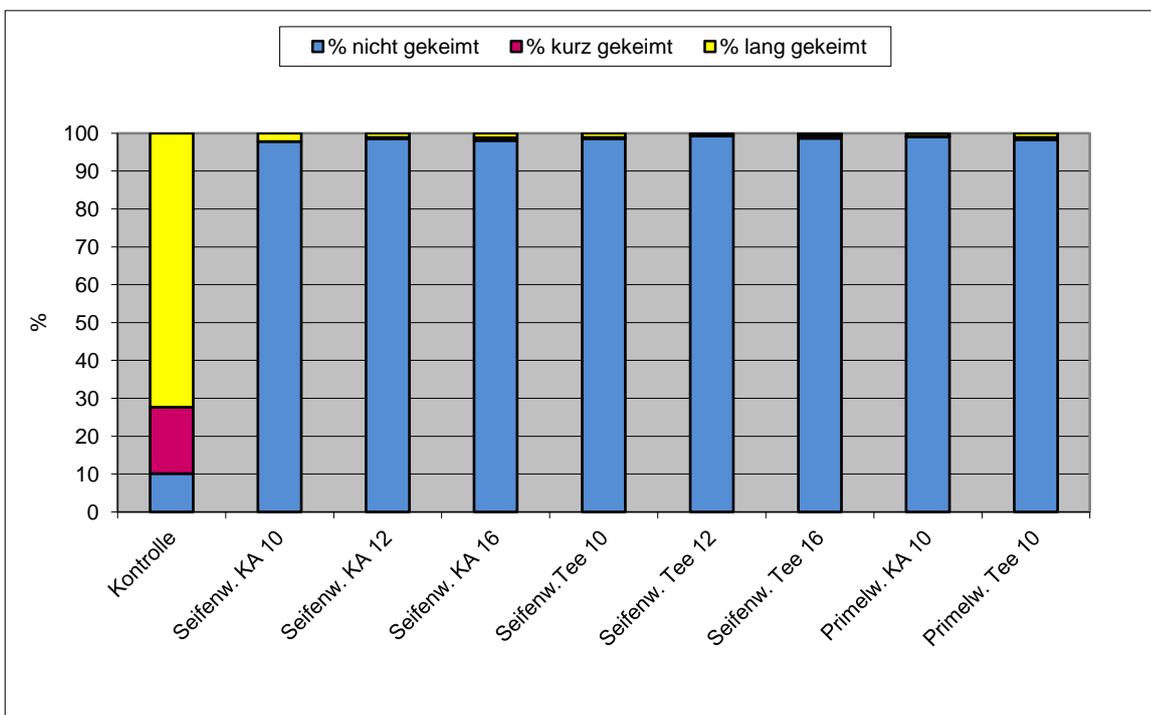
**Tab.13:**  $IC_{50}$  der Saponinextrakte, die im Konidienkeimtest bestimmt wurde

Pflanzenmaterial	$IC_{50}$ Butanol Extrakt [ppm]	$IC_{50}$ Standard [ppm]
Waschnuss	60	-
Kastanie	210	30
Saponaria	240	-
Quillaja	-	2160
Yuccasaponin	20	210

Die Ergebnisse der Konidienkeimtests vom Dezember 2010 in Weinsberg sind in den nachfolgenden Diagrammen dargestellt. Bei höher konzentriertem Extrakt der Primelwurzel war eine deutliche Inhibition der Konidien erkennbar. Dies gilt v.a. für die 10 g/100 ml Varianten, die einen Anteil von 80-97% an nicht gekeimten Sporen aufweisen. Ebenfalls einen hohen Anteil an Hemmung (78% nicht gekeimt) weist die 5 g/100 ml Variante in 6%iger Verdünnung auf.



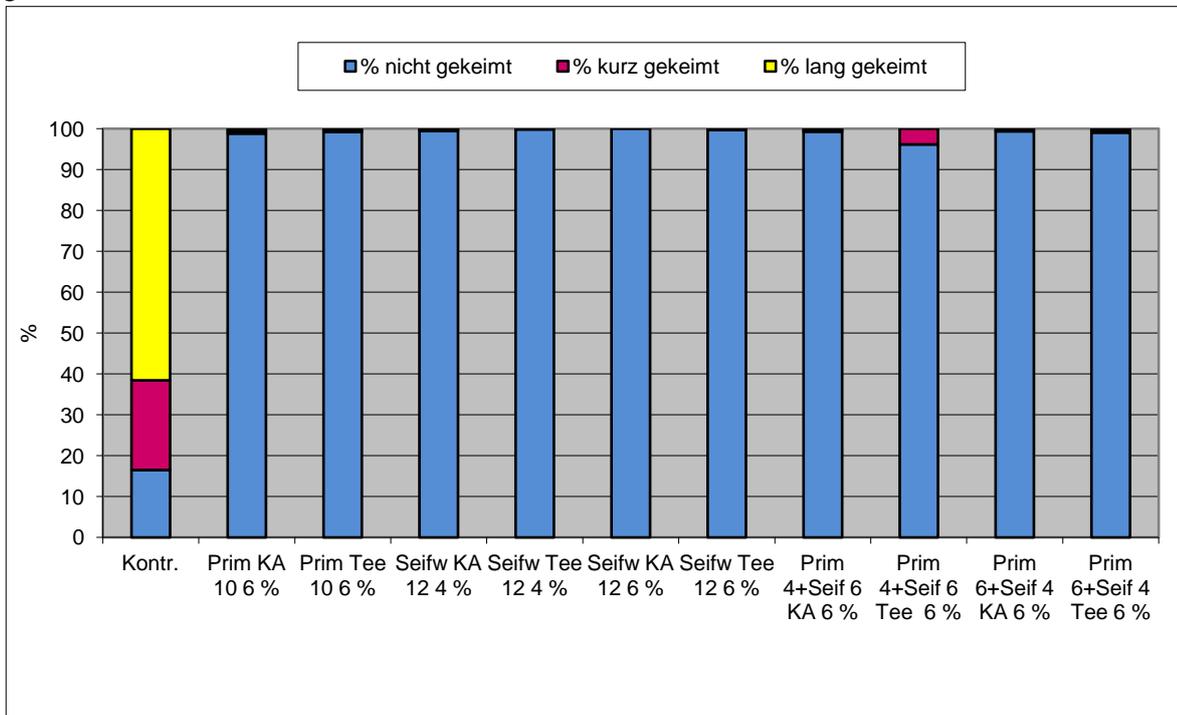
**Abb. 11:** Ergebnisse des Konidienkeimtests mit *Primula veris* Extrakt 01/12/2010



**Abb. 12:** Ergebnisse des Konidienkeimtests mit Seifenkrautwurzel Extrakt 13/12/2010

Bei höher konzentriertem Extrakt der Primelwurzel war eine deutliche Inhibition der Konidien erkennbar. Dies gilt v.a. für die 10 g/100 ml Varianten, die einen Anteil von 80-97% an nicht gekeimten Sporen aufweisen. Ebenfalls einen hohen Anteil an Hemmung (78% nicht gekeimt) weist die 5 g/100 ml Variante in 6%iger Verdünnung auf.

Gut erkennbar war, dass die hochkonzentrierten Varianten eine nahezu 100%ige Hemmung der Konidien bewirkten. Die unbehandelte Kontrolle hatte einen Anteil von über 70% an lang gekeimten Konidien.



**Abb. 13:** Ergebnisse des Konidienkeimttests mit Seifenkrautwurzel Extrakt und Primelwurzelextrakt 12/2010

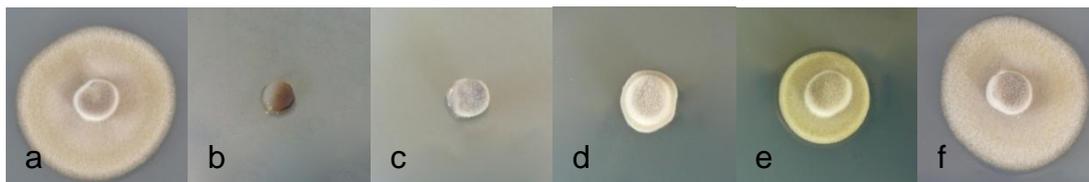
In Abbildung 13 sind die Effekte von Mischungsvarianten aus *Primula veris* Extrakt und Seifenkrautwurzelextrakt dargestellt. Alle Varianten mit Ausnahme der unbehandelten Kontrolle hemmten die Entwicklung der Konidien stark. Bei der Variante Primelwurzel 4 g/100 ml + Seifenkraut 6 g/100 ml in 6%iger Verdünnung war ein geringer Anteil kurz gekeimter Sporen zu erkennen.

#### 4.1.2. Nachweis der fungiziden Wirkung auf das Mycelwachstum von *V. Inaequalis*

Das Mycelwachstum von *V. inaequalis* wurde durch das Butanol-Extrakt der Waschnuss am wirkungsvollsten inhibiert. Das Kastanienextrakt zeigte eine ähnlich hohe Wirkkonzentration. Ab einer Konzentration von  $\geq 0,5\%$  Pulver konnte für beide Präparate eine fungizide Wirkung nachgewiesen werden. Saponaria- und Yuccasaponin zeigten ab einer Konzentration von  $\geq 0,1\%$  ein fungizides Potenzial, für das Quillajasaponin konnte nur eine fungistatische Wirkung nachgewiesen werden.

**Tab.14:** IC<sub>50</sub> Wachstumshemmtest

Pflanzenmaterial	IC <sub>50</sub> Butanol Extrakt [ppm]	IC <sub>50</sub> Standard [ppm]	fungizides Potential
Waschnuss	140	-	≥ 0,5 % fungizid
Kastanie	180	170	≥ 0,5 % fungizid
Saponaria	230	-	≥ 1 % fungizid
Quillaja	-	830	fungistatisch
Yuccasaponin	640	6200	≥ 1 % fungizid



**Abb. 14:** Hemmung des Mycelwachstums von *V. inaequalis* durch Saponine der Waschnuss: Kontrolle (a) Waschnussaponin 10 000 (b), 5 000 (c), 1 000 (d), 500 (e), 100 ppm (f)

## 4.2. Analyse der Nährmedienwirkstoffe

### 4.2.1. Saccharide- und Zuckeralkohole

Einen Überblick über die identifizierten Saccharide/Zuckeralkohole und ihre Quantifizierung gibt Tabelle 12. In den Proben von TSB 9% konnte eine hohe Glucosekonzentration von etwa 27 540 ppm nachgewiesen werden. Saccharose, Lactose und Fructose kamen in geringeren Mengen vor. Das Hefeextrakt wies neben einem Glycerinpeak mit 6 684 ppm, nur einen kleinen Mannitolpeak mit 492 ppm auf. In den beiden Nährmedien Pepton Casein und Pepton Soja konnten Anteile von Saccharose, Lactose und Glycerin nachgewiesen werden. Beim Pepton Soja konnte zudem ein Fructosepeak mit 5.490 ppm detektiert werden. In den Casaminoacids wurden mit Ausnahme von geringen Mengen an Glycerin keine Saccharide/Zuckeralkohole nachgewiesen.

**Tab. 15:** Konzentration der Saccharide/Zuckeralkohole [ppm] die mit der HPLC bestimmt wurden

Zucker/-alkohole [ppm]	TSB 9 %	Hefeextrakt Leiber 6 %	Pepton Casein 6 %	Pepton Soja 6 %	Casaminoacids 6%
Saccharose	5.706	0	3.750	7.620	0
Lactose	4.032	0	4.980	1.710	0
Glucose	27.540	0	0	0	0
Mannose	0	0	0	0	0
Fructose	4.437	0	0	5.490	0
Glycerin	0	6.684	1.176	3.090	360
Mannitol	0	492	0	0	0
Sorbitol	0	0	0	0	0
Summe	41.715	7.176	9.906	17.910	360

0 = nicht nachweisbar

## 4.2.2. Aminosäuren

Die Konzentration der freien Aminosäuren, die in den Nährmedien mittels HPLC und TLC bestimmt werden konnten ist in Tab. 16 angegeben. Die Berechnung der Gesamtmenge an freien Aminosäuren erfolgte auf Basis der HPLC-Werte, da diese eine höhere Genauigkeit als die abgeschätzten TLC-Werte aufweisen. Die TLC Werte wurde nur für die Berechnung verwendet, wenn keine Werte aus der HPLC-Analyse vorlagen. Die höchste Konzentration an freien Aminosäuren konnte bei den Casaminoacids mit 51 540 ppm nachgewiesen werden. Dabei war die Glutaminsäure mit einer Retentionszeit von 8,55 min und 14 010 ppm bei Casaminoacids die mengenmäßig wichtigste Fraktion. Auch in der TLC-Analyse wies die Glutaminsäure, mit einem Rf-Wert von 0,6 und geschätzten 12 000 ppm, die größte Bande (Abb. 9) auf. Weitere wichtige Aminosäuren waren die Asparaginsäure, Valin und Prolin mit Konzentrationen von etwa 4 560 bis 5 400 ppm. Andere Aminosäuren kamen in geringeren Konzentration oder in Spuren vor. Asparagin, Tryptophan, Histidin und Lysin konnten nicht nachgewiesen werden. Im TSB-Präparat konnte eine Konzentration von etwa 38 385 ppm an freien Aminosäuren detektiert werden. Leucin stellte mit etwa 16 740 ppm die dominante Aminosäure dar. Mit Hilfe der TLC konnte neben Leucin auch eine hohe Konzentration Isoleucin (4 500 ppm) nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von Cystein, Lysin und Tyrosin konnten alle anderen Aminosäuren qualitativ bestimmt werden. Im Pepton Soja Präparat war ebenfalls Leucin, mit etwa 5 520 ppm, die wichtigste Aminosäure. Alle anderen Aminosäuren wurden nur in Konzentrationen von weniger als 3 000 ppm oder in Spuren nachgewiesen. Im 6%igen Hefeextrakt konnten Leucin, Prolin und Valin in Konzentrationen von über 4 000 ppm detektiert werden. Mit der TLC-Analyse wurden Leucin und Valin ebenfalls in größeren Mengen quantifiziert, das Vorhandensein von Prolin konnte nicht bestätigt werden. In dem Nährmedium Pepton Casein konnten, bis auf Tryptophan, alle analysierten Aminosäuren nachgewiesen werden. Die Konzentrationen lagen zwischen 300 und 2 000 ppm. Für Glutaminsäure, Valin, Tyrosin und Leucin konnten höhere Konzentrationen von 2 250 bis 3 690 ppm detektiert werden. Das Vorhandensein von Dipeptiden in größeren Mengen konnte mit der TLC nicht bestätigt werden.

**Tab. 16:** Aminosäurekonzentration [ppm] der Nährmedien bestimmt mit HPLC und TLC

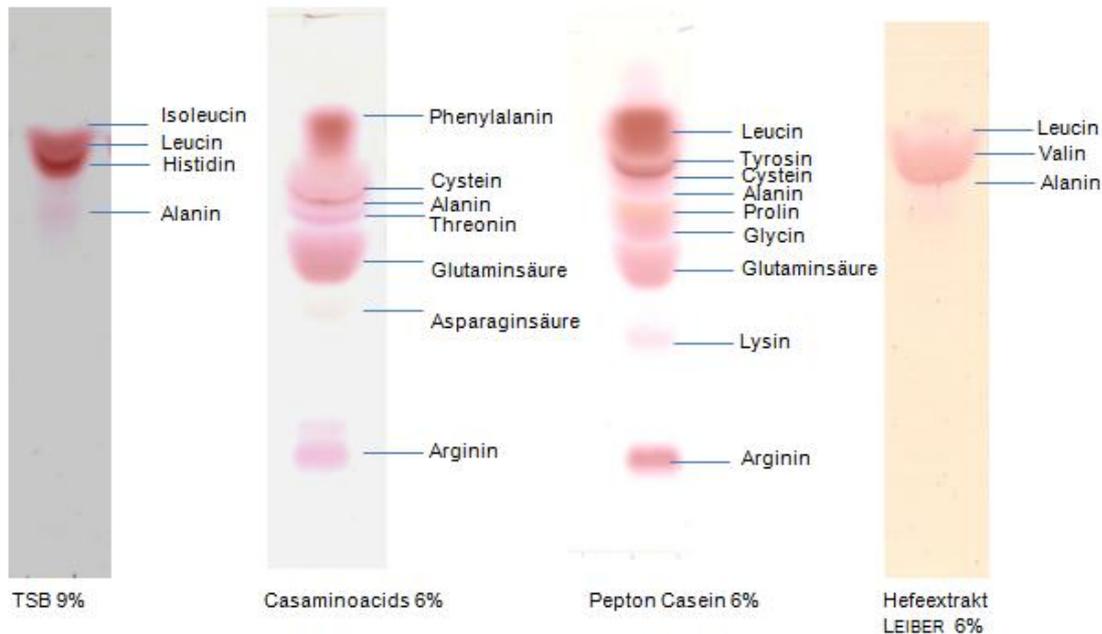
Aminosäuren [ppm]	TSB 9%		Hefe 6%		Pepton Casein 6%		Pepton Soja 6%		Casaminoacids 6%
	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC
Glutaminsäure	945	0	900	0	3.690	(1.500)	2.790	n.B.	14.010
Asparaginsäure	1.170	0	840	0	360	in Spuren	1.560	n.B.	5.400
Threonin	1.800	0	1.860	0	1.470	in Spuren	1.500	n.B.	3.420
Serin	2.295	in Spuren	735*	0	780	in Spuren	1.800	n.B.	3.300*
Alanin	3.015	in Spuren	672*	(600)	900	(300)	1.680	n.B.	2.460*
Valin	4.095	in Spuren	4.140	(6.000)	2.940	in Spuren	2.670	n.B.	4.560
Glycin	900	0	1.290	0	1.080	(1.500)	2.370	n.B.	3.090
Asparagin	765	n.B.	1.410	n.B.	630	n.B.	1.560	n.B.	0
Prolin	1.710	0	4.560	0	960	(600)	1.260	n.B.	8.490
Leucin	16.740	(22.500)	4.260	(3.000)	2.250	(2.100)	5.520	n.B.	3.510
Arginin	n.d.	in Spuren	n.d.	0	n.d.	(300)	n.d.	n.B.	n.d.
Phenylalanin	n.d.	in Spuren	n.d.	0	n.d.	in Spuren	n.d.	n.B.	n.d.
Tryptophan	n.d.	in Spuren	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	n.B.	n.d.
Cystein	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	150	n.d.	n.B.	n.d.
Histidin	n.d.	450	n.d.	in Spuren	n.d.	in Spuren	n.d.	n.B.	n.d.

<b>Isoleucin</b>	n.d.	4.500	n.d.	in Spuren	n.d.	in Spuren	n.d.	n.B.	n.d.
<b>Lysin</b>	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	150	n.d.	n.B.	n.d.
<b>Methionion</b>	n.d.	in Spuren	n.d.	0	n.d.	in Spuren	n.d.	n.B.	n.d.
<b>Tyrosin</b>	n.d.	0	n.d.	0	n.d.	3000	n.d.	n.B.	n.d.
<b>Summe</b>		<b>38.385</b>		<b>20.667</b>		<b>18.360</b>		<b>22.710</b>	

\* Serin- und Alaninpeaks waren nicht Basislinien getrennt

n.B. nicht bestimmt

In Klammern gesetzte Werte wurden nicht in die Berechnung des Gesamtaminosäuregehaltes einbezogen



**R<sub>F</sub>-Werte:** Phenylalanin 0,84; Isoleucin 0,81; Leucin 0,8; Histidin 0,76; Valin 0,76; Tyrosin 0,73; Cystein 0,72; Alanin 0,67; Threonin 0,66; Prolin 0,66; Glycin 0,65; Glutaminsäure 0,6; Asparaginsäure 0,5; Lysin 0,41; Arginin 0,23

**Abb. 15:** Mit Ninhydrin-Lösung gefärbte TLC-Banden der Nährmedien, aufgetrennt über eine Laufstrecke von 12 cm mit einem Gemisch aus 98%EtOH und 25%iger Ammoniaklösung (60:40)

#### 4.2.3 Peptide und Proteine

Bei der Bestimmung von Peptiden, mit einem Molekulargewicht zwischen 3-5 kDa, wurde mit dem Bradford-Assay beim 6%igen LEIBER Hefeextrakt mit 463 ppm die höchste Konzentration nachgewiesen (Tab. 17). Für das 9%ige TSB Präparat konnte eine Konzentration von etwa 130 ppm ermittelt werden. In den anderen Nährmedien kamen Peptide > 3 kDa nur in geringen Konzentrationen zwischen 30-80 ppm vor.

**Tab. 17:** Peptidkonzentration > 3 kDa der Nährmedien [ppm] und ihr Anteil bezogen auf die Gesamtprobenmenge

Probe	TSB 9%	Hefeextrakt Leiber 6%	Pepton Casein 6%	Pepton Soja 6%	Casaminoacids 6%
Peptide > 3 kDa [ppm]	130	463	67	80	30
Anteil an Probe [%]	0,013	0,047	0,007	0,008	0,003

Peptide mit einem Molekulargewicht < 3kDa bis hin zum Tripeptid wurden in allen Nährmedien in hohen Konzentrationen nachgewiesen (Tab. 18). Die Bestimmung erfolgte zum einen durch die Aufsummierung der Biuret-Werte aus den gelfraktionierten Proben und zum anderen durch die

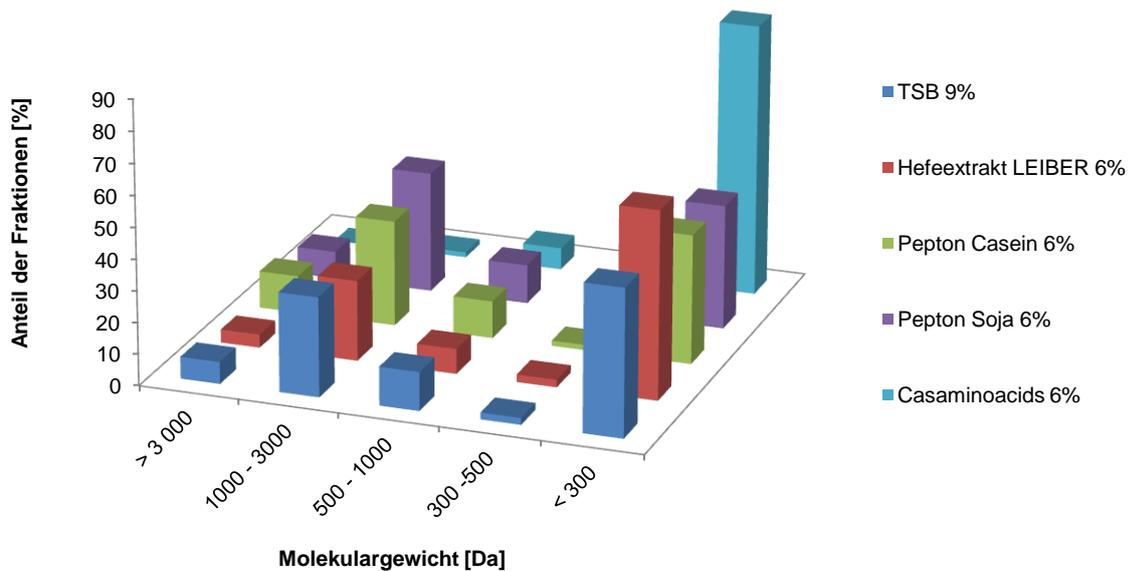
Bestimmung der Peptidmenge im Gesamtextrakt. Ein Vergleich der Ergebnisse aus den beiden Quantifizierungsmethoden zeigte signifikante Unterschiede von mehr als 10 000 ppm beim 6%igenLEIBER Hefeextrakt und dem Pepton Casein Präparat. In den anderen Medien waren die bestimmten Peptidkonzentrationen annähernd gleich groß. In den beiden Nährmedien TSB 9% und Pepton Casein 6% wurde eine Peptidkonzentration von etwa 40 000 ppm am Gesamtextrakt ermittelt. Beim Pepton Soja Präparat lag sie mit 36 709 ppm in einem ähnlich Bereich. Geringere Peptidkonzentrationen wurden im 6%igenLEIBER Hefeextrakt (24 706 ppm) und den Casaminoacids 6% (6 021 ppm) bestimmt.

**Tab.18:** Peptidkonzentrationen < 3 kDa der Nährmedien [ppm] bestimmt mit dem Biuret-Assay vom Gesamtextrakt und den Fraktionen der Gelfiltration

Nährstoffpräparat	Peptide Gesamtextrakt [ppm]	Peptide Gelfiltration [ppm]
TSB 9 %	39 622	43 416
Hefeextrakt Leiber 6 %	24 706	13 862
Pepton Casein 6 %	40 154	26 090
Pepton Soja 6 %	36 709	34 642
Casaminoacids6 %	6 021	7 748

Die Verteilung der Peptidfraktionen und Aminosäuren nach der Gelfiltration ist in Abb. 16 dargestellt. Biuret-Werte unter 300 kDa konnten anhand des Molekulargewicht-Standards als Dipeptide und Aminosäuren identifiziert werden. Da beim Biuret-Assay nur Peptide mit mindestens zwei Peptidbindungen gefärbt werden, wurden diese Fraktionen nicht weiter analysiert. Als Basis für die Berechnung der Aminosäureanteile wurden die mittels HPLC und TLC bestimmten Konzentrationen herangezogen.

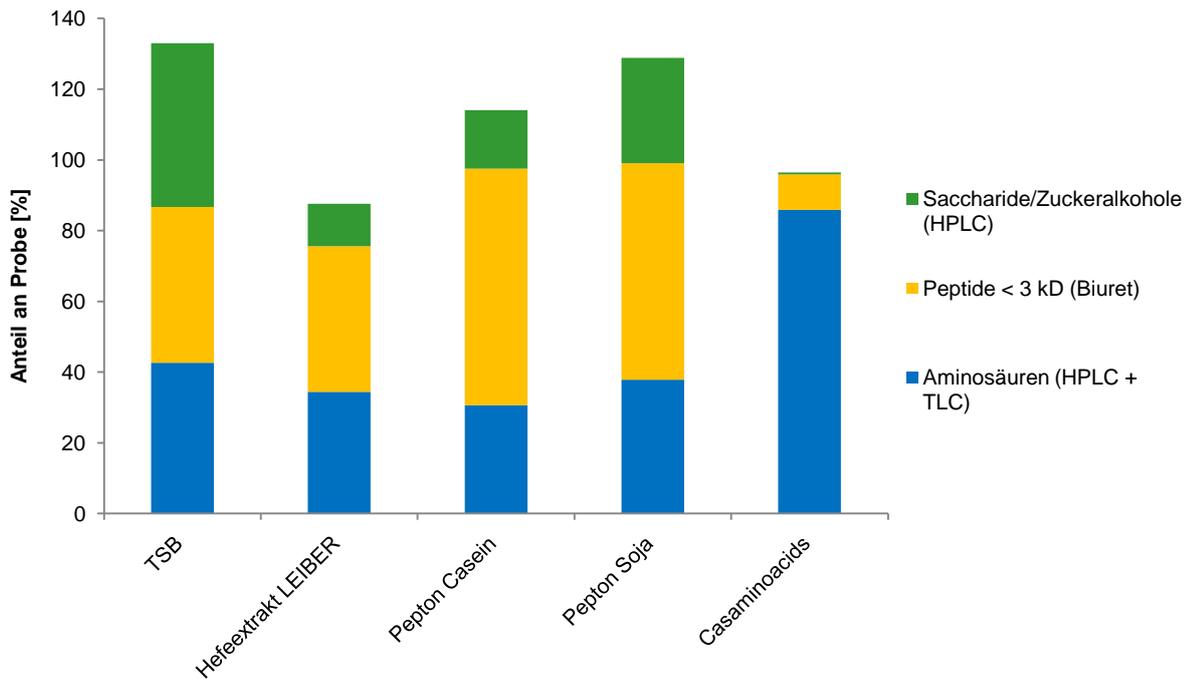
Die freien Aminosäuren stellten in allen Nährmedien die größte Fraktion dar (Abb. 16). Bei den Casaminoacids hatten sie einen Anteil von 87% an den aufgetrennten Fraktionen. Kleinere Peptide im Bereich von 300-500 Da hatten einen Anteil von 4,5%, größere Peptide von 500-1000 Da von 7%. Peptide > 1000 Da hatten keinen entscheidenden Anteil an der Zusammensetzung der Präparate. In den anderen Nährmedien war die Verteilung der Fraktionen annähernd gleich. Neben den freien Aminosäuren, die zwischen 40 und 60% der Fraktionen ausmachten, stellten größere Peptide, im Bereich von 1000-3000 Da, mit 25-28% die wichtigste Fraktion dar. Kleinere Peptide zwischen 300 und 1 000 Da, sowie Peptide > 3 000 Da hatten keinen entscheidenden Anteil an der Präparatezusammensetzung.



**Abb. 16:** Verteilung der Peptidfraktionen und Aminosäuren nach der Gelfiltration in den Nährmedien

#### 4.2.4. Charakterisierung der Präparate

In Abbildung 17 ist der Anteil der analysierten Substanzen in den Nährmedien, bezogen auf die Einwaage der jeweiligen Gesamtmenge, vergleichend dargestellt. Peptide > 3 kDa wurden nicht einbezogen, da diese nur einen Anteil von < 0,01% an der Gesamteinwaage hatten. Beim TSB ist die Verteilung der Peptide, Aminosäuren und Saccharide/Zuckeralkohole annähernd gleich. Alle Substanzen haben einen Anteil von 43 bis 46% an der Gesamteinwaage. Beim LEIBER Hefeextrakt stellen kleinere Peptide etwa 67% der Gesamteinwaage dar, freie Aminosäuren 34% und Saccharide /Zuckeralkohole 12%. Die Peptid und Aminosäureanteile beim Pepton Casein und Pepton Soja sind nahezu identisch. Peptide haben einen Anteil von 61-67%, Aminosäuren von 31-38%. Saccharide und Zuckeralkohole machen 17 bzw. 30% der eingewogenen Menge aus. Bei den Casaminoacids stellen die freien Aminosäuren mit 86% die größte Fraktion dar. Peptide haben einen Anteil von 10%, Saccharide/Zuckeralkohole von 0,6%.

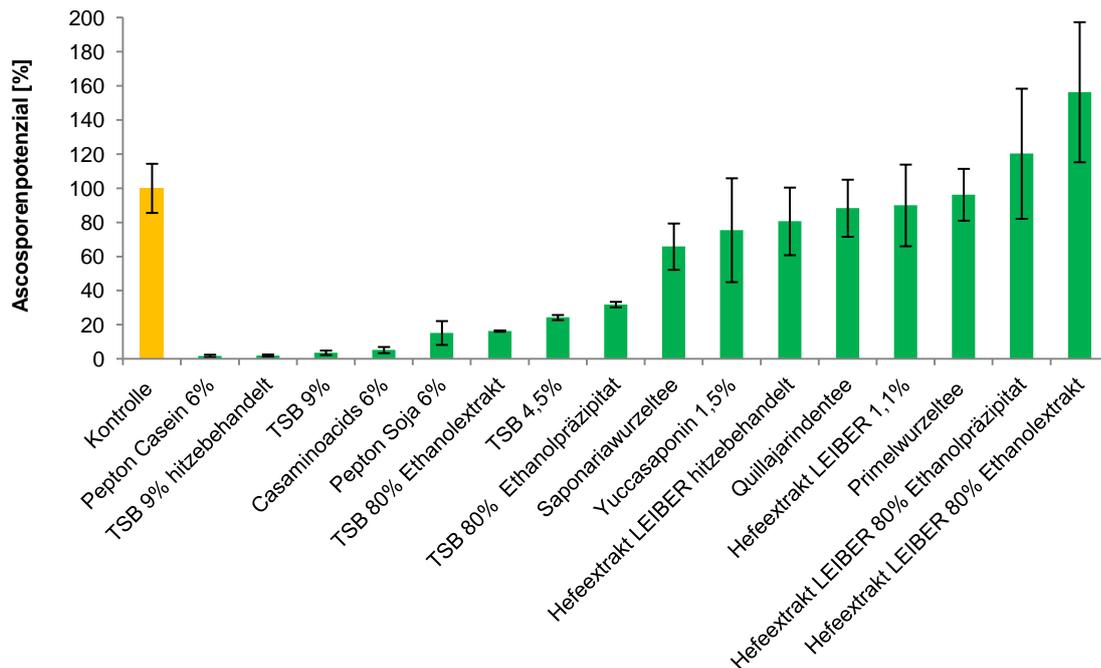


**Abb. 17:** Anteil der analysierten Substanzen an der eingewogenen Menge der Nährmedien [%]

### 4.3. Falllaubversuche 2010/2011 im Freiland

#### 4.3.1. Dossenheim

Im ersten Versuchsjahr konnten die Nährmedien auf Basis von Casein das Ascosporenpotenzial signifikant reduzieren (Abb. 18). Die wirkungsvollsten Präparate waren dabei Pepton Casein 6% und hitzebehandeltes TSB 9%, die beide zu einer Reduktion des Ascosporenpotenzials bis 98% führten. Das Ethanolextrakt- und präzipitat von 9%igem TSB wiesen einen niedrigeren Wirkungsgrad auf. Höhere TSB Konzentrationen führten zu einer stärkeren Reduktion des Ascosporenpotenzials, als niedrige. Die Casaminoacids bewirkten eine Verminderung des Sporenpotenzials um 95%. Bei den Hefepräparaten zeigte die hitzebehandelte Variante mit einem Ascosporenpotenzial von 81% im Vergleich zur Kontrolle die beste Wirkung. Das Ethanolpräzipitat und -extrakt der Hefe bewirkten eine Förderung der Ascosporenpotenzials. Die Saponine wiesen ein geringes Wirkungsspektrum zwischen 4-34% Reduktion gegenüber der Kontrolle auf, wobei der Saponariatee die beste Wirkung zeigte. Die Waschlösung der behandelten Blätter hatte einen pH-Wert zwischen 4 und 7.



**Abb. 18:** Kumulatives Ascosporenpotenzial [%] für die Falllaubbehandlungen 2010/11

Für die behandelten Falllaubdepots konnte in der Saison 2010/11 eine Korrelation zwischen dem Zersetzungsgrad der Blätter und einem verminderten Ascosporenpotenzial beobachtet werden. Alle Medien auf Basis von Casein, sowie die Hefebehandlungen bewirkten einen schnelleren Blattabbau gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Erste Anzeichen eines verstärkten Falllaubabbaus konnten bereits Ende Jan./Anfang Feb. beobachtet werden. Die Blätter wiesen im Vergleich zur Kontrolle Strukturveränderungen, sowie Läsionen und Ablösungen der Epidermis auf. In den folgenden Monaten kam es zu einem immer weiter fortschreitenden Blattabbau. Die Zersetzung war bei der mit Pepton Casein behandelten Variante am stärksten. Bei mit Saponin behandelten Falllaubdepots konnte kein verstärkter Blattabbau beobachtet werden.

#### 4.3.2. Weinsberg

##### 4.3.2.1. Regenwurmaktivität

Mit einer Durchschnittstemperatur von  $-1,9^{\circ}\text{C}$  war der Dezember 2010 der kälteste seit vielen Jahren. An nur 12 Tagen wurden Temperaturen über  $0^{\circ}\text{C}$  gemessen. Hinzu kamen außergewöhnlich starke Schneefälle. Insgesamt waren 20 Niederschlagsereignisse zu verzeichnen. Der 26.12 stellt mit einer Durchschnittstemperatur von  $-11,4^{\circ}\text{C}$  und einem Temperaturminimum von  $-18,5^{\circ}\text{C}$  den kältesten Tag dar. Die Bodentemperatur in 5 cm Tiefe lag relativ konstant bei  $2^{\circ}\text{C}$ .

Die Regenwurmaktivität war beim ersten Boniturtermin im Januar sehr gering. Pro Gitter konnten im Durchschnitt 2-3 zusammengezogene Blatthaufen gezählt werden. An diesem Termin, dem 11.01.2011, war noch keine Falllaubbehandlung erfolgt. Die Bonitur der Gitter zeigte, welche zufallsbedingte Varianz bei der Erfassung der Regenwurmaktivität vorhanden war. Die Durchschnittswerte lagen zwischen 1,7 und 3,3 zusammengezogenen Blatthaufen je Gitter. Die drei Blattdepots mit Blättern der Sorte 'GoldRush' hoben sich dagegen deutlich von diesen Werten ab. Die durchschnittliche Anzahl der nesterweise zusammengezogenen Blatthaufen lagen bei 5,7.

Die Aktivität der Regenwürmer stieg bis Anfang/Mitte März stetig an. Hinsichtlich der Regenwurmaktivität konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten festgestellt werden. Es ließ sich keine eindeutige Korrelation von Anzahl der zusammengezogenen Blatthaufen und Blattabbau aufzeigen.

Bei den 3 Boniturterminen 21. März, 29. März und 04. April konnten durchschnittlich zwischen 12 und 15 zusammengezogene Nester in den Gittern der jeweiligen Varianten gezählt werden. Im weiteren Verlauf der Saison war die Aktivität der Regenwürmer rückläufig, was nicht zuletzt darauf zurückzuführen ist, dass das Nahrungsangebot in den Gittern erschöpft war (4.3.2.2.).

#### **4.3.2.2. Blattabbau und Ascosporenpotenzial**

Die ersten Bonituren der Laubabbaurate erfolgten am 11.01. und 31.01.2011. An diesen beiden Terminen waren die Falllaubdepots noch nicht mit den zu testenden Medien und Pflanzenextrakten behandelt worden. Bei der ersten Bonitur am 11. Januar lag die Blattrestmenge in den Varianten 1-8 bei 93-95% (Durchschnitt aus 3 Falllaubdepots, die bereits vor der ersten Behandlung den einzelnen Varianten zugeordnet worden waren). Das Laub in diesen Gittern war eine Mischung von Blättern der Sorten 'Jonagold' und 'Elstar'. Bei Variante 9, Blättern der Sorte 'GoldRush', waren an diesem Boniturtermin noch 88% der ursprünglichen Falllaubmenge vorhanden. Diese Tendenz des schnelleren Blattabbaus setzte sich jedoch nicht fort. Zwar konnte bei der zweiten Bonitur im Januar ebenfalls ein schneller Abbau der Blätter der Sorte 'GoldRush' beobachtet werden (80% Restmenge), die Gitter der Varianten 1-8 wiesen jedoch gleiche oder ähnliche Werte auf. Die durchschnittliche Blattrestmenge der Depots aus 'Elstar'- und 'Jonagold' Blättern lag zwischen 80-88%. Diese Zahlen verdeutlichen, dass hinsichtlich der Blattabbaurate bereits vor Applikation der Testsubstanzen eine relativ große Varianz bestand.

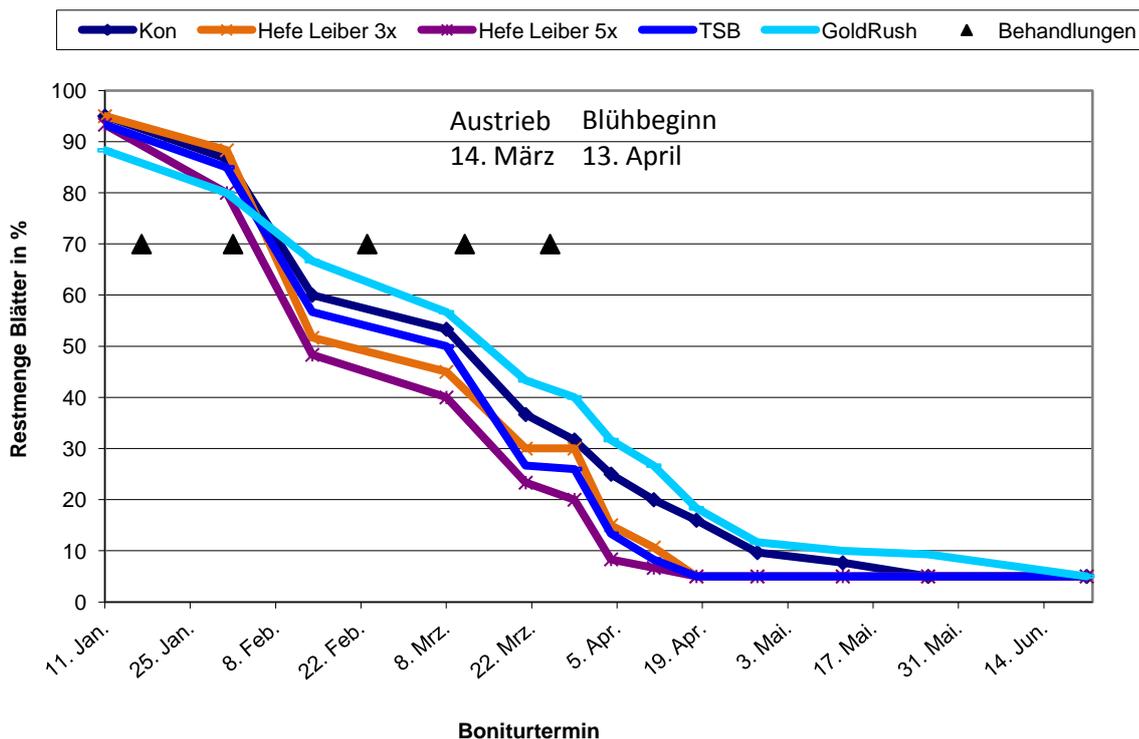
Im als relativ mild einzustufenden Februar 2011 (Durchschnittstemperatur 2,8°C) ereigneten sich die niederschlagsreichsten Ereignisse bereits am 02. und 03. des Monats. Insgesamt war die Niederschlagsmenge mit 42,9 mm verglichen mit dem langjährigen Mittel als durchschnittlich zu bewerten. Die Bodentemperatur erreichte bereits Anfang Februar Werte deutlich über 0°C und kletterte zeitweise sogar über die 5°C Marke. Daher konnte im Februar anhand von nesterweise zusammengezogenen Blatthaufen eine steigende Regenwurmaktivität beobachtet werden (siehe 4.3.2.1.). Vor allem in der ersten Februarhälfte war ein sehr rascher Blattabbau zu verzeichnen. Bei den Varianten Hefeextrakt LEIBER, TSB, Yuccasaponin und Hefeextrakt Foodgreen liegt dieser Wert im Durchschnitt bei mehr als 14% pro Woche. Bei den Gittern der Variante Hefeextrakt LEIBER mit 3 Behandlungen konnte der rascheste Abbau verzeichnet werden, mit umgerechnet 18% innerhalb von 7 Tagen.

Bei der Bonitur am 14. Februar wiesen die beiden Varianten Hefeextrakt LEIBER die geringste Blattrestmenge auf (48 und 52%). Zu diesem Zeitpunkt unterschieden sich diese beiden Varianten des Hefeextraktes noch nicht in der Anzahl der Spritzmittelapplikationen, da bis dato nur zwei Behandlungen durchgeführt wurden. Alle anderen Varianten hingegen wiesen einen Wert von 53-67% auf. In den Falllaubgittern mit Blättern der Sorte 'GoldRush' war entgegen der ersten beiden Boniturtermine der langsamste Blattabbau zu beobachten.

Von der zweiten Februarhälfte bis Anfang März verlangsamte sich der Blattabbau deutlich aufgrund der Witterungsverhältnisse. Es herrschten äußerst trockenen Bedingungen zwischen 28.2.2011 und 13.3.2011 war keine Niederschlag zu verzeichnen, erst Mitte und Ende März kam es zu kleineren Regenereignissen. Wie im Februar, konnte auch im März für die beiden Varianten des LEIBER Hefeextraktes die niedrigste Blattrestmenge verzeichnet werden (40 bzw. 45%). Ab

Mitte/Ende März zeigte auch das TSB die Tendenz den Blattabbau zu fördern. So liegt die Blattrestmenge mit 27% knapp über dem Durchschnittswert der Falllaubdepots der Variante LEIBER 5 Behandlungen (23%) (bis dato 4 Mittelapplikationen), gefolgt von LEIBER Hefeextrakt mit 3 Behandlungen (Blattrestmenge 30%). Die übrigen Varianten zeigten im Verlauf des Frühjahrs keinen klaren Trend auf, d.h. je nach Boniturtermin zeigen unterschiedliche Varianten eine höhere bzw. niedrigere durchschnittliche Falllaubrestmenge in den Gittern.

Ende März, also 2 Wochen nach dem Austrieb, (Boniturtermin 29. März) lag die Blattrestmenge je nach Variante nur noch bei 20 (Leiber 5) – 40% (Primelwurzel und GoldRush). Anfang April konnte bei LEIBER Hefeextrakt mit 5 Behandlungen, TSB und LEIBER Hefeextrakt mit 3 Behandlungen eine Blattrestmenge von 8 bzw. 13 und 15% erfasst werden, während alle anderen Varianten mehr als 20% aufwiesen. Im April und Mai schritt der Blattabbau kontinuierlich fort, so dass Mitte Mai bei LEIBER Hefeextrakt mit 3 und 5 Behandlungen, sowie TSB weniger als 5% Blattmasse vorhanden waren, gefolgt von der Kontrollvariante und Foodgreen 5 Behandlungen, die Ende Mai diesen geringen Wert erreichten. Im Juni war in keinem der Gitter noch mehr als 5% Blattmasse vorhanden, sodass Anfang Juni keine Proben mehr zur Bestimmung des Ascosporenpotenzials genommen werden konnten und am 21.6 die letzte Bonitur der Blattabbaurate erfolgte. Foodgreen 3x bzw. 5x verhielten sich im Abbau parallel zur Kontrolle. Die Variante Primelwurzelextrakt wies eine ähnliche Abbaugeschwindigkeit wie die Blätter von 'Goldrush' auf, also auch höher als die Kontrolle. Yuccasaponin war im Blattabbau zunächst vergleichbar mit Foodgreen 5x, ab 22. März war sie dann fast identisch mit der Kontrolle. Die besten Varianten lagen zu Blühbeginn unter 10% Blattrest, die übrigen zwischen 20 und 30%.



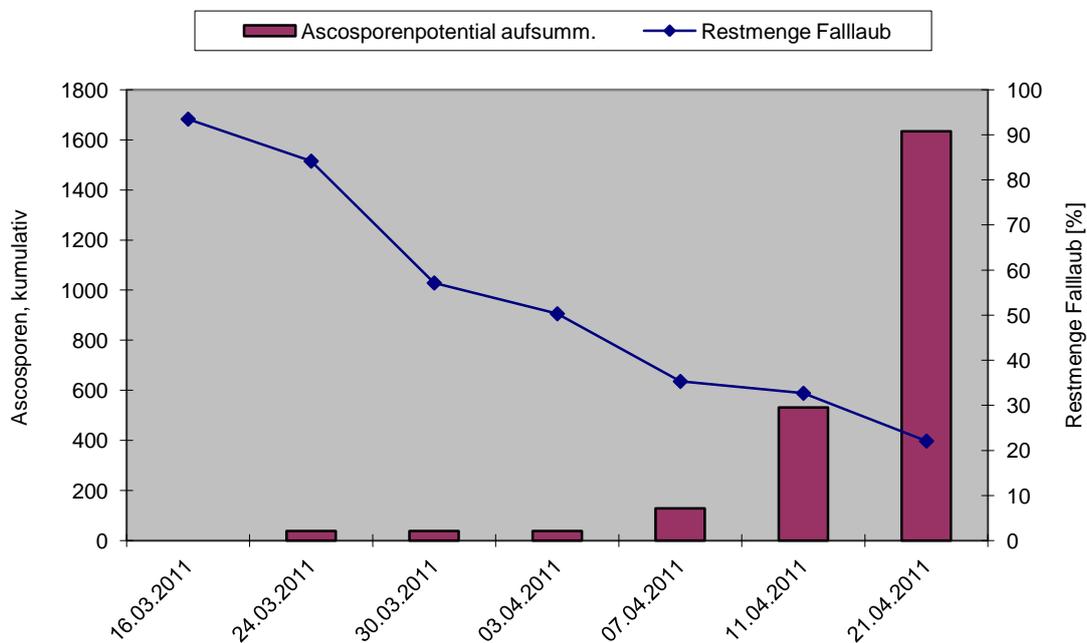
**Abb. 19:** Blattabbau des Falllaubversuches in Weinsberg im Zeitraum Januar bis Juni 2011

An den Terminen 21.4.2011 und 19.05.2011 wurden die höchsten Ascosporenwerte der Saison 2011 bestimmt. Ab dem 2. Termin, dem 24. März konnte bei allen Varianten (nicht jedoch bei allen Wiederholungen) eine geringe Ascosporenausschleuderung festgestellt werden. Diese lag im Bereich von 0-96 Sporen/ml. Bei den beiden darauffolgenden Terminen Ende März und Anfang April war bei den Varianten 1-4 zum Teil bei keiner der Wiederholungen eine

Sporenausschleuderung zu messen. Erst einige Tage später, Mitte April, ist ein deutlicher Anstieg des Ascosporenpotenzials zu verzeichnen (Abb. 20). Insgesamt war das Ascosporenpotenzial im Frühjahr 2011 am Standort Weinsberg jedoch sehr niedrig.

**Tab. 19:** kumulatives Ascosporenpotenzial in der Primärsaison 2011

Variante	16.03	24.3.	30.03	03.04.	07.04.	11.04.	21.04.	28.04.	10.05.	19.05.	26.05.	06.06.	Summe
Kontrolle	0	38	38	38	128	532	1635	2356	2683	3336	3423	3548	17756
Food-green 3x	0	6	26	26	77	212	449	551	615	769	1635	1635	6000
Food-green 5x	0	13	32	32	109	276	1224	1353	2154	2413	2519	2519	12644
Hefe LEIBER 3x	0	19	58	58	71	356	990	0	0	0	0	0	1551
Hefe LEIBER5x	0	26	83	96	125	442	0	0	0	0	0	0	772
Primel wurzel	0	32	51	77	135	494	1644	1740	2202	2673	2933	3009	14990
Yucca saponin	0	13	32	90	96	538	1090	1179	1417	1500	1875	1894	9724
TSB	0	51	64	96	183	654	962	0	0	0	0	0	2010
Goldrush	0	38	83	90	160	295	385	538	756	987	1135	1183	5650
Variante	16.03	24.3.	30.03	03.04.	07.04.	11.04.	21.04.	28.04.	10.05.	19.05.	26.05.	06.06.	Summe
Jonagold Mix	0	0	77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	77
Jonagold Mix	0	58	192	346	577	635	1192	1346	1538	1635	1692	1692	10903
Jonagold Mix	0	58	135	212	269	1269	2365	2769	4115	6769	7942	8269	34172



**Abb. 20:** Ascosporenpotenzial LVWO Weinsberg 2011 kombiniert mit dem Falllaubabbau

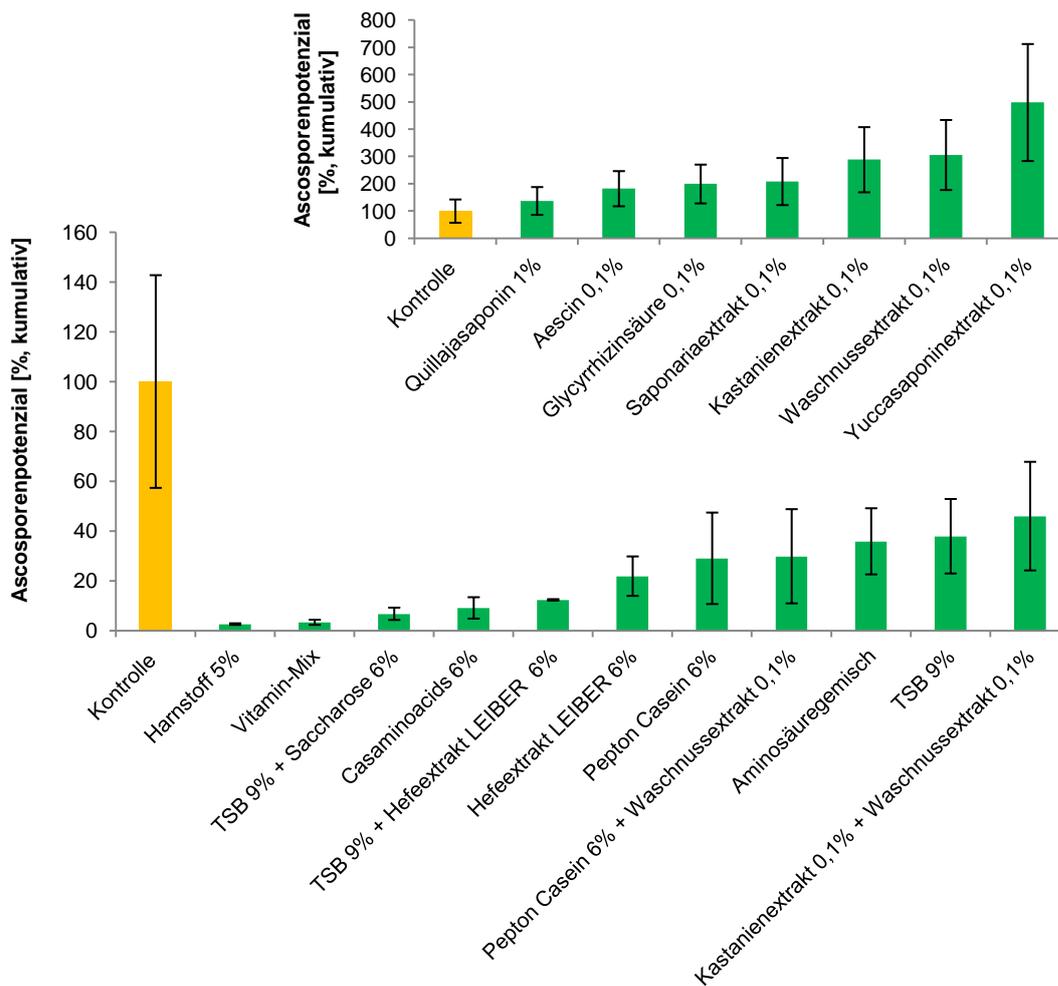
Bei beiden Varianten des Hefeextraktes LEIBER und bei TSB kam es noch vor Mai zu einem vollständigen Blattabbau in allen Gittern, sodass bei diesen Wiederholungen keine Blattproben zur Bestimmung des Ascosporenpotenzials mehr genommen werden konnten (vgl. Abb. 19 Blattabbau). Bei diesen Varianten lassen sich somit nur schwerlich Aussagen über die fungizide Wirkung dieser Substanzen treffen. Hierzu können jedoch die Versuche am JKI Dossenheim, bei denen der Bodenkontakt der Blätter verhindert wurde, Aufschluss geben (vgl. 4.3.1.).

Tendenziell lassen sich zur Wirkung der getesteten Substanzen auf das Niveau des Ascosporenpotenzials folgende Aussagen treffen: Entsprechend der Erwartungen liegt das Ascosporenpotenzial der schorfresistenten Sorte 'GoldRush' deutlich unter dem der anderen Varianten. Nur die Variante Foodgreen 3 zeigt bis zum Boniturtermin am 19. Mai ein ähnlich geringes Niveau. Das höchste Ascosporenpotenzial weist die Kontrollvariante auf, gefolgt von Primelwurzel, Foodgreen 5 und Yuccasaponin. Generell gilt, nach dem vorletzten Boniturtermin (26. Mai) steigt das kumulative Ascosporenpotenzial nicht mehr oder kaum noch an und erreicht somit das Maximum. Dieses liegt in diesem Zeitraum bei der Kontrollvariante bei rund 3500 Sporen/ml. Im Vergleich dazu liegt dieser Wert z.B. bei Goldrush bei nur etwa 1200 Sporen/ml.

#### **4.4. Falllaubversuche 2011/2012**

##### **4.4.1. Dossenheim**

Die Falllaubbehandlungen mit Harnstoff, sowie dem Vitamin-Mix führten in der Primärsaison 2012 zu einer deutlichen Reduktion des Ascosporenpotenzials um 97%. Die Casaminoacids und das Hefeextrakt LEIBER 6% reduzierten das Sporenpotenzial um bis zu 91 bzw. 78%. Von den TSB Kombinationen zeigte die Variante mit Zusatz von 6%iger Saccharose, mit einem Ascosporenpotenzial von 3% im Vergleich zur Kontrolle, die beste Wirkung. Pepton Casein 6% reduziert das Ascosporenpotenzial bis zu 71%, die Zugabe von Waschnussextrakt bewirkte keine gesteigerte Wirkung. Für alle Saponin behandelten Falllaubdepots konnte eine starke Förderung des Ascosporenpotenzials nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme war hierbei die Behandlung mit der Saponinkombination aus Kastanien- und Waschnussextrakt, bei der das Ascosporenpotenzial etwa zur Hälfte reduziert war. Der pH-Wert der abgewaschenen Ascosporensuspensionen lag zwischen 5,6 und 7,1.



**Abb. 21:** Kumulatives Ascosporenpotenzial [%] für die Falllaubbehandlungen 2011/12, unten: Präparate mit reduzierender Wirkung, oben: Präparate mit höherem Ascosporenpotenzial als in der Kontrolle

2011/12 waren Ende Januar die erste Anzeichen eines verstärkten Blattabbaus zu erkennen, der bis zum Beginn der Primärsaison am 10.04.12 weiter voranschritt. Der stärkste Abbauprozess konnte bei den mit Casaminoacids und Pepton Casein behandelten Blättern beobachtet werden. Auch für die Harnstoff, Hefe und TSB-Varianten, sowie das Aminosäuregemisch konnten leichte Strukturveränderungen gegenüber der Kontrolle dokumentiert werden. Bei dem Falllaubdepot, das mit dem Vitamin-Mix behandelt wurde, kam es zu keinem verstärkten Blattabbau. Allerdings wurden bei einzelnen Blättern Ablösungen an der Epidermis sichtbar. In den Saponin behandelten Falllaubdepots hatte kein verstärkter Blattabbau stattgefunden.

#### 4.4.2. Weinsberg

##### 4.4.2.1. Regenwurmaktivität

Die Bonitur der Regenwurmaktivität und der Blattabbaurate erfolgte vom 21.12.2011 bis 11.05.2012 in unregelmäßigen Abständen von 6 bis 26 Tagen, je nach Witterungsverhältnissen.

Bis Anfang Februar kam es entsprechend der Witterungsverhältnisse zur Stagnation der Regenwurmaktivität. Ende Januar bis Mitte Februar herrschten mit 5 bis -15°C ohne Schneedecke, aber gleichzeitiger geringer Bodenfeuchtigkeit, extrem ungünstige Bedingungen für Regenwürmer. Im März nahm die Regenwurmaktivität wieder zu, dieser bot jedoch durch sehr niedrige Niederschlagsmengen keine optimalen Bedingungen. Erst mit dem Einsetzen von Regenereignissen Anfang April stieg die Aktivität wieder deutlich an. Insgesamt zeichnete sich ab, dass Regenwürmer v.a. Präparate bevorzugen, die Aminosäuren und kleine Peptidfraktionen enthalten und die Blätterersetzung beschleunigen.

#### 4.4.2.2. Blattabbau und Ascosporenpotenzial

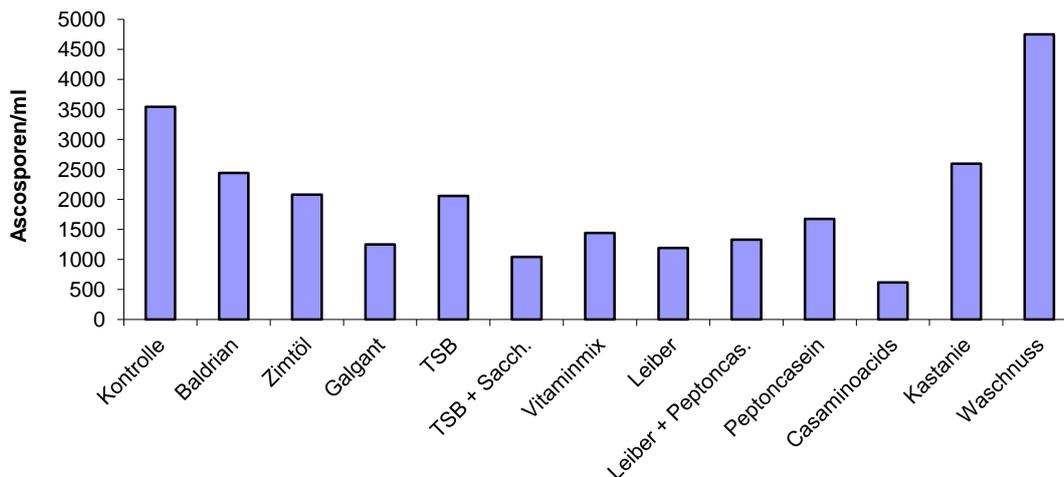
Am Standort Heuchlingen konnten die ersten Ascosporen Mitte April gefunden wurden (Blattproben vom 13.04). Das Ascosporenpotenzial blieb jedoch bis Mitte Mai auf einem relativ geringen Niveau. So lag die Anzahl der Ascospore/ml in der Kontrollvariante der Blätter mit Bodenkontakt unter 700.

**Tab. 20:** kumulatives Ascosporenpotenzial in der Primärsaison 2012

Var.	10.04.2012	13.04.2012	23.04.2012	30.04.2012	15.05.2012	18.05.2012	29.05.2012
Kontrolle.	135	513	872	686	5910	526	1179
Baldrian	0	327	288	635	2417	981	795
Zimtöl	0	1833	301	481	2256	590	590
Galgant	0	1096	583	391	3917	513	894
TSB	0	471	673	1346	0	0	0
TSB + Sacch.	0	596	442	0	0	0	0
Vitaminmix	0	244	308	346	2820	237	468
LEIBER	0	385	314	423	0	0	0
LEIBER + Pepton Casein	0	0	0	0	0	0	0
Var.	10.04.2012	13.04.2012	23.04.2012	30.04.2012	15.05.2012	18.05.2012	29.05.2012
Pepton Casein	0	231	663	519	942	115	0
Casamino- acids	0	798	308	135	0	0	0
Kastanie	0	1083	295	468	3711	538	1250
Waschnuss	0	737	551	558	5346	683	1471

Am 13. April zeigte sich wie in obiger Tabelle dargestellt ein uneinheitliches Bild mit teilweise hohen Werten bei Zimtöl, Galgant und Kastanie. Die Kontrolle mit einem Wert von 513 Ascosporen/ml lag darunter. Zehn Tage später war ein z.T. umgekehrtes Verhalten im Vergleich zum 13.4., mit hohen Werten bei Kontrolle und geringen Werten bei Galgant, Zimtöl etc. nachweisbar. Das Ascosporenpotenzial war nie an beiden Terminen hoch. Für die Kupferreduzierung wäre der Termin zur Apfelblüte am 13.04.13 wichtig gewesen. Sehr niedrige Werte an Ascosporen wiesen zu jenem Zeitpunkt LEIBER + Pepton Casein, Pepton Casein solo, Vitamin Mix, Baldrian und Leiberhefe solo auf. Die LEIBER Hefe hielt aufgrund der niedrigen Blattrestmenge das Ascosporenpotenzial über die Saison niedrig. Die höchsten Werte der Saison wurden am 15.12.12, kurz nach Ende der Apfelblüte 2012, innerhalb der Varianten Kontrolle und

Waschnuss, dicht gefolgt von Galgant und Kastanie, ausgezählt. Anders bei den Falllaubdepots ohne Bodenkontakt, die in Saatschalen ausgelegt worden waren. Ein erster Anstieg der Ascosporenzahl konnte hier bereits am 23. April festgestellt werden (2 700 Sporen/ml in der Kontrollvariante). Die Niederschlagsperiode vom 21. -24.4.12 mit moderaten maximal Temperaturen (vgl. Abb. 34) stellte den wichtigsten Infektionstermin dar. Als Referenz dafür, ob ein Mittel das Ascosporenpotenzial reduziert hätte oder nicht, wurden Varianten in Schalen angelegt. Am besten schnitten hierbei Casaminoacids mit 615, TSB + Saccharose mit 1 038 und LEIBER Hefe mit 1 192 Ascosporen ab. Im Vergleich dazu lag die Kontrolle bei 3538 Ascosporen, bei Waschnuss hingegen war sogar ein auf Ascosporen fördernder Effekt zu beobachten. Der Wert lag hier bei 4 749 Ascosporen/ml (im vgl. bei Bodenkontakt 5 910 (Ascosporen/ml)).

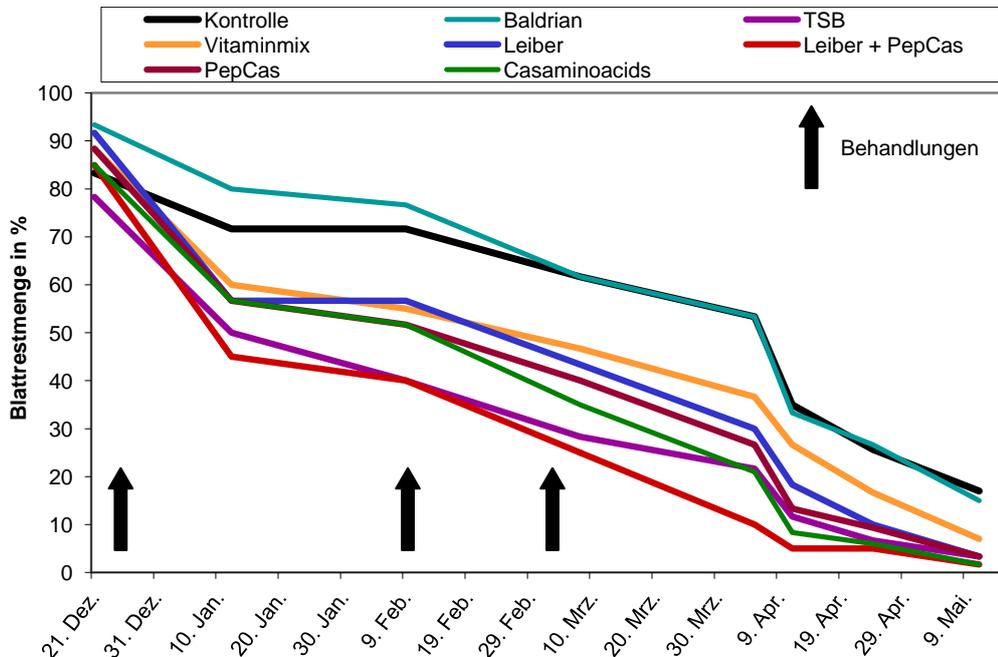


**Abb. 22:** Ascosporenpotenzial in Schalen am 15. Mai 2012

Der höchste Wert wurde sowohl bei den Varianten mit, als auch bei jenen ohne Bodenkontakt am 15. Mai festgestellt. Hier lag die Anzahl der Sporen/ml bei 3 500 bzw. 5 800 Sporen. Bereits Anfang Juni ging das Ascosporenpotenzial wieder auf sehr niedrige Werte zurück. Mit Beginn der Ascosporensaison war der Blattabbau in den Gittern der Variante LEIBER mit Pepton Casein bereits so stark vorangeschritten, dass eine Probenentnahme zur Ermittlung des Ascosporenpotenzials bereits nicht mehr möglich war. Gleiches gilt für die Variante TSB mit Saccharose ab dem 30. April, sowie die Varianten LEIBER, TSB und Casaminoacids ab dem 15. Mai. Somit hat es sich als sehr nützlich erwiesen, den Versuchsaufbau in Heuchlingen um Blattdepots ohne Bodenkontakt zu erweitern, nicht zuletzt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten mit den in Dossenheim gewonnenen Ergebnissen zu erzielen.

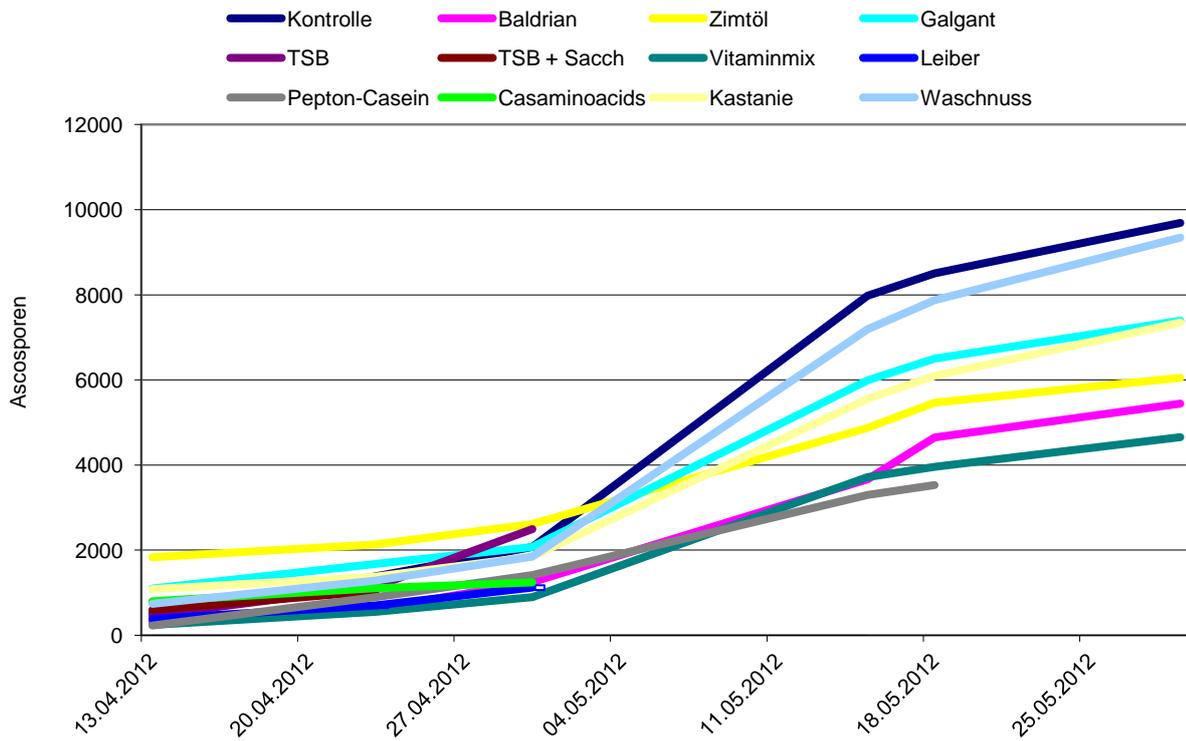
Die Ergebnisse für die Falllaubdepots ohne Bodenkontakt sind in Abb. 16 dargestellt. Aufgrund des sehr niedrigen Ascosporenpotenzials zu Beginn der Probenentnahme, wurden nur die Werte vom 11. bis 29. Mai berücksichtigt. Werden die Werte dieser Boniturtermine kumuliert betrachtet, zeigt sich, dass die beiden Saponinvarianten Waschnussextrakt und Kastanienextrakt, entgegen der keimhemmenden Wirkung in den vorab durchgeführten Labortests, das Ascosporenpotenzial nicht effektiv herabsetzen konnten. Während durch das Kastanienextrakt, Vergleichen mit der unbehandelten Kontrollvariante, immerhin noch eine Reduktion des Ascosporenpotenzials um 15% zu beobachten war, führte das Waschnussextrakt zu einer um 20% gesteigerten Freisetzung der Ascosporen. Eine ebenfalls nur mäßige Reduktion des Ascosporenpotenzials auf 61 bzw. 59% wurde durch die Behandlung des Falllaubs mit Zimtöl oder Baldrianextrakt erzielt. Die Varianten

TSB, LEIBER und Pepton Casein, Galgant und Pepton Casein solo bewegen sich im mittleren Bereich, mit einer Reduktion des Ascosporenpotenzials um rund 60%. Die deutlichste Reduktion des Ascosporenpotenzials (auf 19%) konnte, wie auch bereits im Versuch des Vorjahres, durch die Behandlung der Blätter mit Casaminoacids erzielt werden. Etwas schlechter in der Wirksamkeit sind TSB und Saccharose, LEIBER und der Vitaminmix einzustufen (25-30% der Ascosporenmenge in der Kontrollvariante). Ein möglichst vollständiger Blattabbau wäre für die Termine anzustreben gewesen, an denen das Ascosporenpotenzial über 2 000 gestiegen war.



**Abb. 23:** Blattabbaurate in Weinsberg , Dezember 2011 bis Mai 2012

Zwischen dem ersten Boniturtermin im Dezember und dem zweiten Boniturtermin Anfang Januar konnte ein deutlicher Blattabbau festgestellt werden zwischen 22 (Kontrolle) und 80 g (LEIBER + Pepton Casein) in 22 Tagen. So lag die Blattrestmenge bei den beiden zu diesem Termin besten Mittelzubereitungen (Leiber + Pepton-Casein, TSB) bei 45 bzw. 50%. Auch bei LEIBER, TSB, TSB und Saccharose sowie Casaminoacids mit einer Blattrestmenge von weniger als 60 % zeigte sich bereits deren förderliche Wirkung auf den Blattabbau, die sich auch im weiteren Versuchszeitraum bestätigte. Bei den Varianten mit dem langsamsten Abbau hingegen waren noch 70- 80% der ursprünglichen Blattmenge vorhanden (Baldrian, Kontrolle und Kastanie). Zu Vegetationsbeginn im März lag die Blattrestmenge bei 60%. Im Februar und März waren unterdurchschnittliche Niederschlagsmengen zu verzeichnen (Abb. 32, 33). Die Varianten Baldrian, Waschnuss und Kastanie waren schlecht in ihrem Blattabbau. LEIBER konzentriert, LEIBER + Pepton Casein und TSB + Saccharose hatten zum Zeitpunkt des Blattaustriebs einen Vorsprung von 20% gegenüber der Kontrolle hinsichtlich der Blattrestmenge.



**Abb. 24:** Ascosporenpotenzial kumulativ [%] in Weinsberg 2012



**Abb. 25 a + b:** Kontrolle 02.02.12

TSB + Saccharose 02.02.12



**Abb. 26 a + b:** Pepton Casein + LEIBER 02.02.11

Casaminoacids 02.02.11



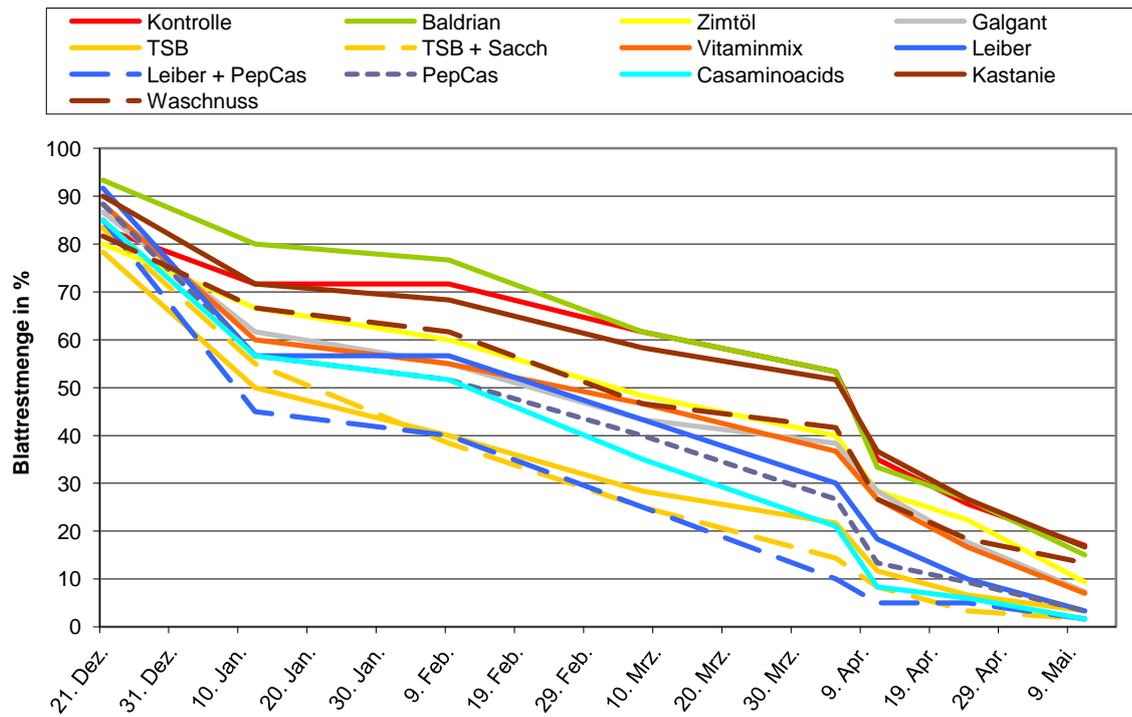
**Abb. 27 a + b:** Kontrolle 16.04.2012

Pepton Casein + LEIBER 16.04.2012

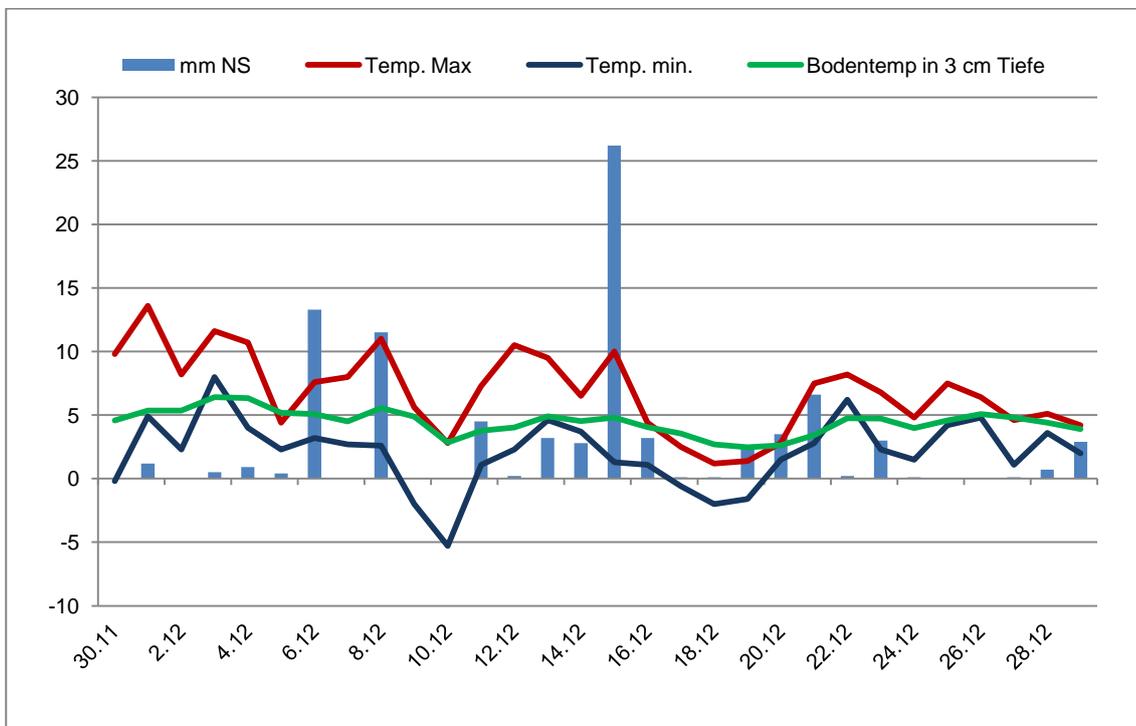


**Abb. 28 a + b:** Casaminoacids 16.04.2012

Waschnuss 16.04.2012



**Abb. 29:** Blattabbau des Falllaubversuches in Weinsberg im Zeitraum Dezember 2011 bis Mai 2011



**Abb. 30:** Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen Dezember 2011

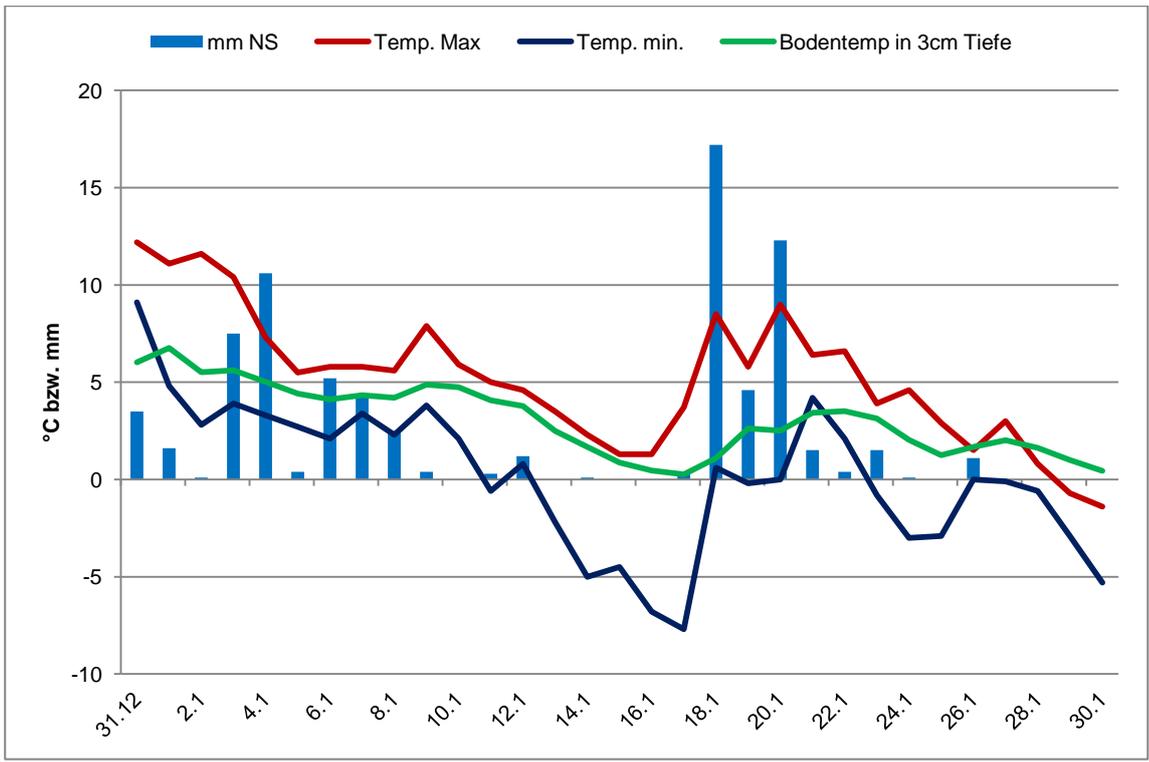


Abb. 31: Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen Januar 2012

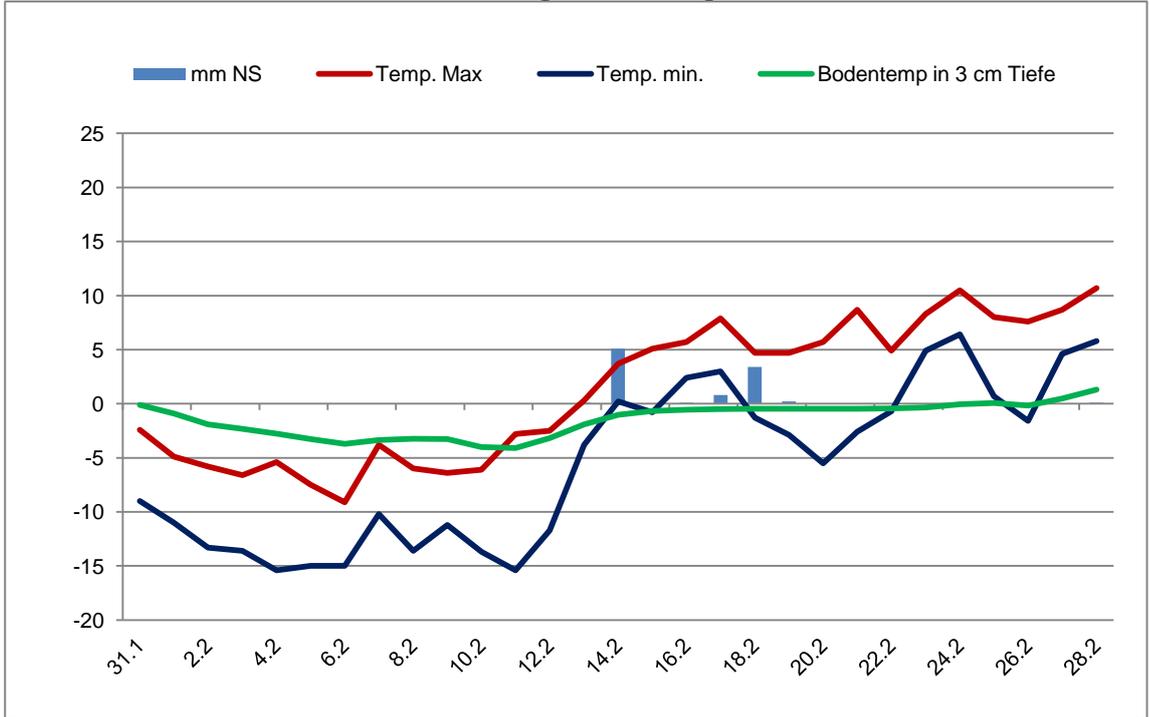


Abb. 32: Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen Februar 2012

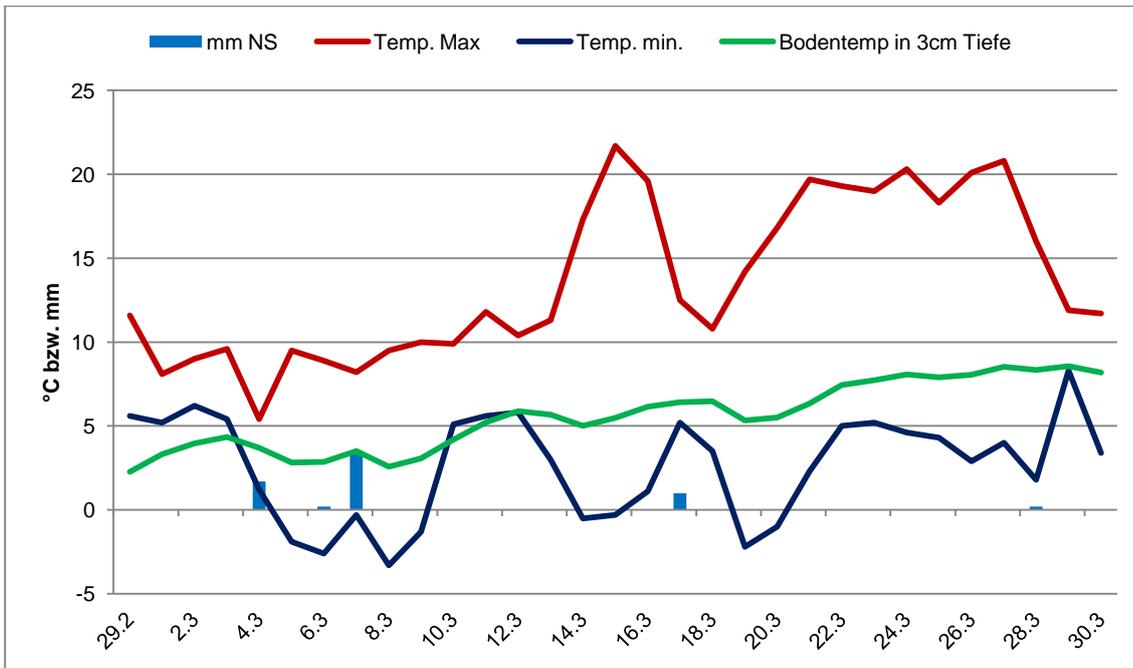


Abb. 33: Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen März 2012

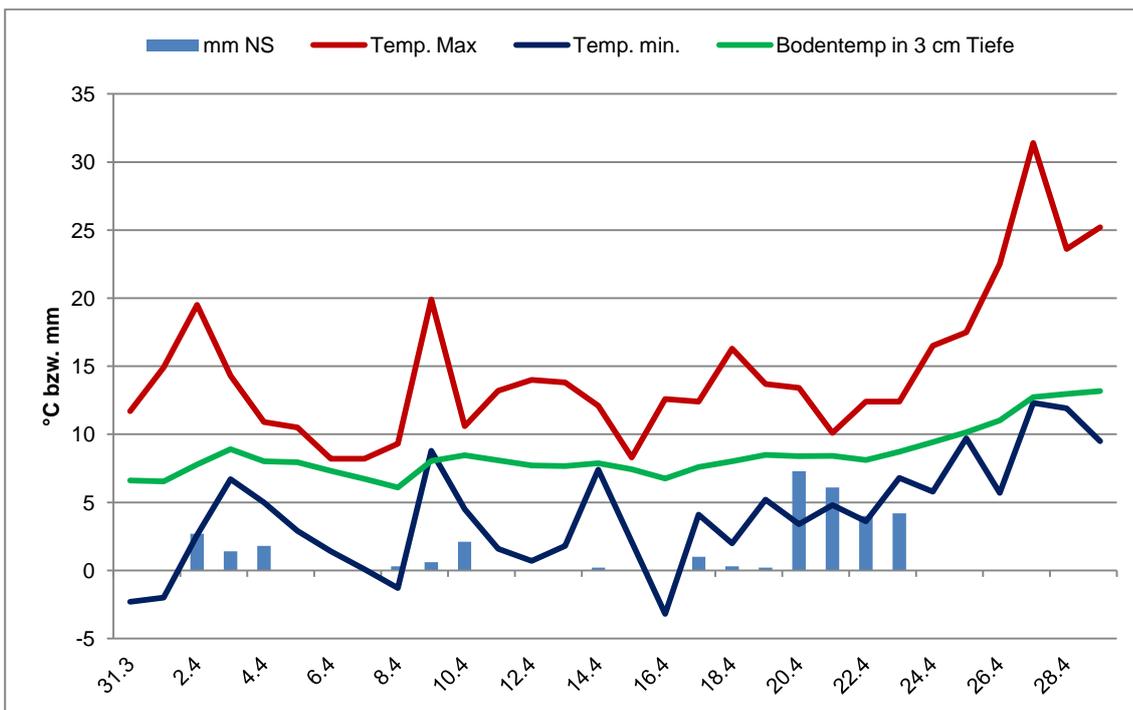
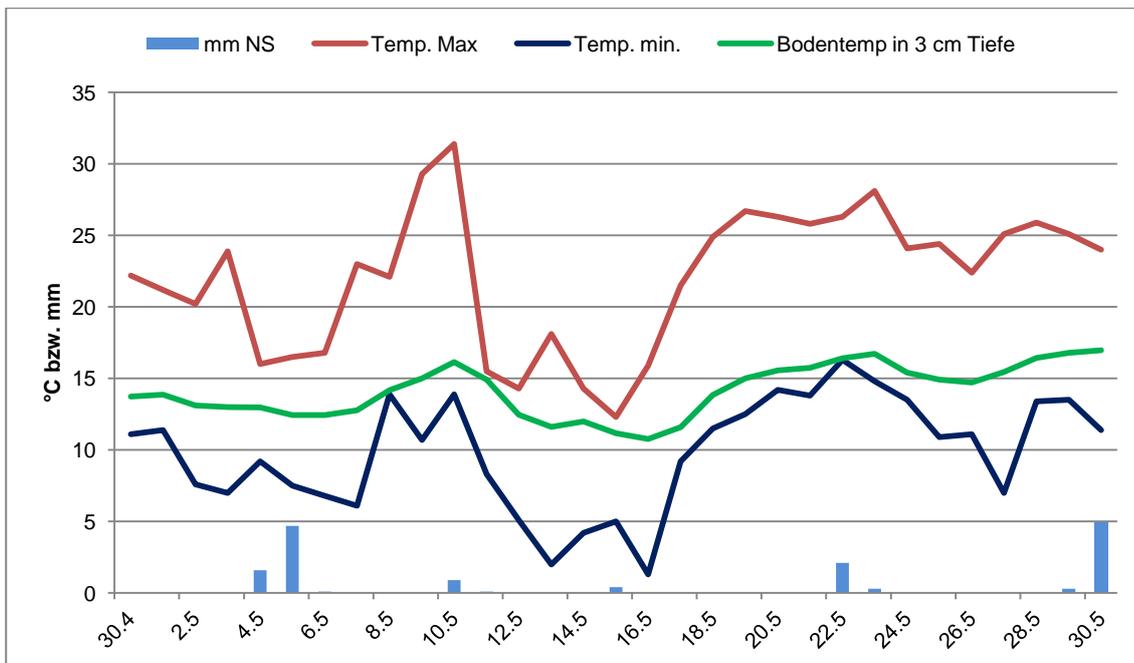


Abb. 34: Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen April 2012

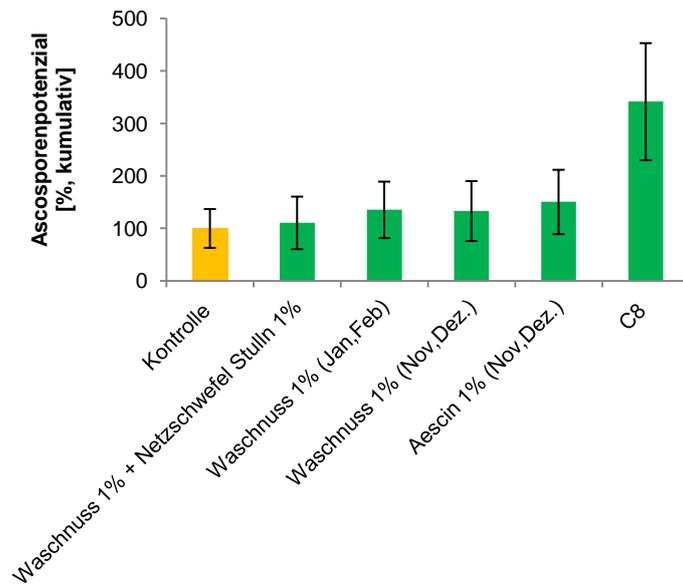


**Abb. 35:** Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen Mai 2012

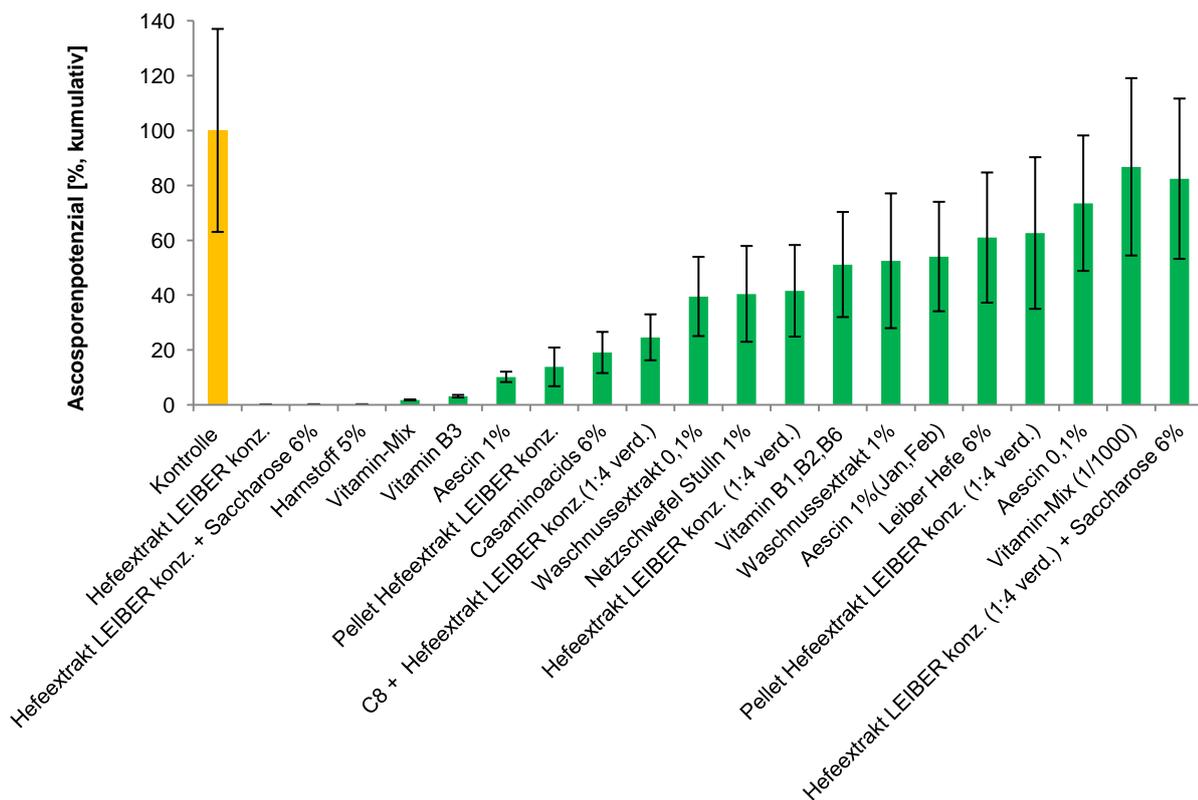
## 4.5. Falllaubversuche 2012/2013

### 4.5.1. Dossenheim

Im Versuchsjahr 2012/13 führten die Behandlungen der Falllaubdepots mit konzentriertem LEIBER Hefeextrakt und die Harnstoffkontrolle zu einer nahezu vollständigen Inhibierung der Ascosporenfreisetzung (Abbildung 37). Das Hefepellet der konzentrierten LEIBER Hefe reduzierte das Ascosporenpotenzial um etwa 90%. Die anderen Hefevarianten zeigten keine signifikante Wirkung. Für den Vitamin-Mix und Vitamin B<sub>3</sub> konnte eine Reduktion des Sporenpotenzials von 97-98 % nachgewiesen werden. Die Kombination aus Vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>6</sub> und die 1/1000 Verdünnung zeigten einen geringeren Effekt. Für die Behandlung mit dem Antagonisten C8 wurde eine Förderung des Ascosporenpotenzials um mehr als das dreifache nachgewiesen. Die 1 % ige Aescin Behandlung führte zu einer starken Verminderung des Ascosporenpotenzials um bis zu 90 %. Die 0,1 %ige Behandlung, sowie die zweifachen Applikationen zeigten einen deutlich geringeren bzw. keinen Effekt. Die Saponinbehandlungen mit dem Waschnusseextrakt wiesen einen geringeren Wirkungsgrad als Aescin auf bzw. förderten das Sporenpotenzial. Der pH-Wert der Waschlösung von den behandelten Falllaubdepots lag zwischen 5 und 6,8.



**Abb. 36:** Ascosporenpotenzial kumulativ (%) für die Falllaubbehandlungen 2012/13  
Behandlungsansätze mit höherem Potenzial



**Abb. 37:** Ascosporenpotenzial kumulativ (%) für die Falllaubbehandlungen 2012/13  
Behandlungsansätze mit reduziertem Potenzial

Im Versuchsjahr 2012/13 war ab Mitte Februar ein deutlicher Blattabbau der behandelten Blätter zu verzeichnen. Die mit konzentriertem LEIBER Hefeextrakt und den anderen Hefeextraktvarianten behandelten Blätter zeigten eine starke Zersetzung (Abb. 38). Die mit den Hefepellets behandelten Blätter wiesen keine Strukturveränderungen auf. Für die mit dem Vitamin-Mix behandelten Blätter konnten leichte Anzeichen eines Blattabbaus beobachtet werden. Die Behandlungen mit Vitamin B<sub>3</sub> und Vitamin B<sub>1</sub>; B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> hatten hingegen keinen Effekt. Der Abbau der mit den Casaminoacids und dem 6%igen Hefeextrakt behandelten Blätter entsprach den Abbauprozessen beim Harnstoff. Die Varianten Saponin, Netzschwefel und Vitamin-Mix (1/1000) bewirkten keine Förderung des Blattabbaus.



**Abb. 38:** Bonitur (27.03.13) der unbehandelten Kontrolle (A) im Vergleich zu den mit Hefeextrakt LEIBER konzentriert (B), Harnstoff 5% (C), Vitamin-Mix (D), Aescin1 % (E) und Casaminoacids6 % (F) behandelten Falllaubdepots

## 4.5.2. Weinsberg

### 4.5.2.1. Blattabbau und Regenwurmaktivität

Die Temperaturverläufe zum Blattabbau der Versuchsanlage vom Nov.'12 sind nachfolgend dargestellt. Dabei ist erkennbar, dass die Temperatur ab dem 21.12.12 in den Maximalwerten mitunter über 10°C anstieg. Bedingt durch einen Temperaturanstieg des Bodens auf 5°C steigerte sich die Regenwurmaktivität, so dass Ende Januar bereits beträchtliche Mengen an Falllaub abgebaut waren.

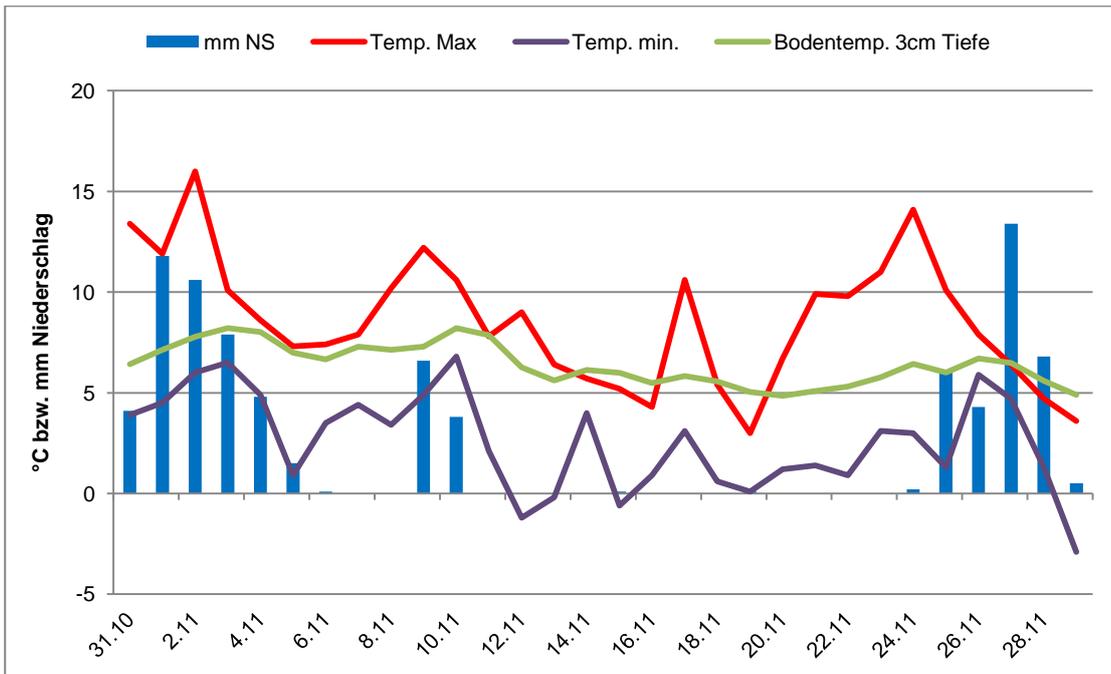


Abb. 40: Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen im November 2012

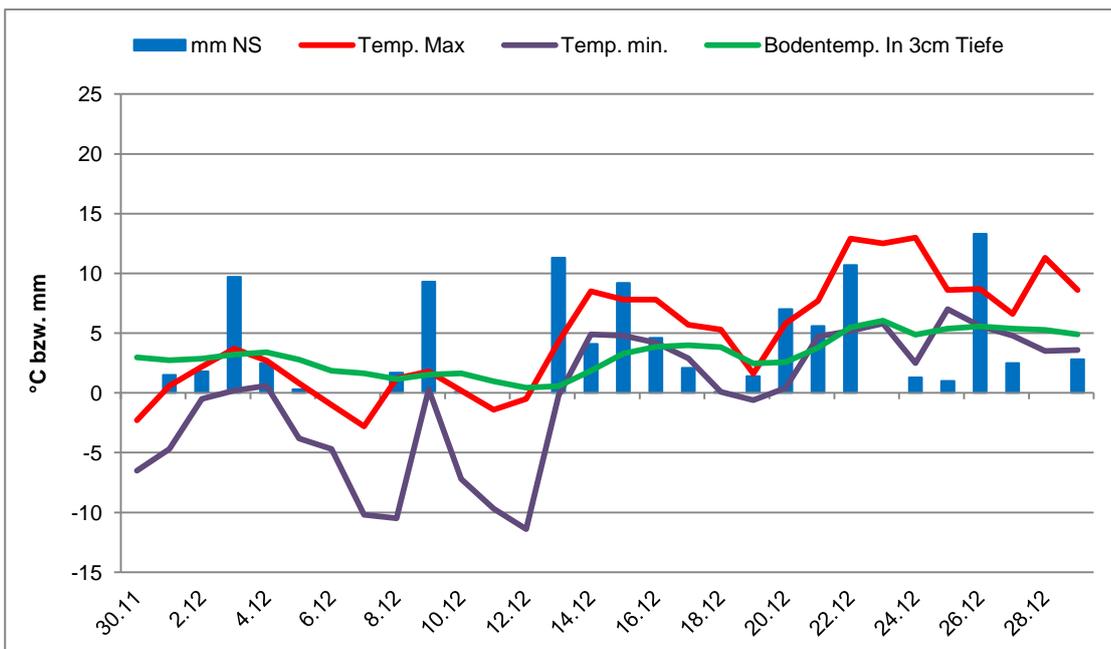
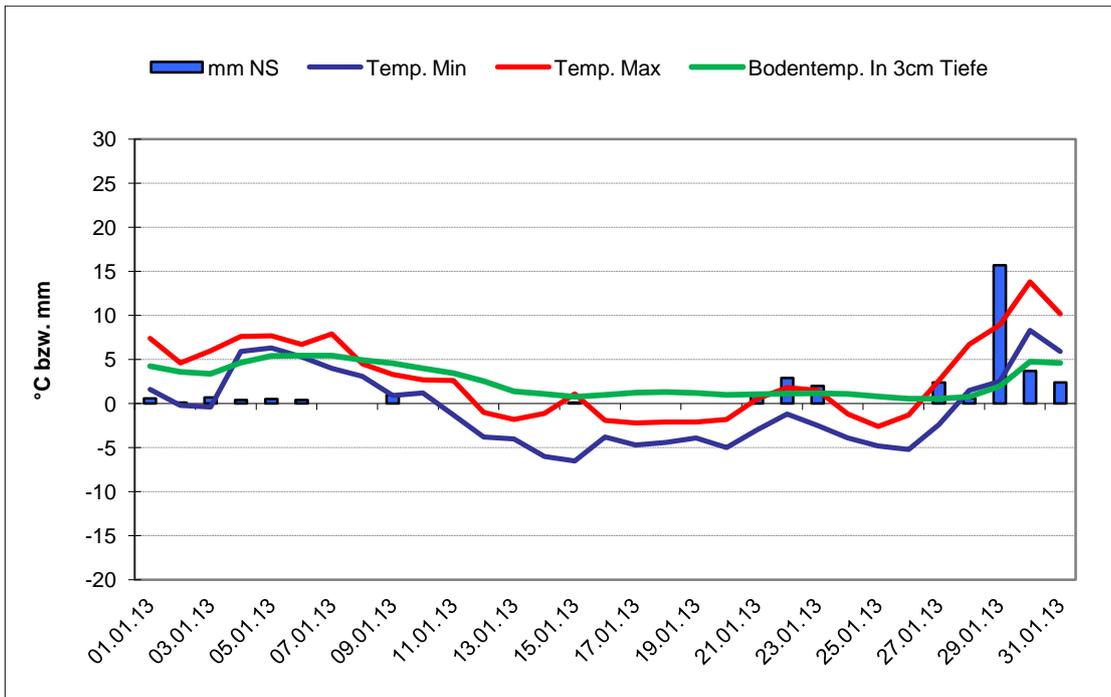
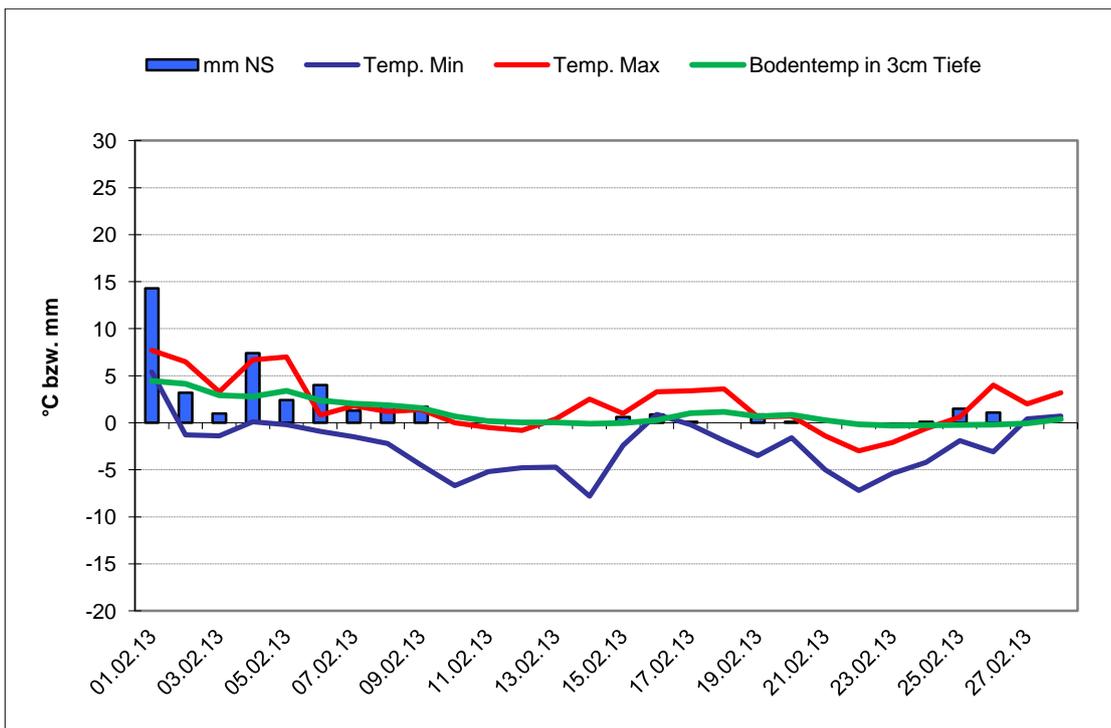


Abb. 41: Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen im Dezember 2012



**Abb. 42:** Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen im Januar 2012

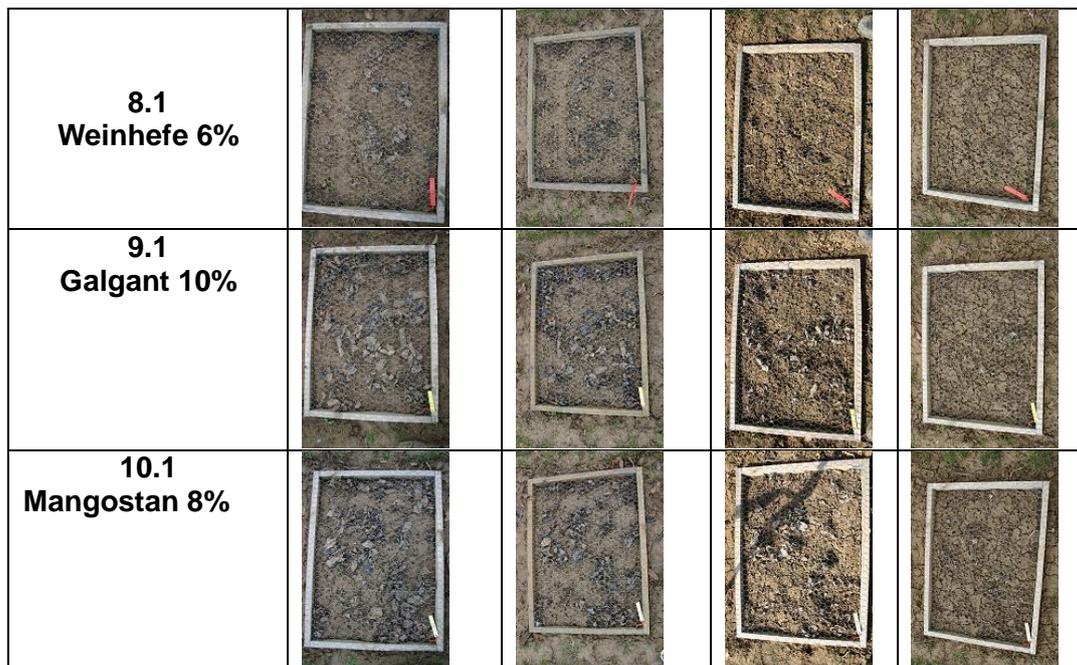


**Abb. 43:** Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen im Februar 2013

Die Versuchsanlage vom November 2012 (3.4.1.) konnte nur in geringem Umfang bonitiert werden, da die Wetterlage über den Jahreswechsel einen schnellen Blattabbau hervorrief. Dies wird in den Abbildungen zum Wetter und den Fotoreihen dazu offenkundig:

**Tab. 21:** Blattabbau der Versuchsanlage vom November 2012, Obstversuchsgut Heuchlingen, Wiederholung 1

Termin/Variante	30.1.13	18.02.13	08.03.13	22.03.13
<b>1.1 Kontrolle</b>				
<b>2.1 Waschnuss 1%</b>				
<b>3.1 Hefe Pellet</b>				
<b>4.1 LEIBER Hefe 6 %</b>				
<b>5.1 Hefe Eigenpräparat</b>				
<b>6.1 Casaminoacids 6%</b>				
<b>7.1 Vitaminmix (3 B Vitamine)</b>				



#### 4.5.2.2. Ascosporenpotenzial

Im Jahr 2013 waren aufgrund der Witterungssituation über den Jahreswechsel bereits große Teile der Falllaubdepots auf offenem Boden durch die Regenwürmer abgebaut. Lediglich die Varianten in Schalen, die angelegt wurden um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Ascosporenwerten aus Dossenheim zu gewährleisten, enthielten noch ausreichend Blattmaterial um daraus zu allen wichtigen Boniturterminen die Ascosporenzahl zu ermitteln. Die Ascosporenzahlen waren im Vergleich zu Dossenheim sehr gering.

Nach dem für die Regenwürmer günstigen Witterungsverlauf zwischen Mitte Dezember und 10. Januar lagen die Bodentemperaturen lange nur knapp über 10°C, dies war sicher für die Nachreife der Ascosporen ungünstig. Der höchste Ascosporenwert wurde am 29.4. erreicht, ein wichtiger Termin für Infektionen die ab Mitte Mai sichtbar wurden. Bei der Variante LEIBER Hefepellet waren hier 450 Ascosporen/ml zu verzeichnen, also ein mittlerer Wert. Einen ebenso mittleren Wert erreichte die Kontrollvariante mit knapp 300 Ascosporen pro ml. Die anderen Varianten hatten noch geringere Werte mit unter 200 Ascosporen/ml. Im weiteren Verlauf der Bonituren wurde kein Wert erreicht der deutlich über 200 Ascosporen lag.

**Tab. 22:** Ascosporenwerte der Schalenvarianten vom 8.4.13 bis 26.5.13, Versuchsanlage Nov. '12

Schalen	08.04. 2013	15.04. 2013	18.04. 2013	24.04. 2013	29.04. 2013	02.05. 2013	06.05. 2013	10.05. 2013	13.05. 2013	21.05. 2013	28.05. 2013
1.4. Kontrolle	0	0	0	77	269	58	173	135	192	173	0
2.4. Waschnuss (1%)	0	0	135	231	0	58	96	77	96	38	19
3.4. LEIBER Hefepellet	0	0	77	38	462	0	0	38	0	0	0
4.4. LEIBER (6%)	38	0	19	38	0	0	135	173	173	38	0
5.4 Eigenpräparation LEIBER 60%	19	0	0	0	0	0	0	0	19	0	38
6.4. Casaminoacids (6%)	0	0	38	58	58	38	58	58	38	0	0
7.4. Vitaminmix	0	0	19	77	0	0	0	58	19	19	19
8.4. Galgant (10%)	38	0	58	38	135	173	77	115	192	58	0

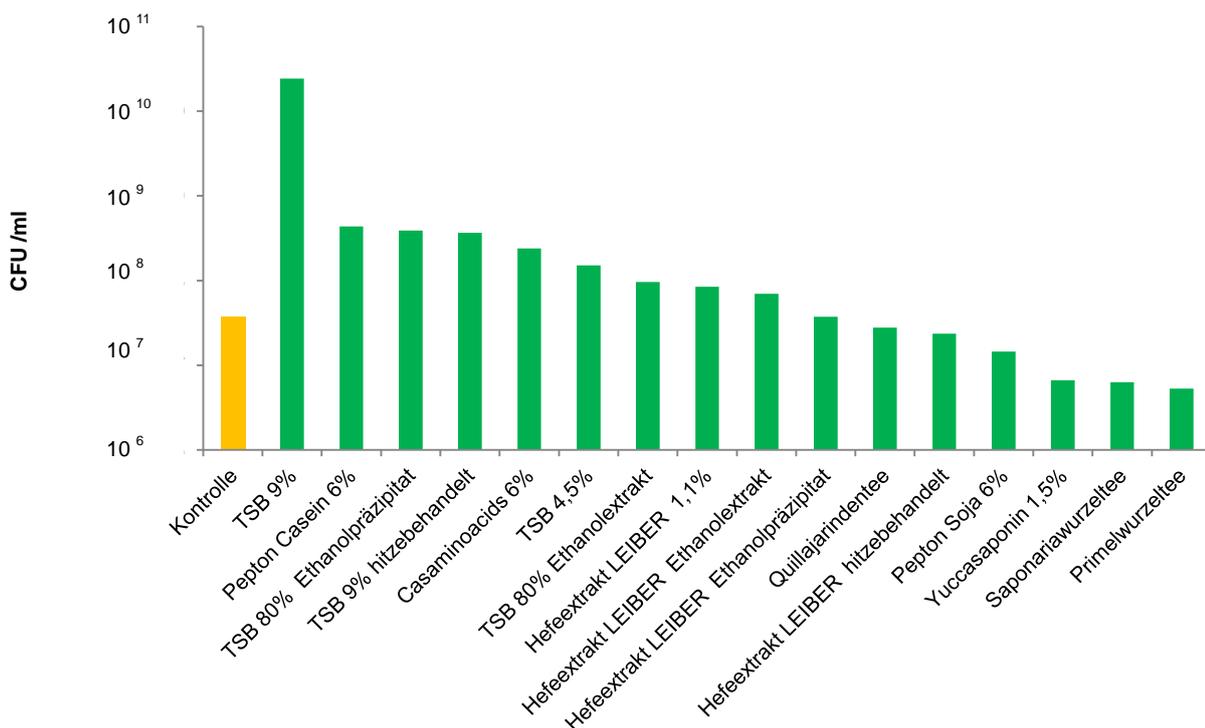
9.4. Weinhefe (6%)	19	0	38	77	115	38	115	96	212	58	0
10.4. Mangostan (8%)	77	0	96	96	38	58	58	76	38	19	0

Die Blätter waren aufgrund der geringen Niederschlagsmengen im Februar und März (siehe Wettergrafiken) oberflächlich oft ausgetrocknet, sehr trocken und brüchig. Etwas höhere Werte waren bei der Kontrollvariante, LEIBER Hefepellet und Galgant am 29.04.13 zu verzeichnen. Darüber hinaus bei Waschnuss am 24.4.13.. Ein weiterer wichtiger Termin war der 13.05.13 mit erhöhten Werten bei Galgant, Weinhefe und Kontrolle.

## 4.6. Auswirkung der Falllaubbehandlung auf die Epiphytengemeinschaft

### 4.6.1. Colony forming units (CFUs)

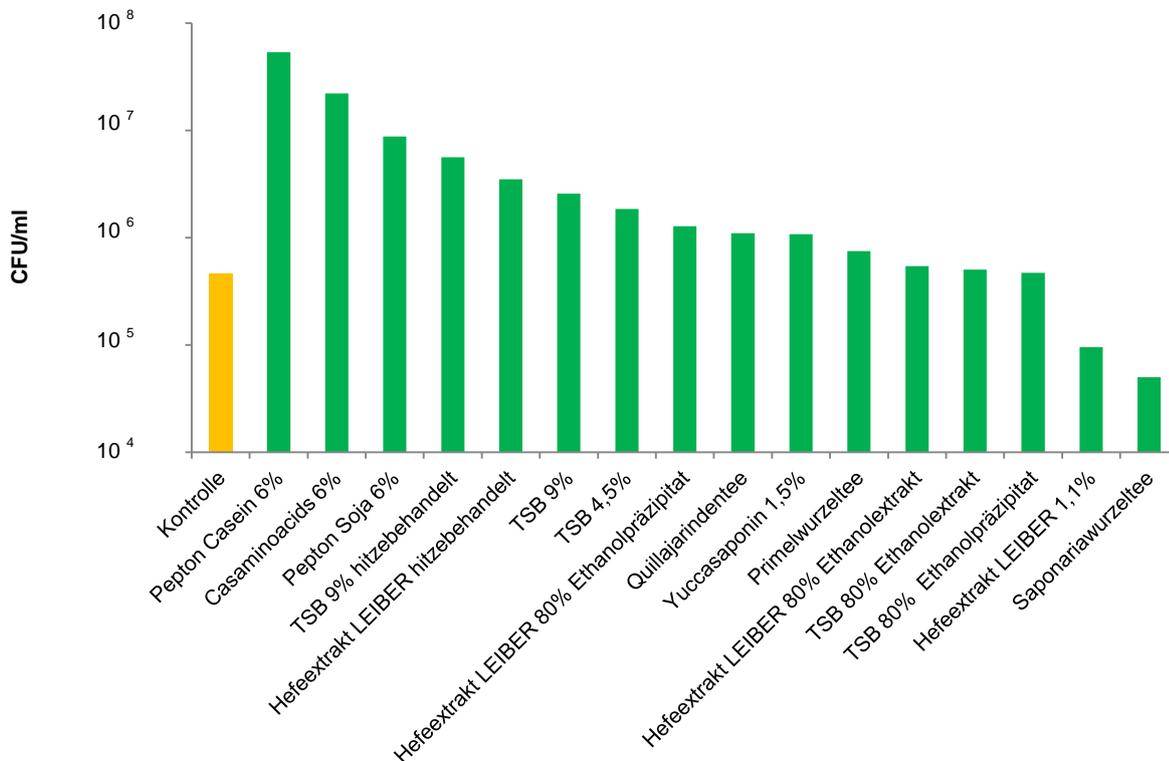
Die Quantifizierung der Falllaubepiphyten in den behandelten Blattdepots erfolgte am 08.03.11 bei einer Isolations- und Inkubationstemperatur von 20°C. Auf den unbehandelten Blättern konnte eine natürliche Bakterienpopulation von  $3,7 \cdot 10^7$  CFUs nachgewiesen werden. Die Caseinpräparate bewirkten eine starke Förderung des bakteriellen Wachstums, wobei die stärkste bei dem mit TSB 9 % behandelten Falllaubdepot, mit  $2,42 \cdot 10^{10}$  CFUs, nachgewiesen werden konnte. Die Hefepräparate führten zu einer leichten Förderung des Wachstums. Saponine hatten keinen positiven Effekt auf das Wachstum der bakteriellen Gemeinschaft.



**Abb. 44:** Koloniebildende Einheiten der Bakterien/ml am 08.03.11 bei einer Isolations- und Inkubationstemperatur von 20°C

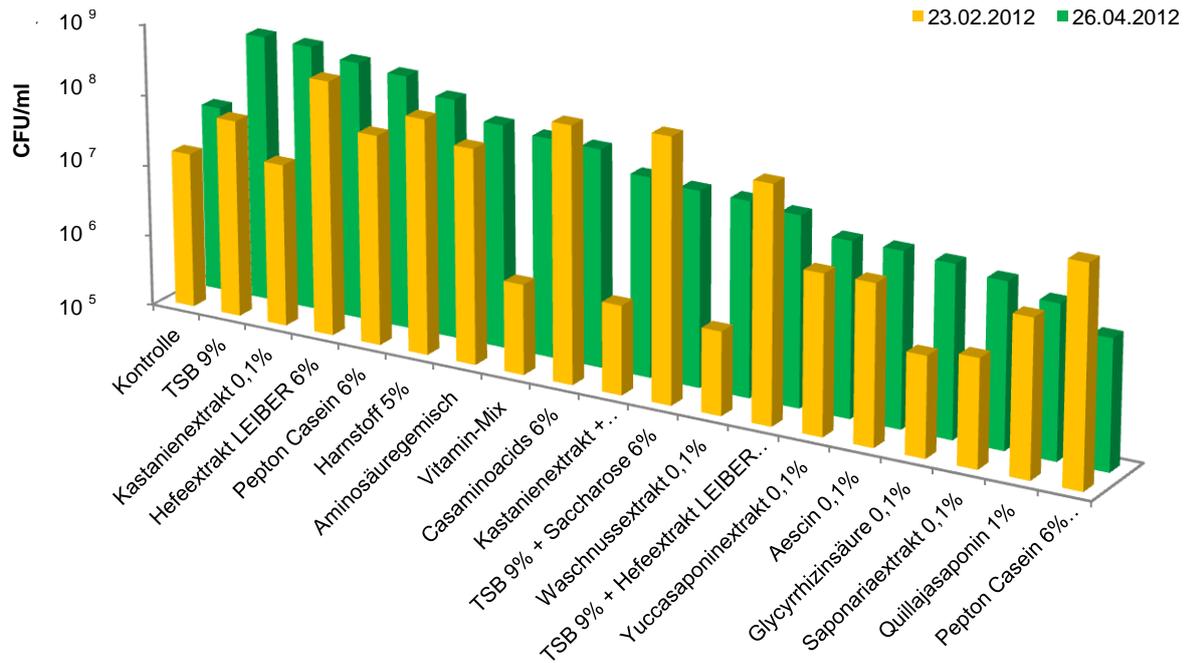
Die Pilze wiesen gegenüber den Bakterien mit  $4,65 \cdot 10^5$  CFUs eine geringere natürliche Populationsdichte auf. Die Quantifizierung der Pilze in den behandelten Falllaubdepots zeigte bei allen Präparaten, mit Ausnahme vom 1,1%igen Hefeextrakt LEIBER und dem Saponariawurzeltee,

eine Förderung der pilzlichen Epiphyten. Bei dem mit Pepton Casein 6% behandelten Falllaubdepot konnte mit  $5,37 \cdot 10^7$  CFUs die größte Population und damit auch die stärkste Förderung nachgewiesen werden.



**Abb. 45:** Koloniebildende Einheiten der Pilze/ml am 08.03.11 bei einer Isolations- und Inkubationstemperatur von 20°C

Im Versuchsjahr 2011/12 wurden die Falllaubepiphyten an zwei Terminen quantifiziert. Die erste Bestimmung der Populationsgröße erfolgte am 23.02.12, eine Woche nach der letzten Falllaubbehandlung. Die zweite Bestimmung wurde kurz nach Beginn der Primärsaison, am 26.04.12, durchgeführt. Am ersten Termin war die natürliche bakterielle Populationsstärke mit  $7 \cdot 10^6$  CFUs deutlich niedriger als Ende April mit  $4,2 \cdot 10^7$  CFUs. In der Tendenz wiesen auch die behandelten Falllaubdepots eine größere Populationsdichte zu Beginn der Primärsaison, als Ende Februar auf. So konnten im TSB 9% behandelte Falllaubdepot im April etwa  $6 \cdot 10^8$  CFUs, im Februar dagegen zehnmal weniger CFUs nachgewiesen werden. An beiden Terminen waren die Populationen der mit den Caseinpräparaten behandelten Falllaubdepots stark gefördert, dabei erwiesen sich besonders das 9%ige TSB, die Kombination mit Saccharose 6 %, die Casaminoacids 6 %, sowie das 6 %ige LEIBER Hefextrakt als effektive Präparate zur Förderung der bakteriellen Gemeinschaft. Der Vitamin-Mix zeigte einen geringen Effekt auf das Wachstum der Bakterien. Am ersten Termin war die Population niedriger, am zweiten gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Bei den Saponinen konnte keine Wachstumsförderung durch die Behandlungen nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme war die Behandlung mit 0,1 % Kastaniextrakt bei dem die Population im April mit  $5,5 \cdot 10^8$  auf das Zehnfache gegenüber der Kontrolle angewachsen war.



**Abb. 46:** Koloniebildende Einheiten der Bakterien/ml am 23.02.12 und 26.04.12

Bei den Pilzen nahm die Populationsstärke im Laufe der Primärsaison ab. Im Februar lag sie bei  $7 \cdot 10^6$  CFUs, im April war sie auf  $2 \cdot 10^6$  CFUs gesunken. Dieser Trend konnte auch bei den Behandlungen, die das Wachstum der Pilze stark förderten, wie z.B. dem Aminosäuregemisch, den Casaminoacids, den TSB Varianten und dem LEIBER Hefeextrakt beobachtet werden. Die Saponin- und Vitaminbehandlungen führten im Februar nicht zu einer Förderung des Pilzwachstums, im April konnte dann jedoch bei den 0,1 %igen Varianten des Waschnusseextraktes, der Glyzyrrhizinsäure und des Yuccasaponinextraktes eine starke Förderung des Wachstums festgestellt werden. Bei den mit Saponariaextrakt 0,1 % und dem Vitamin-Mix behandelten Falllaubdepots waren die Populationen um eine Potenz niedriger als auf den unbehandelten Blättern.

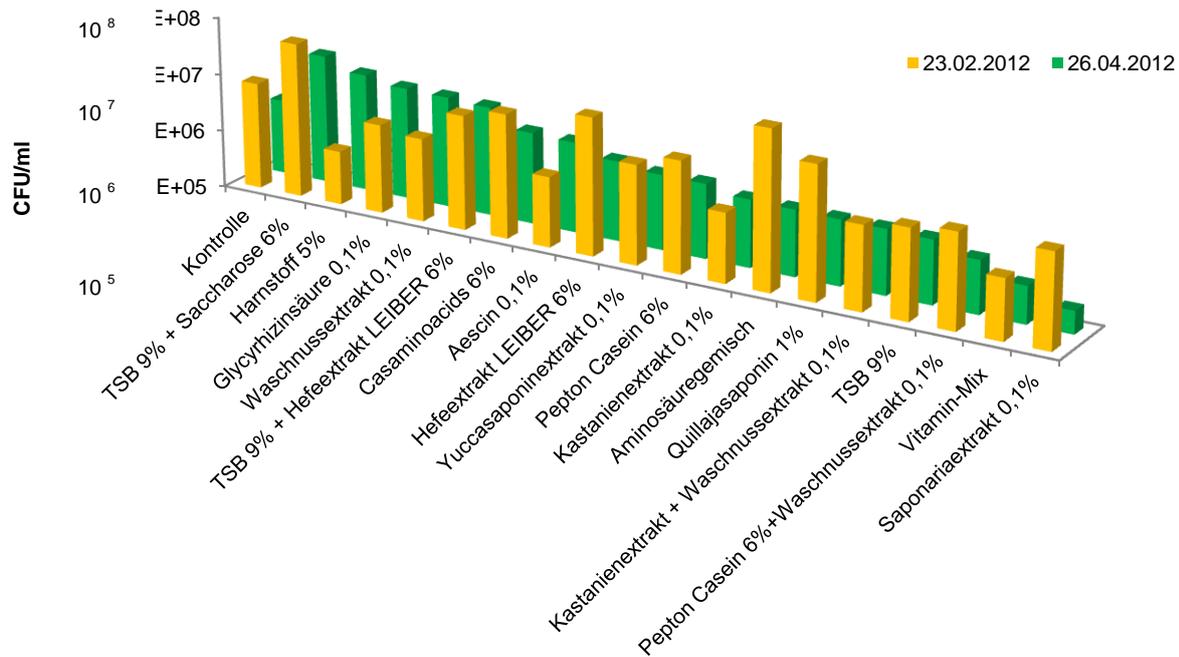
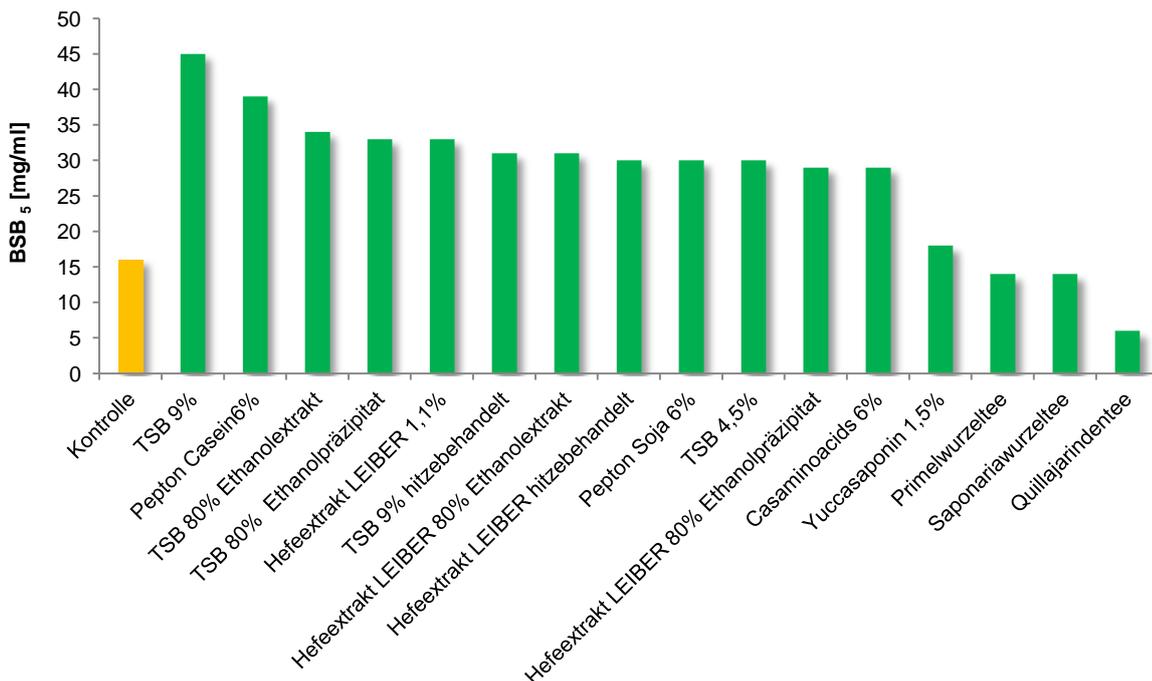


Abb. 47: Koloniebildende Einheiten der Pilze/ml am 23.02.12 und 26.04.12

#### 4.6.2. Biologischer Sauerstoffbedarf

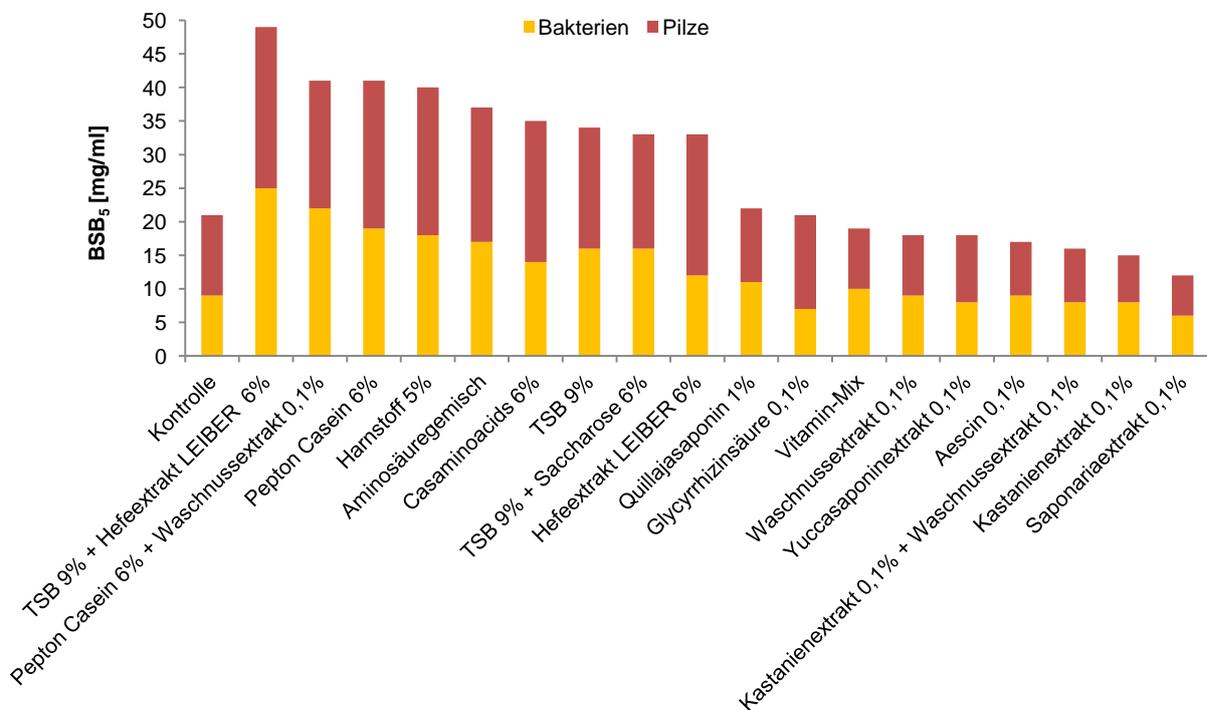
Der biologische Sauerstoffbedarf der Falllaubepiphyten lag zu Beginn der Apfelschorfprimärsaison (24.3.13) bei 16 mg/ml (Abb. 43). Die mit TSB 9% und Pepton Casein 6% behandelten Blätter wiesen mit einem BSB<sub>5</sub> von 45 und 39 mg/ml eine deutlich höhere mikrobielle Aktivität auf. Für alle anderen Casein- und Hefevarianten war der biologische Sauerstoffbedarf gegenüber der Kontrolle ebenfalls deutlich erhöht und lag nach 5 Tagen im Bereich von 29 bis 34 mg/ml. Bei den mit Saponinen behandelten Blättern konnte keine signifikante Förderung der mikrobiellen Aktivität nachgewiesen werden.



**Abb. 48:** Biologischer Sauerstoffbedarf der behandelten Falllaubdepots am 24.3.11

Im Versuchsjahr 2011/12 wurde die mikrobielle Aktivität der Falllaubepiphyten an zwei Terminen bestimmt. Zum einen kurz nach dem Blattfall im Herbst, am 19.12.11 und zum anderen kurz vor Beginn der Schorfprimärsaison am 30.03.12. Am ersten Termin lag der biologische Sauerstoffbedarf der Bakterien auf den unbehandelten Blättern bei 9 mg/ml, der der Pilze bei 12 mg/ml (Abb. 44). Den höchsten BSB<sub>5</sub> wiesen die mit TSB 9% + Hefeextrakt LEIBER 6% behandelten Blätter auf. Der BSB<sub>5</sub> der Bakterien lag bei 25 mg/ml, der der Pilze bei 24 mg/ml. Die anderen Casein- und Hefemedien, sowie Harnstoff zeigten sowohl bei den Bakterien, als auch bei den Pilzen eine deutlich höhere mikrobielle Aktivität, als die Kontrolle. Für die mit dem Vitamin-Mix und den Saponinen behandelten Blätter lag der biologische Sauerstoffbedarf der Pilze- und Bakterien im Bereich der Kontrolle oder darunter.

Am 30.03.12 war die mikrobielle Aktivität in den behandelten Falllaubdepots, mit Ausnahme von Harnstoff, weiter angestiegen (Abb. 45). Der biologische Sauerstoffbedarf der unbehandelten Blätter lag für die Bakterien bei 16 mg/ml und für die Pilze bei 12 mg/ml (Abb. 45). Die höchste mikrobielle Aktivität konnte, wie auch am 19.12.11, bei dem mit TSB 9% + Hefeextrakt LEIBER 6% behandelten Falllaubdepot nachgewiesen werden. Die Bakterien und Pilze hatten einen biologischen Sauerstoffbedarf von 29 mg/ml. Bei den anderen Casein- und Hefeextraktvarianten lag der biologische Sauerstoffbedarf der Bakterien zwischen 18-28 mg/ml, der der Pilze zwischen 19-25 mg/ml. Das mit Harnstoff behandelte Falllaubdepot zeigte eine leichte Förderung der bakteriellen Aktivität, jedoch keine Förderung der pilzlichen Epiphyten. Die beiden saponinbehandelten Varianten Glyzyrrhizinsäure und Quillajasaponin sowie der Vitamin-Mix wiesen im Vergleich zur Kontrolle einen höheren biologischen Sauerstoffbedarf bei den Pilzen, jedoch nicht bei den Bakterien auf. Alle anderen Saponinvarianten zeigten sowohl bei den Bakterien, als auch bei den Pilzen die gleiche oder eine geringere mikrobielle Aktivität als die Kontrolle.



**Abb. 49:** Biologischer Sauerstoffbedarf der behandelten Falllaubdepots am 19.12.11

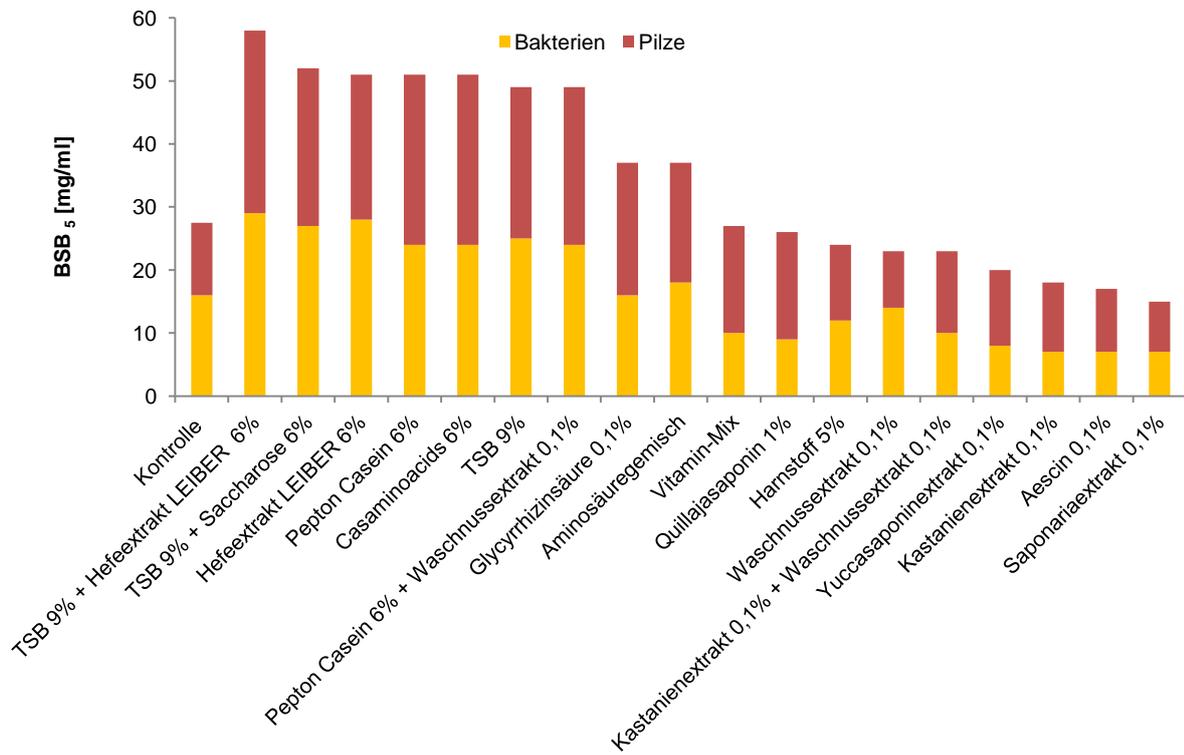


Abb. 50: Biologischer Sauerstoffbedarf der behandelten Falllaubdepos am 30.03.12

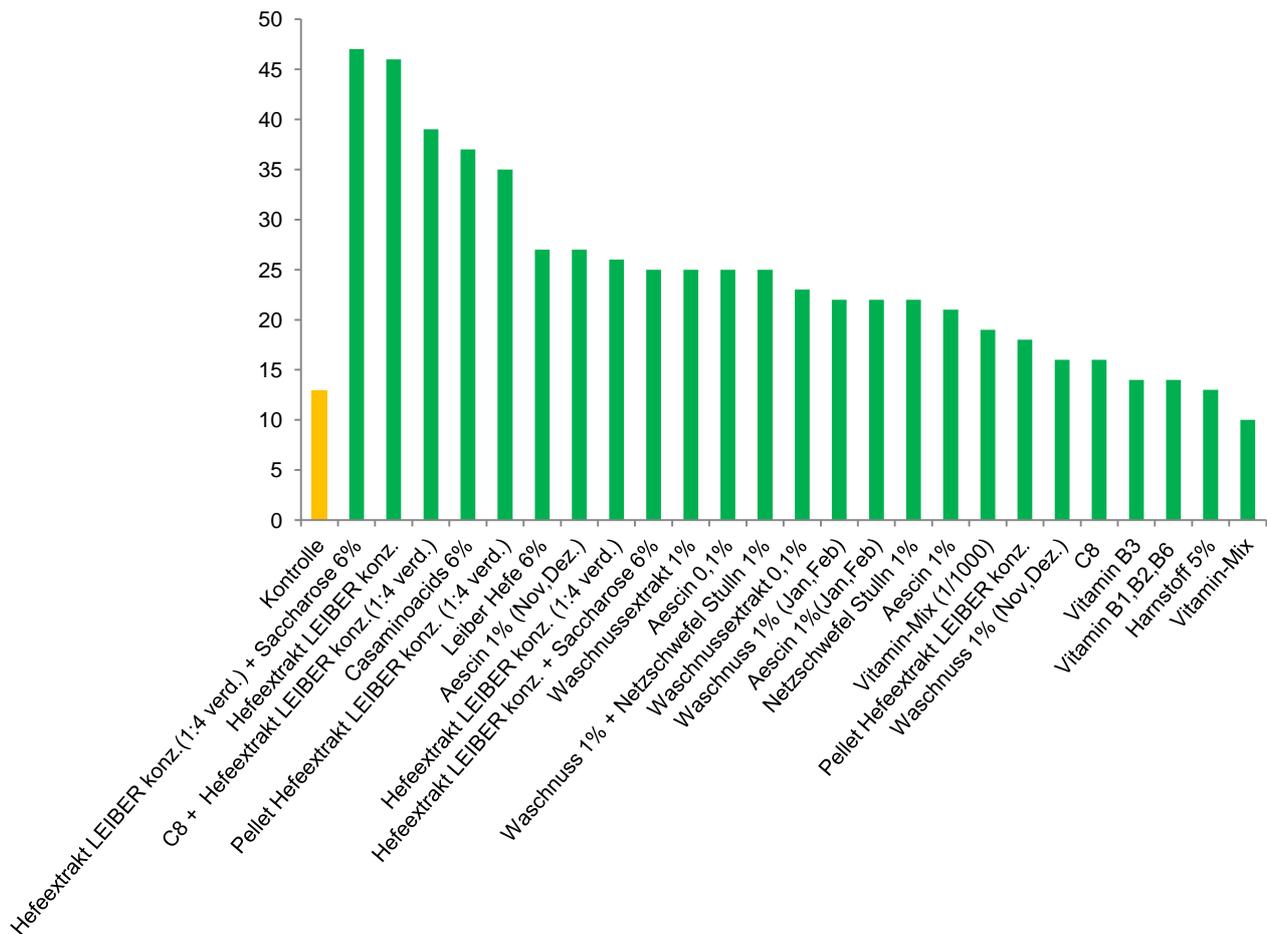
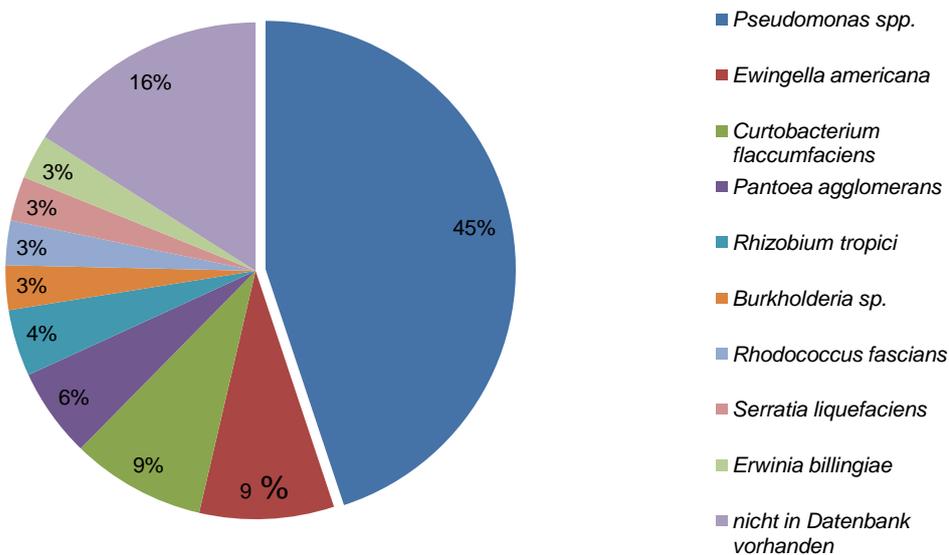


Abb. 51: Biologischer Sauerstoffbedarf der behandelten Falllaubdepos am 02.04.13

In der Saison 2012/13 wurde die Gesamtaktivität der Epiphytengemeinschaft am 02.04.13 bestimmt. In der Kontrolle konnte nach 5 Tagen ein Sauerstoffbedarf von 13 mg/ml ermittelt werden. Die mit den Hefeextraktvarianten und den 6%igen Casaminoacids behandelten Falllaubdepots zeigten einen deutlich erhöhten Sauerstoffbedarf von 25-47 mg/ml. Die höchste Aktivität konnte bei den beiden mit konzentriertem Hefeextrakt behandelten Varianten nachgewiesen werden. Die Saponinbehandlungen förderten die mikrobielle Aktivität geringfügig bis stark. Der BSB<sub>5</sub> lag im Bereich zwischen 16-27 mg/ml. Vitamine, Harnstoff und der Antagonist C8 hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der mikrobiellen Falllaubgemeinschaft.

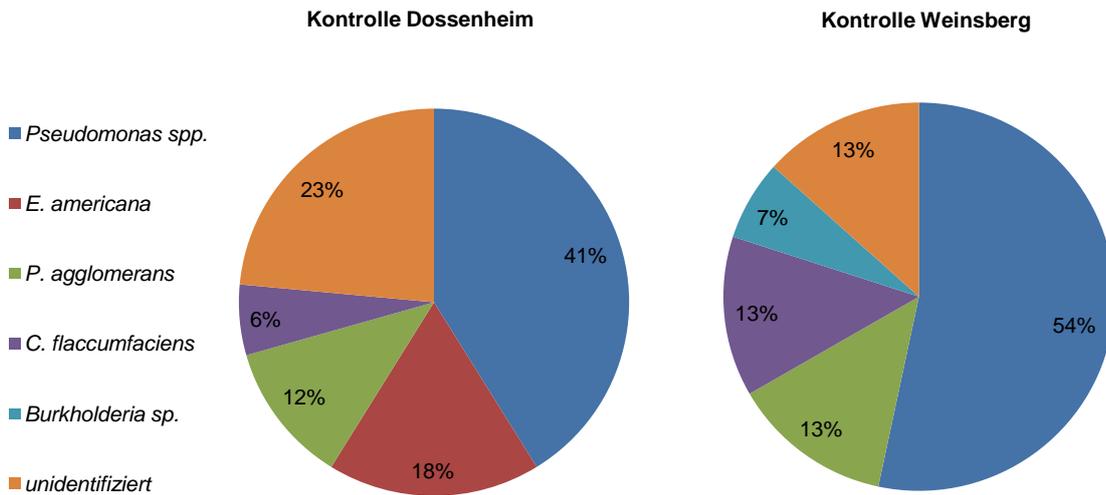
#### 4.7. Charakterisierung der Epiphytengemeinschaft

Von den Blättern der Falllaubdepots in Dossenheim wurden im Jahr 2010/11 69 Bakterien isoliert. Mit MALDI-TOF konnten dabei 45% der Isolate der Gattung *Pseudomonas* spp. zugeordnet werden (Abb. 48). Einen Anteil von 9% an der Epiphytengemeinschaft hatten die Arten *Ewingella americana* und *Curtobacterium flaccumfaciens*. *Pantoea agglomerans* und *Rhizobium tropici* stellten 6 bzw. 4% der Bakteriengemeinschaft dar. Alle anderen identifizierten Gattungen/Arten kamen nur vereinzelt in den Proben vor.



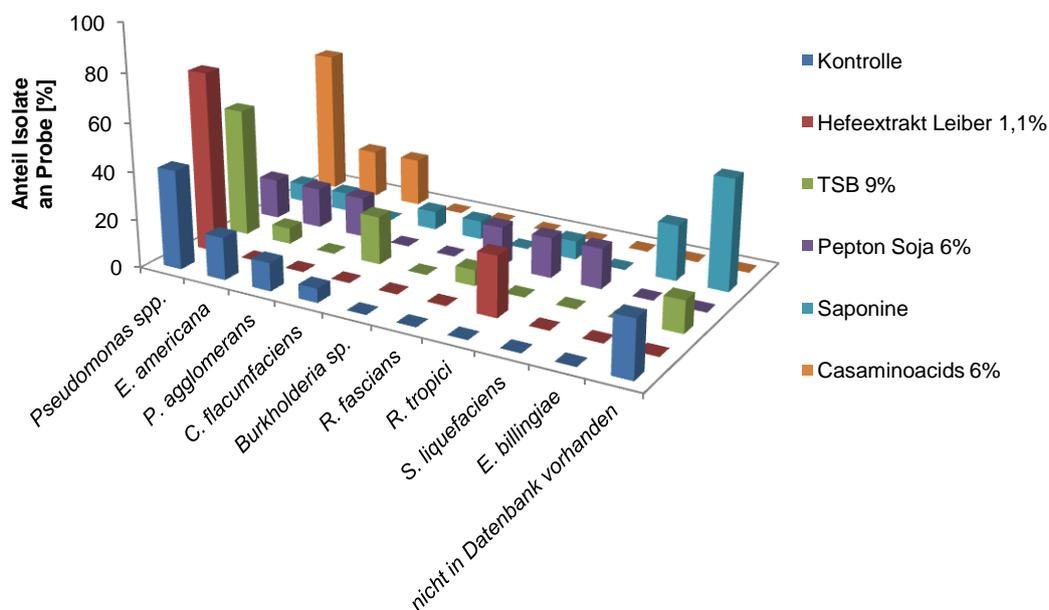
**Abb. 52:** Anteil der mit MALDI-TOF identifizierten Bakteriengattungen/-arten an der Gesamtzahl der Isolate 2010/11

Die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft von unbehandelten Blättern wurde an den Standorten Dossenheim und Weinsberg vergleichend untersucht. Die *Pseudomonaden* hatten einen Anteil von 41 bzw. 54% an der Falllaubgemeinschaft und stellten damit an beiden Standorten die dominante Gattung dar. *P. agglomerans* war jeweils mit 12-13% vertreten. In Dossenheim war neben den *Pseudomonaden*, *Ewingella americana* mit 18% die zweitwichtigste Art der Epiphytengemeinschaft. Am Standort Weinsberg konnte *E. americana* nicht nachgewiesen werden. Vertreter der Gattung *Burkholderia* sp. hatten in Weinsberg einen Anteil von 7% an der Bakteriengemeinschaft, kamen in Dossenheim jedoch nicht vor.



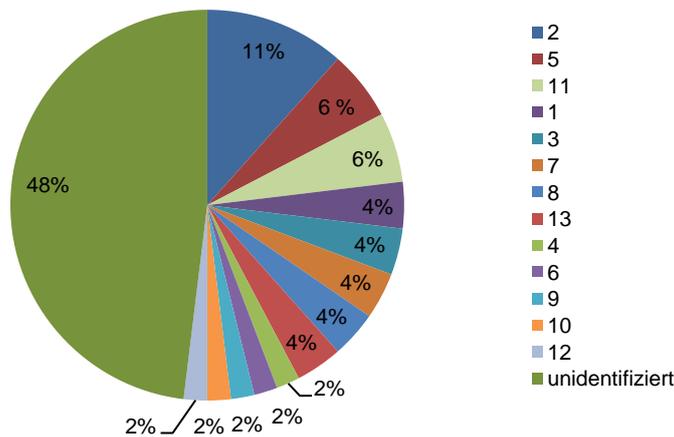
**Abb. 53:** Anteil der identifizierten Bakterienarten/-gattungen an der bakteriellen Gemeinschaft auf unbehandelten Blättern an den Standorten Dossenheim und Weinsberg 2010/2011

Bei der Verteilung der identifizierten Bakterienarten- und gattungen auf den mit Nährmedien und Fungiziden behandelten Blättern in Dossenheim konnte für die Casaminoacids 6% und TSB 9% eine annähernd gleiche Verteilung wie in der Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 50). Die Epiphytengemeinschaft der mit Pepton Soja und Saponin behandelten Blätter wies eine größere Diversität auf, wobei das Verhältnis der Arten/Gattungen zueinander ausgewogen war. Beim Hefeextrakt, den Casaminoacids und TSB 9% konnte eine starke Förderung der Pseudomonaden um 20-40% gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden.



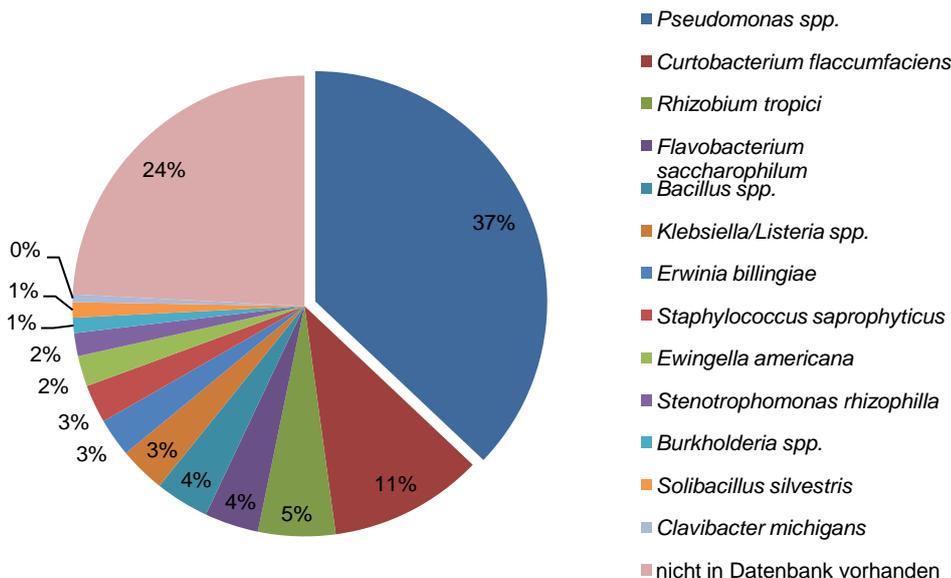
**Abb. 54:** Anteil identifizierter Bakterienarten/-gattungen an den behandelten Falllaubdepots 2010/11

Die 52 vom Falllaub isolierten Pilze konnten 13 verschiedenen systematischen Einheiten/Gruppen zugeordnet werden (Abb. 51). Eine genaue Identifizierung der Gattungen und Arten war nicht möglich, da keine entsprechende Datenbank für die Identifizierung von Pilzen vorhanden war. Die Verteilung der identifizierten Gruppen an der Falllaubgemeinschaft war sehr gleichmäßig. Es konnte keine dominante Gruppe nachgewiesen werden. Die meisten Isolate hatten einen Anteil von 2-6% an der Gemeinschaft, nur Isolate der Gruppe 2 waren mit 11% etwas häufiger vertreten.



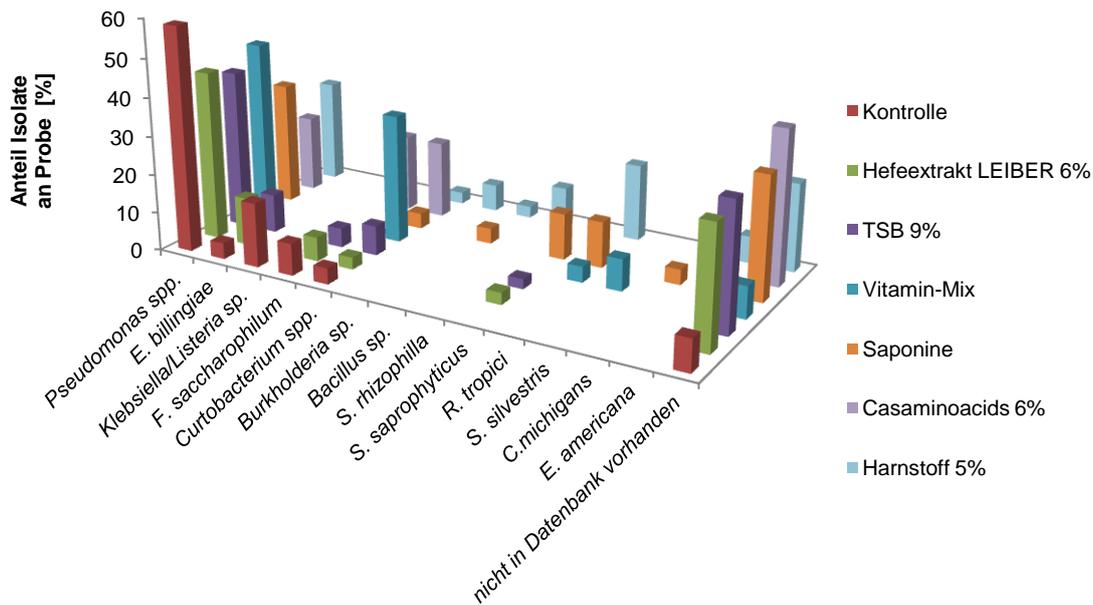
**Abb. 55:** Anteil der mit MALDI-TOF identifizierten systematischen Einheiten der Pilze an der Gesamtzahl der Isolate 2010/11

Im Versuchsjahr 2011/12 wurden 186 Bakterien von den Blättern isoliert. Die Pseudomonaden stellten mit 37% der Isolate die dominante Gruppe dar. *Curtobacterium flaccumfaciens* hatte einen Anteil von 11%, *Rhizobium tropici* von 5% an der Epiphytengemeinschaft des Falllaubs. Es konnten 10 weitere Gattungen/Arten identifiziert werden, die zusammen 24% der Gemeinschaft darstellten.



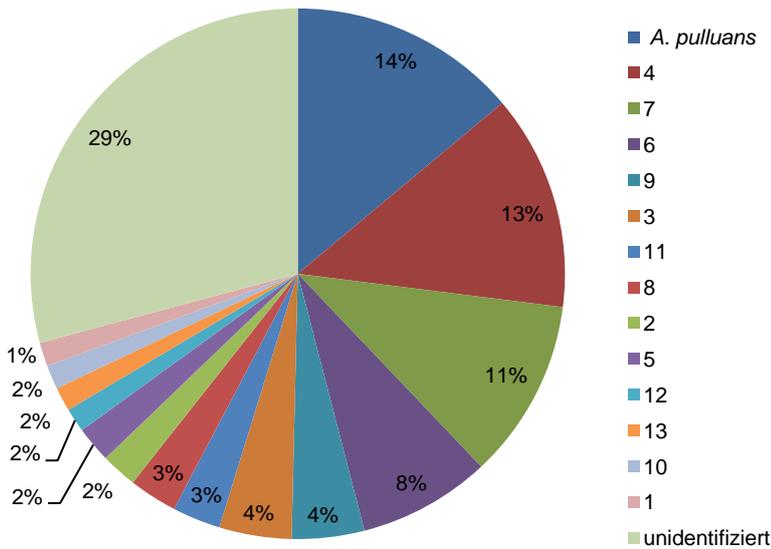
**Abb. 56:** Anteil der mit MALDI-TOF identifizierten Bakteriengattungen/-arten an der Gesamtzahl der Isolate 2011/12

Die identifizierten Arten und Gattungen zeigten eine überwiegend einheitliche Verteilung, auf den unterschiedlich behandelten Falllaubdepots, so dass keine größeren qualitativen Unterschiede nachgewiesen werden konnten. Die Pseudomonaden stellten wie im Vorjahr mit 20-58% die dominante Gattung im Falllaub dar. Bei der Kontrolle, dem 6%igen LEIBER Hefeextrakt, dem TSB 9% und dem Vitamin Mix lag der Anteil bei über 40%. Die Verteilung der Arten und Gattungen entsprach bei TSB und Hefe behandelten Blättern annähernd der Kontrolle. Beim Vitamin Mix waren neben den Pseudomonaden die Curtobacterien die dominante Art, und gegenüber der Kontrolle stark erhöht. Bei den Saponinen und der Harnstoffbehandlung traten jeweils 4 Arten mit einem geringeren Anteil auf, die nicht in der Kontrolle vorkamen.



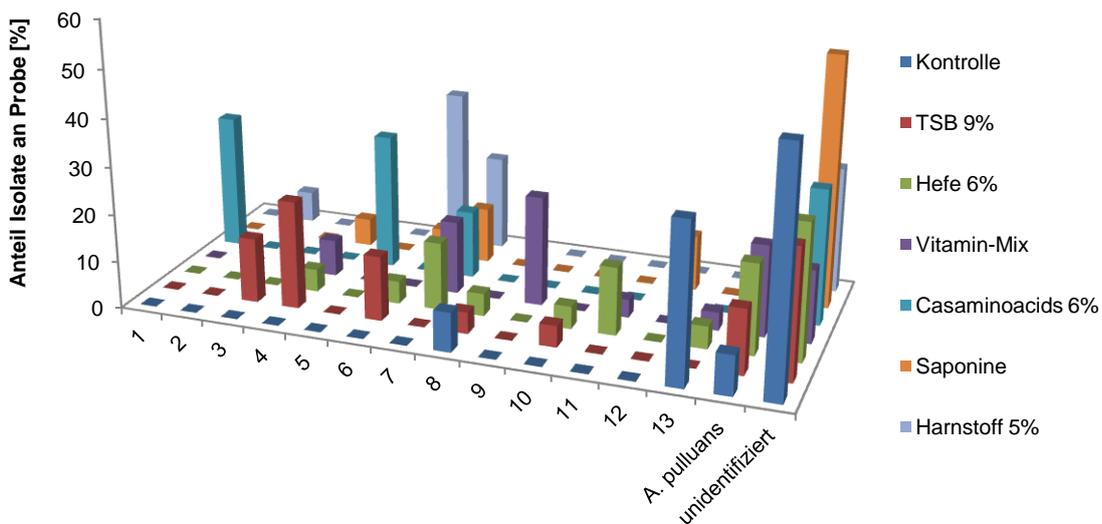
**Abb. 57:** Anteil identifizierter Bakterienarten/-gattungen an den behandelten Falllaubdepots 2011/12

Die 142 Isolate der Pilze konnten 14 verschiedenen systematischen Einheiten zugeordnet werden. *Aureobasidium pulluans* stellte mit 14 % die größte Gruppe dar. Die Gruppen 4 und 7 waren mit 13 und 11% Anteil an der der Epiphytengemeinschaft weitere wichtige Vertreter. Die systematischen Einheiten 9-13 konnten mikroskopisch als Hefen identifiziert, jedoch mit MALDI-TOF nicht näher bestimmt werden. Sie stellten zusammen 13 % der pilzlichen Gemeinschaft dar. Alle anderen systematischen Einheiten hatten mit 1-8% nur einen geringen Anteil an der Gemeinschaft.



**Abb. 58:** Anteil der mit MALDI-TOF identifizierten systematischen Einheiten der Pilze an der Gesamtzahl der Isolate 2011/12

Die Isolate von *A. pulluans* konnten in allen Falllaubdepots, mit Ausnahme der Casaminoacids, nachgewiesen werden und zeigten dabei eine gleichmäßige Verteilung. Das Auftreten von Hefen der Gruppen 9-13 konnte in den Blättern der Kontrolle, sowie den mit Hefeextrakt LEIBER 6 %, dem Vitamin-Mix und TSB 9% behandelten Blättern nachgewiesen werden. Von den Falllaubdepots der Saponin, Harnstoff und Casaminoacid behandelten Blätter konnten keine Hefen isoliert werden. Die systematischen Einheiten 4 und 7, die zusammen 24% der Gemeinschaft ausmachten konnten von den behandelten Blättern, jedoch nicht von der unbehandelten Kontrolle, isoliert werden. Andere systematische Einheiten kamen nur vereinzelt in den Proben vor.

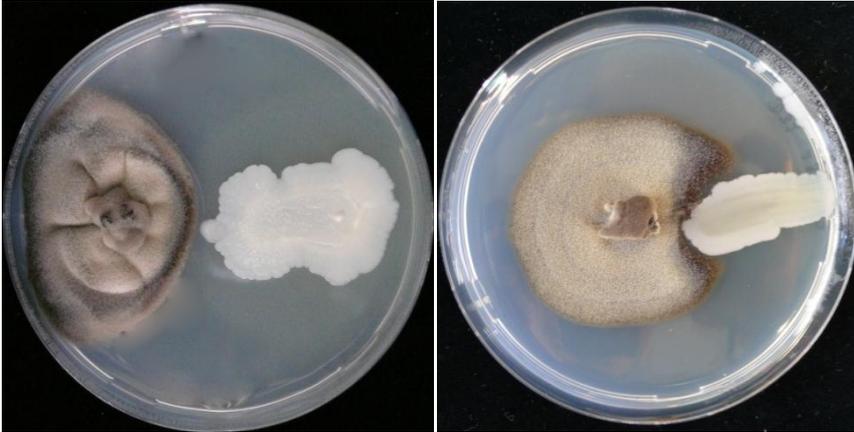


**Abb. 59:** Anteil identifizierter systematischer Einheiten der Pilze nach Behandlungen

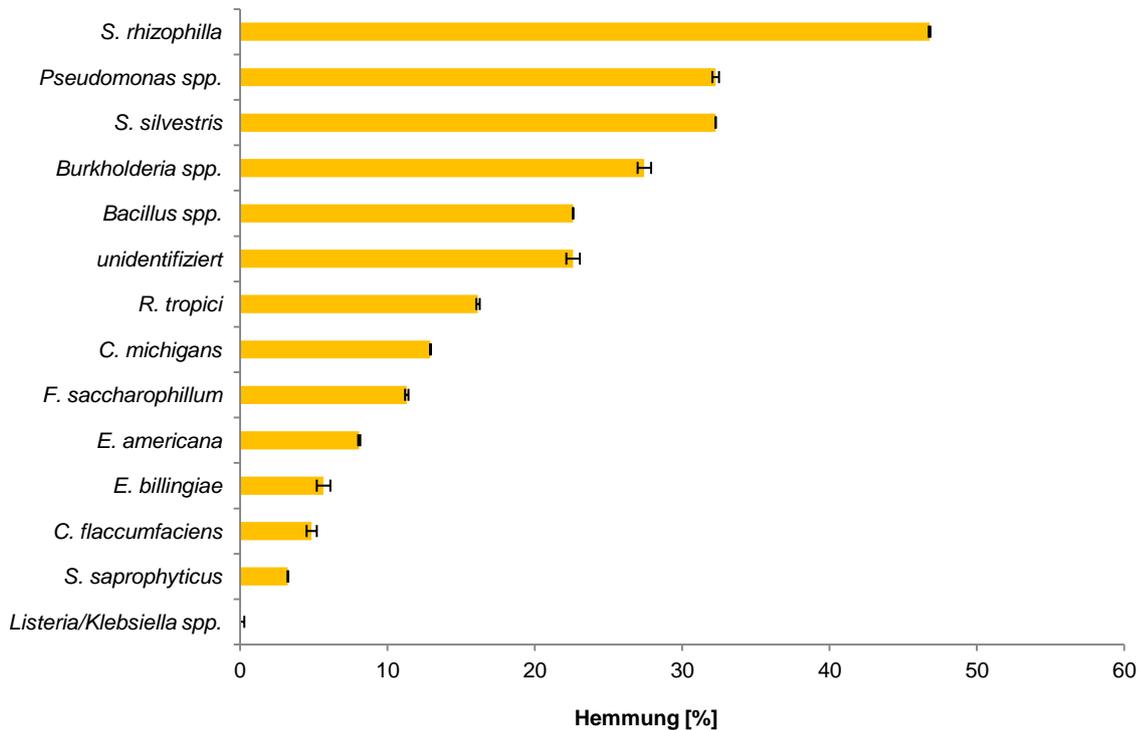
## 4.8. Analyse des fungiziden Potenzials von Antagonisten

### 4.8.1. Dualkultur- Test

Bei den Hemmtests der Bakterien gegen *V. inaequalis* auf PDA zeigte *Stenotrophomonas rhizophilla* das Potenzial einer 47%igen Hemmung. *Pseudomonas* spp. und *Solibacillus silvestris* hemmten das Wachstum des Erregers zu 32%, *Burkholderia* spp. zu 27% und *Bacillus* spp. zu 23%. Die anderen identifizierten Bakterienarten-/gattungen hatten einen Wirkungsgrad von unter 20%.

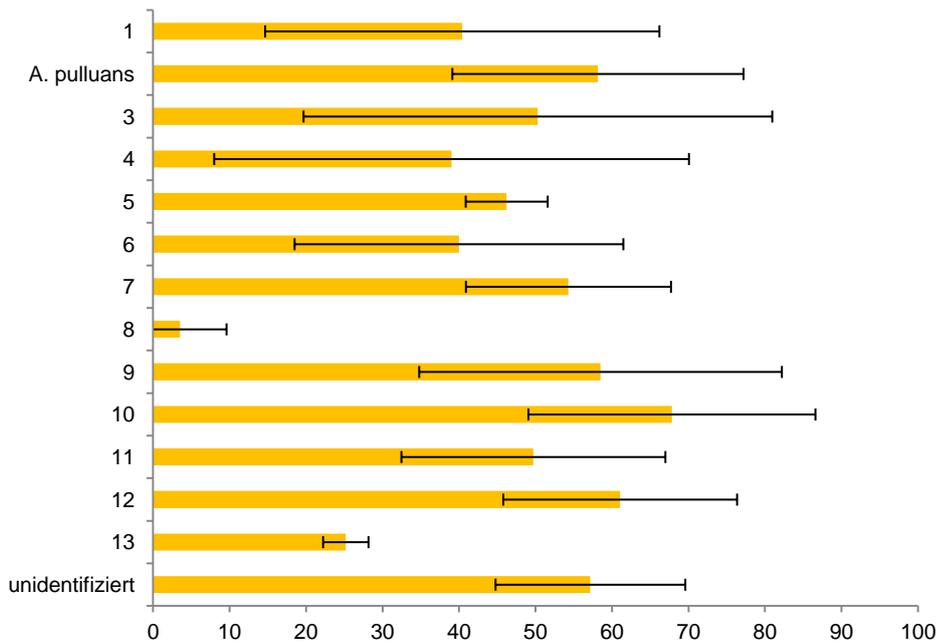


**Abb. 60:** Hemmung von *V. inaequalis* im Dual-culture Test durch *Pseudomonas* spp.

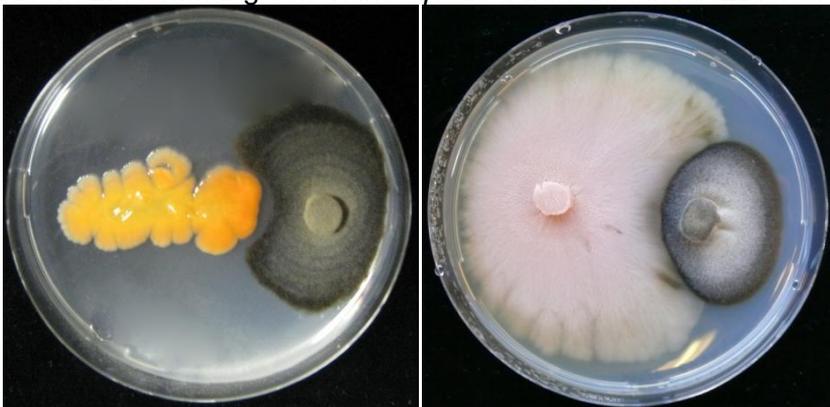


**Abb. 61:** Hemmung von *V. inaequalis* durch die mit MALDI-TOF identifizierten Bakterienarten/-gattungen des Falllaubs [%]

Die Isolate aus der Gruppe der Hefen (9-12) bewirkten eine starke Hemmung des Apfelschorfmycelwachstums von 50-68%, wobei Isolate der Gruppe 10 zu den stärksten Hemmeffekten führten. Bei den Pilzen hemmte *A. pullulans* die Entwicklung von *V. inaequalis* am stärksten. Isolate der Gruppen 3 und 7 inhibierten das Wachstum etwa zu 50%.



**Abb. 62:** Hemmung von *V. inaequalis* durch die mit MALDI-TOF identifizierten Pilzgruppen [%]



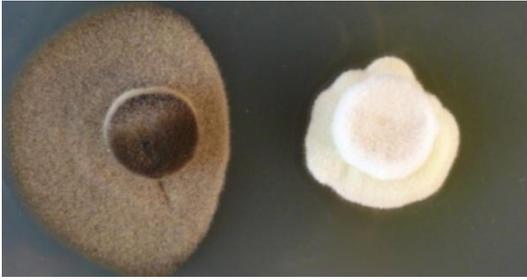
**Abb. 63 a + b:** Hemmung von *V. inaequalis* (a) durch *A. pulluans* und ein Hefeisolat (b) (Gruppe 9)

#### 4.8.2. Hemmtests in Flüssigkultur

In Flüssigkultur konnte bei den Bakterien nur für einzelne Vertreter der Pseudomonaden und *Clavibacter michigans* eine komplette Hemmung des Wachstums von *V. inaequalis* beobachtet werden. Aus der Gruppe der Hefen zeigten die systematischen Einheiten 9, 10, 11 und 13 das Potential den Apfelschorferreger in seiner Entwicklung zu hemmen. Bei den Pilzen wurden Vertreter der Gruppe 3 und 7 als hemmend bewertet.

#### 4.8.3. Antagonist C8

Der in der Saison 2012/13 auf das Falllaub applizierte Antagonist C8 (*Leptosphaeria* sp.) zeigte auf PDA das Potential *V. inaequalis* zu etwa 48% in seinem Wachstum zu inhibieren. Auf Blätteragar konnte eine Hemmung des Wachstums von 21% nachgewiesen werden.



**Abb. 64:** *Leptosphaeria* sp. vs. V1, nach 28d, auf PDA

#### 4.9. Versuche zur Erfassung der Nahrungspräferenzen von Regenwürmern im Laborversuch

Die unter 3.6. beschriebene Methode erwies sich als bedingt geeignet, um Nahrungspräferenzen von Regenwürmern nachzuweisen. Eigentlich müsste über jeder Kiste eine Kamera mit ganz schwacher Beleuchtung installiert werden. Ziel des Versuchsaufbaus war die Dokumentation eines unterschiedlich schnellen Abbaus der Blattdepots mit unbehandeltem Laub in der Kontrollvariante und behandeltem Laub der Testvariante. Bereits zwei Tage nach Versuchsbeginn war eine Vermischung der zuvor sauber getrennt ausgelegten Blattdepots zu beobachten. Dies zeigt, dass Blätter nicht an Ort und Stelle eingezogen, sondern mehrere Zentimeter zu dem bestehenden Wurmgang transportiert werden.



**Abb. 65:** Vermischung der Varianten im Vermarium

Die Zuordnung der Blätter zur jeweiligen Variante und damit die Erfassung von Nahrungspräferenzen waren somit nicht mehr möglich.

Im Versuchsaufbau 2 wurde in jeder Kiste nur einer Variante ausgelegt. In den darauffolgenden Tagen wurde die Geschwindigkeit des Blattabbaus in den einzelnen Kisten erfasst und verglichen. Innerhalb von 10 Tagen war in allen Kisten das ausgelegte Laub nahezu vollständig abgebaut. Zwischen den einzelnen Varianten bzw. Kisten konnte kein klar ersichtlicher Unterschied festgestellt werden. Tendenziell erschien der Blattabbau bei der Behandlung mit TSB leicht beschleunigt. Im Vergleich zu den anderen Varianten waren bereits 8 Tage nach Beginn des Versuches nur noch Blattstiele und keinerlei Blattreste mehr vorhanden.



*Abb. 66a + b: Blätter behandelt mit TSB Medium. Links: 21.11.2011; rechts: 29.11.2011*



**Abb. 67a + b:** Blätter behandelt mit Baldrianblütenextrakt. Links: 21.11.2011; rechts: 29.11.2011

#### **4. 10. Versuche zur Optimierung des Hefeinsatzes zur Attraktivitätserhöhung des Falllaubes für Regenwürmer im Freiland**

##### **4.10.1. August/September 2012**

Der im August 2012 angelegte Versuch beschäftigte sich mit der Frage ob eine alleinige Glucosebehandlung bzw. Pepton Caseinbehandlung ausreicht um den Falllaubabbau und die Regenwurmaktivität zu fördern oder ob es einer Kombination mit einem anderen Mittel bedarf. Hierzu wurde in einer Variante Glucose (10%) mit Pepton Casein (8%) kombiniert, in einer anderen Glucose pur (10%). Dazu kam eine reine Pepton Casein Variante (8%) und eine in der Pepton Casein (8%) in Kombination mit Galgant (12%) getestet wurde. Für alle Varianten wurden 2 Parallelen angelegt. Die Applikation der Varianten erfolgte am 28.9.2013 auf 140 g Blätter pro Gitter und 100 ml Spritzbrühe pro Gitter. Beim Galgantextrakt wurde 50 g Frischmasse auf 100 ml Wasser für 10 Minuten geblendet und anschließend auf die angegebene Verdünnung eingestellt.

#### 4.10.2. Februar 2013

Der Versuch drehte sich, wie in Material und Methoden beschrieben, um die Blattabbaurrate und die Regenwurmaktivität bei Behandlungen mit Hefeextraktionen (LEIBER Hefe N – LS und Hefe flüssig JKI Dossenheim) in unterschiedlicher Konzentration (4%, 6%). Je Variante gab es 3 Wiederholungen. Nach der Versuchsanlage Ende Februar waren die Bedingungen für die Regenwürmer zunächst, aufgrund von trockenem und kaltem Boden, ungünstig.

Wie in den Abb. 46 ersichtlich wird, bauten sich die Blätter in den Varianten LEIBER Hefe N - LS 6% und Hefeflüssigpräparat 6% am schnellsten ab. In der Zeit zwischen 15.4.2013 und 29.4.2013 war der Blattabbau am zügigsten wie in den folgenden Abbildungen zum Wetter deutlich wird. Ab 10.4.2013 kletterten die Minimalwerte der Lufttemperatur über 10°C. Darüber hinaus stieg auch die Bodentemperatur in 3 cm Tiefe auf Werte über 10°C. Verbunden mit Niederschlägen, die für einen feuchten Boden sorgten, konnten die Regenwürmer somit gute Bedingungen für den Falllaubabbau vorfinden.

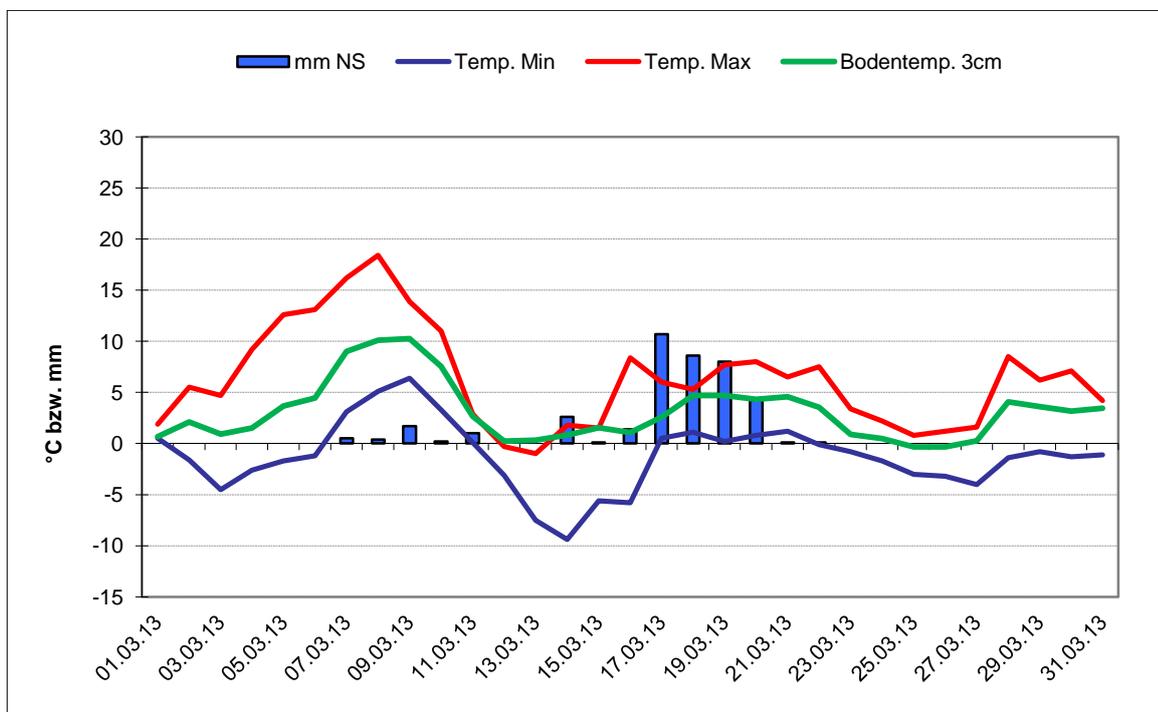


Abb. 68: Witterungsverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen im März 2013

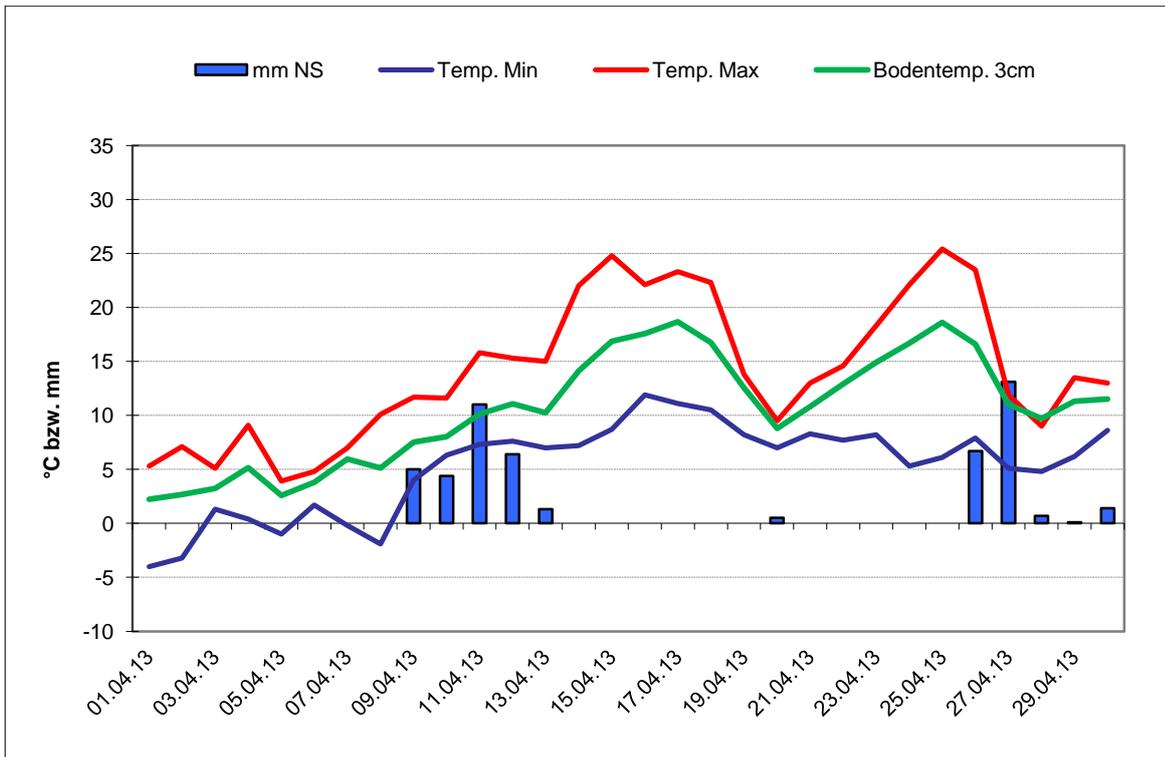


Abb. 69: Witterungsverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen im April 2013

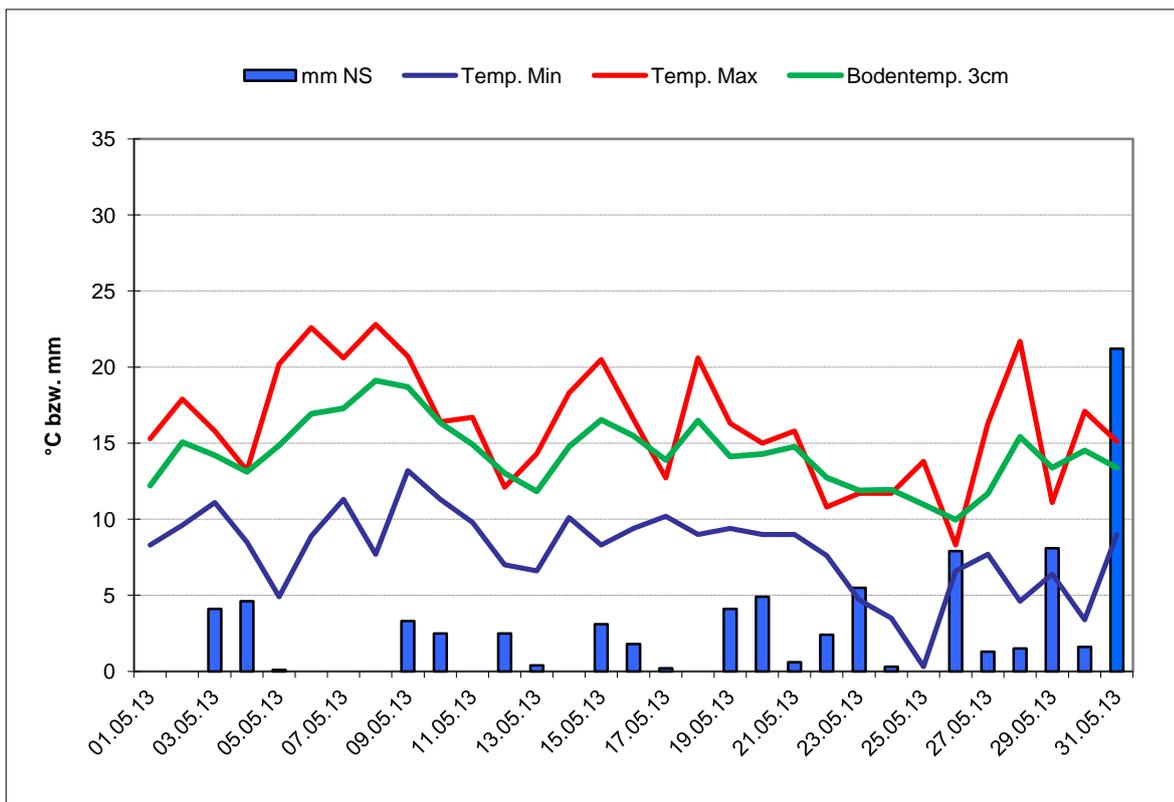


Abb. 70: Witterungsverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen im Mai 2013

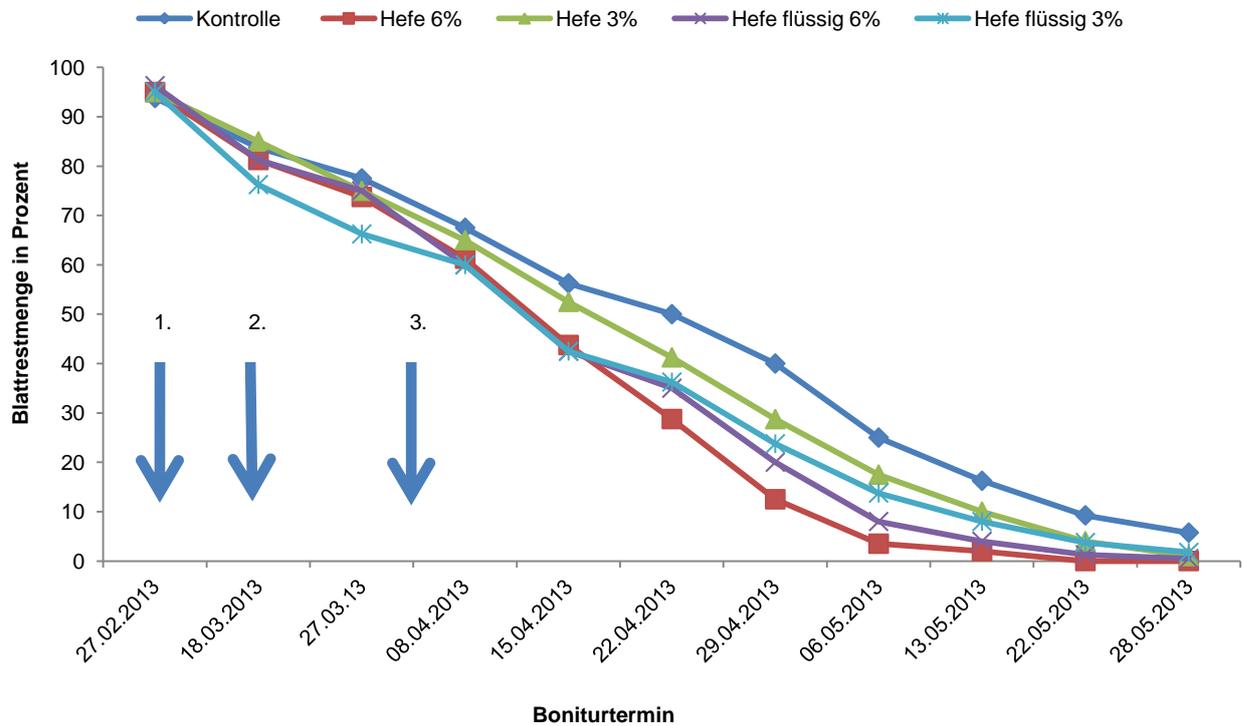
**Tab. 23:** Entwicklung des Blattabbaus Falllaub-Versuch Februar 2013 bis Mai 2013, Var. 1-5., Wiederholung 2

Termin/ Variante	08.03.13	27.03.2013	8.4.13	22.4.13	29.4.13	6.5.13	22.5.13
Kontrolle 1.2							
Hefe Pulver 6% 2.2							
Hefe Pulver 3% 3.2							

<p><b>Hefe flüssig</b> 6% 4.2</p>							
<p><b>Hefe flüssig</b> 6% 5.2</p>							

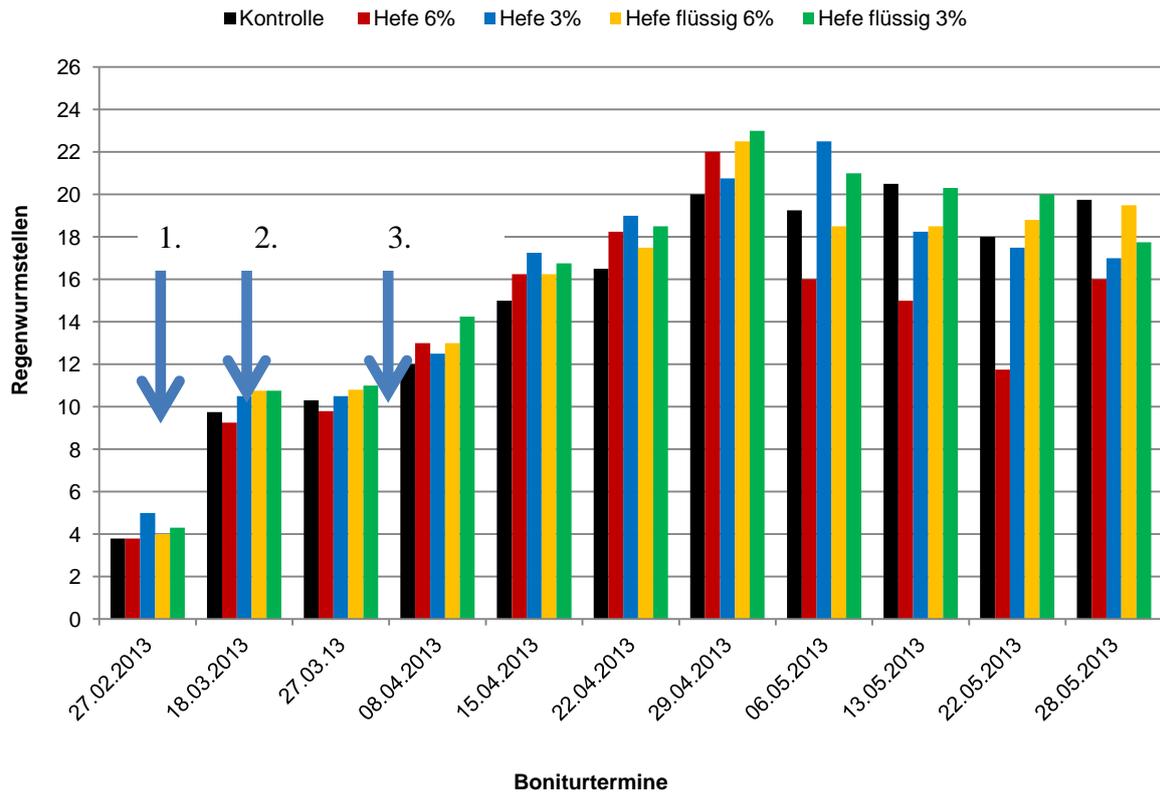


Die Behandlungen erfolgten wie unter 3.9. dargestellt. In Abbildung 71 ist die durchschnittlichen Blattrestmengen vor und nach den Behandlungsterminen dargestellt.



**Abb. 71:** Blattrestmengen des Februarversuches 2013 an unterschiedlichen Boniturterminen

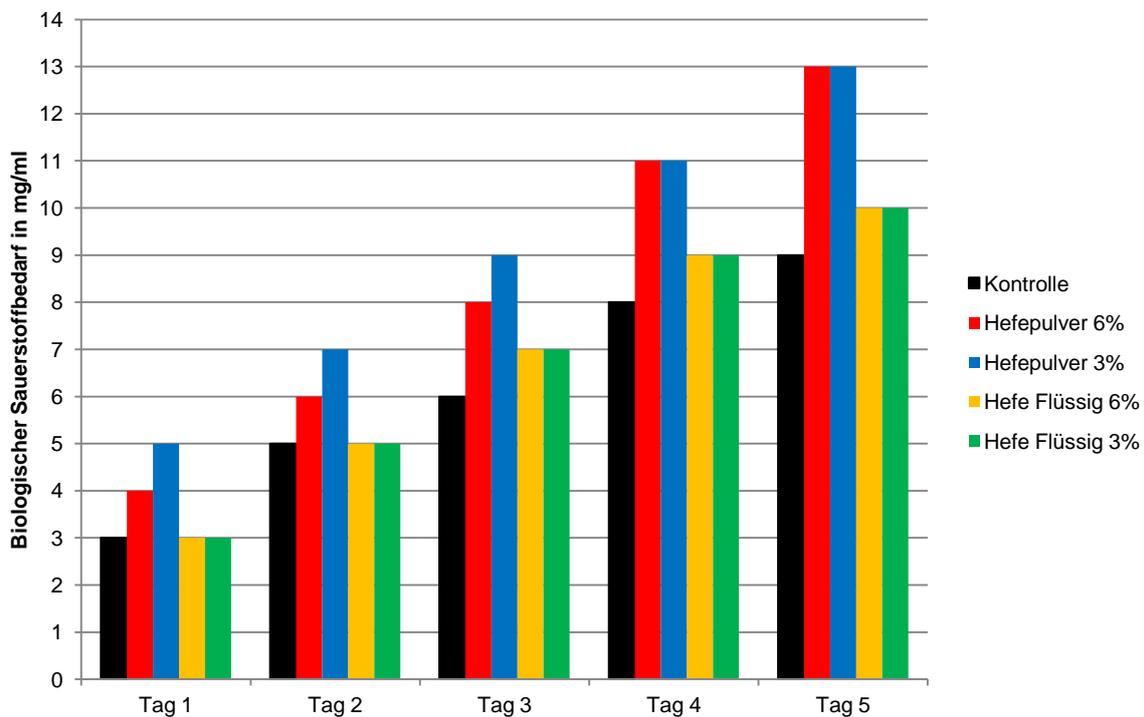
Die Pfeile stellen die Behandlungstermine dar. Es wird deutlich, dass mit dem Wetterumschwung am 10.4.2013, die Hefevarianten an Vorsprung hinsichtlich der Blattabbaurate gewannen und somit früher als die Kontrolle wenig Falllaub aufweisen. Der Wert beträgt bei der LEIBER Hefe N - LS 6% Variante schon am 29.4.2013 nur noch 10%. Hingegen waren zu diesem Zeitpunkt bei der Kontrolle noch 40% der Ausgangsmenge an Falllaub vorhanden. Die anderen Hefevarianten hatten ebenfalls geringere Prozentwerte als die Kontrolle, jedoch waren die 3%igen Hefevarianten, sowohl in flüssiger als auch in pulvriger Form mit über 20% Blattrest noch wesentlich schlechter als die 6% Variante. Vor allem der letzte Behandlungstermin schien wegen der darauffolgend einsetzenden guten Bedingungen für die Regenwürmer (siehe Abb. Witterungsverläufe) ein optimaler Behandlungstermin gewesen zu sein. Hinsichtlich der Regenwurmaktivität konnten diese Werte bonitiert werden:



**Abb. 72:** Regenwurmaktivität des Versuches zur Optimierung der Hefebehandlung, Versuchsanlage Februar 2013

Die Anzahl der Regenwurmstellen war bei den mit Hefe behandelten Varianten erhöht. Die Zahl der Blatthaufen war analog zu den Witterungsbedingungen und ab dem 8.4.2013 erhöht. Im Laufe des Aprils sind bei den Hefevarianten im Mittel 1-2 Blatthaufen mehr als bei der unbehandelten Kontrolle zu verzeichnen. Der rasche Einbruch bei der Hefepulver Variante 6% (LEIBER N - LS) lässt sich mit dem völligen Abbau des Falllaubes in den entsprechenden Falllaubdepots begründen. Lediglich Blattstiele ließen hier noch Rückschlüsse auf eine Regenwurm-tätigkeit zu.

Zur Bestimmung des Mikroorganismen-Anteils auf der Blattmasse wurde auch an der LVWO Weinsberg ein Versuch mit Hilfe von Oxi-Top-Geräten, analog zum Versuch in Dossenheim, durchgeführt. Nach 5 Tagen konnten folgende Werte für die Varianten abgelesen werden:

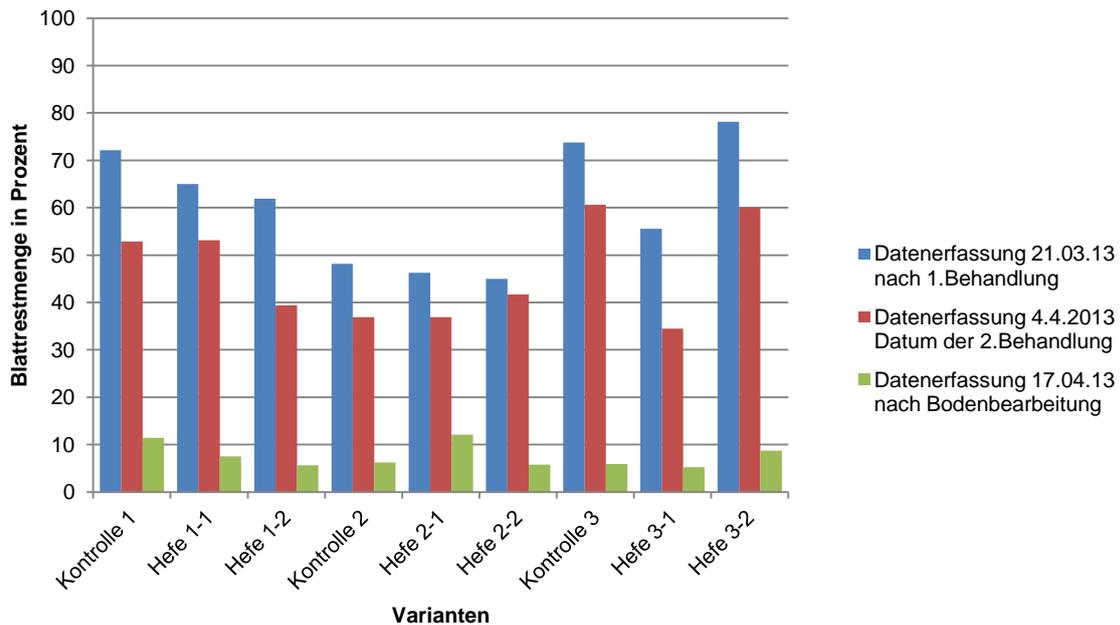


**Abb. 73:** Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfs (BSB<sub>5</sub>) in Weinsberg, Entnahme Ende April 2013, nach 3 Behandlungen

In Abb. 47 wird ersichtlich dass die Varianten Hefepulver 6% und Hefepulver 3% (beide LEIBER N - LS) einen BSB<sub>5</sub> Wert von 13 mg erreichen. Die unbehandelte Kontrolle hingegen erreicht nur einen Wert von 8 mg/ml. Die flüssigen Formulierungen schlossen ebenso schwächer ab als die Pulvrigen und zwar lag hier der BSB<sub>5</sub> bei 10 mg/ml. Durch diese Erkenntnisse werden die Bonituren der Blattabbauraten sowie die der Regenwurmaktivität untermauert. Eine höhere Attraktivität für die Regenwürmer war mit einem höheren Messwert beim biologischen Sauerstoffbedarf gekoppelt.

Die Bonituren des Versuches im Biobetrieb Föll erfolgten in jeder Parzelle zwischen den Stämmen der Bäume (ca. 1m Pflanzabstand) bzw. auch zwischen Pfosten und erstem/letztem Baum in der Parzelle. Hierbei wurde die Falllaubrestmenge als % Bedeckung des bearbeiteten Baumstreifens erfasst. Die Termine für die Bonituren waren am 21.3.2013, 4.4.2013 und 17.4.2013. Die Bonitur am 21.3.2013 wurde 3 Wochen nach der ersten Hefebehandlung vorgenommen, wobei wenig Veränderung im Vergleich zum Beginn des Versuches am 28.2.2013 festgestellt wurde. Zeitgleich zur 2. Hefebehandlung erfolgte die Bonitur am 4.4.2013. Beim letzten Termin wurden aufgrund der vorher erfolgten Bodenbearbeitung nur eingearbeitete bzw. an der Kante von Baumstreifen zu Fahrgasse verbliebene Blätter erfasst.

### 4.10.3. Biobetrieb Föll 2013



**Abb. 74:** Blattrestmengen Biobetrieb Föll nach Behandlung mit 4 % LEIBER Hefe N - LS

Die Falllaubrestmengen fielen demnach in allen Varianten auf etwa 10% des Ausgangswertes. Im Vergleich zwischen erstem und zweitem Boniturtermin konnte festgestellt werden, dass die Blattrestmengen um ca. 15-20% bei den Hefeparzellen 1 und 3 bzw. um 5-10% bei der Hefeparzelle 2 reduziert wurden. Es wurde auf die Regenwurmaktivität (Rwa) geachtet, allerdings wurde selbige nicht explizit pro Parzelle schriftlich festgehalten. Bei den Boniturterminen wurde hinsichtlich der Rwa. festgestellt, dass diese schwach ausfiel, da an vielen Stellen regelrecht zusammengeklebte Falllaubplatten existierten. Dies spricht dafür, dass die Regenwurmaktivität im Boden ungenügend ist. ) Im Vergleich dazu wurden in den Falllaubgittern am Versuchsstandort Heuchlingen bis zu 20 Regenwurmstellen pro 0,5 qm erfasst, beim Biobetrieb Föll jedoch selten mehr als 5 Stellen. Im Zeitraum vom 21.3.2013 bis zum 17.4.2013, dem Zeitpunkt der Bodenbearbeitung im Betrieb Föll, gingen die Blattrestmengen am Obstversuchsgut Heuchlingen ebenso um bis zu 35% zurück je nach Variante (Vergleich Ergebnisse Versuch hinter Himbeeren).

Das für Regenwurmaktivität typische Zusammenziehen der Blätter auf Häufchen war im Biobetrieb Föll kaum zu beobachten. Eine Rolle bei der Bonitur spielte auch die Hanglage der Apfelanlage mit ca. 5% Gefälle, wodurch sich Unterschiede in der Bodenfeuchtigkeit, Temperatur und Bodenzusammensetzung zwischen den einzelnen Parzellen bei der Bonitur ergeben haben könnten.

Beim Termin am 4.4.13 wurden sowohl aus den Parzellen 'Elstar' mit/ohne Hefe, sowie aus den Reihen der Sorte 'Topaz' die ebenfalls mit Hefe behandelt worden waren, schorfbefallene Blätter entnommen, soweit sich welche finden ließen und am Standort neben den Falllaubgittern auf dem Obstversuchsgut Heuchlingen in Schalen deponiert. Stichprobenartig sollte das Ascosporenpotenzial überprüft werden. Die Ergebnisse die jedoch nur grobe Anhaltspunkte liefern könne, sind in Tab. 22 dargestellt.

**Tab. 24:** Ascosporenzahlen der vom Biobetrieb Föll entnommenen Blätter

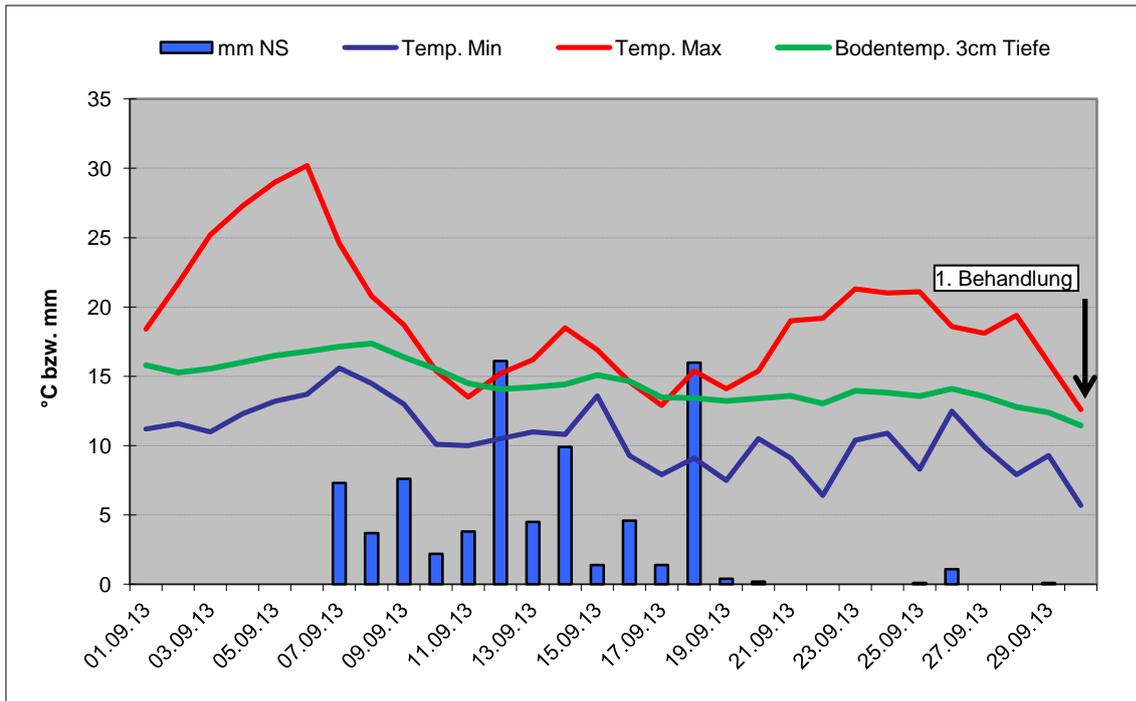
Biobetrieb Föll	18.04. 2013	24.04. 2013	29.04. 2013	02.05. 2013	06.05. 2013	10.05. 2013	13.05. 2013
Topaz Hefe (4%)Föll	38	135	77	77	462	359	38
Elstar Hefe (4%)	0	96	212	58	731	Keine Blätter übrig	
Elstar Kontrolle Föll	19	154	327	96	Keine Blätter übrig		

Vor den Niederschlägen vom 26. und 27. April konnten bei den Blättern von April bei der Ausschüttelung vom 24.4. nur wenige reife Ascosporen gefunden werden. Ein leichter Anstieg des Potenzials zeigte sich am 29.04.13, wobei das Niveau nicht allzu hoch war und bei den 'Elstar' Blättern etwas mehr Sporen gefunden wurden als bei 'Topaz'. Mit den Niederschlägen vom 3. und 4. Mai wurden diese dann ausgeschleudert. Ein wichtiger Termin war der 6.5.13: An diesem Tag wurde bei beiden Sorten ein etwas höheres Ascosporenpotenzial bestimmt, das in der lang andauernden Regenphase ab dem 9. Mai infektiös relevant war.

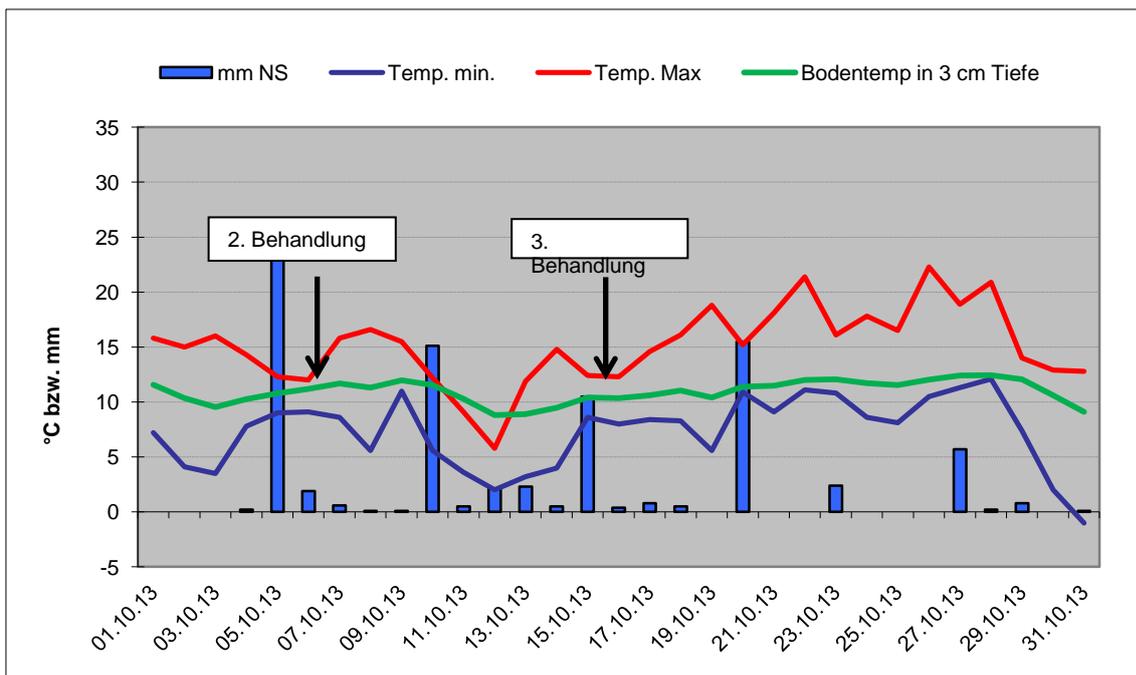
Am 16.5.13. wurde in den markierten Versuchspartellen auf dem Betrieb Föll pro Baum 2-3 Blattrosetten der Blütenbüschelauf Schorfbefall kontrolliert, pro Parzelle 25 Rosetten also insgesamt etwa 150 Blätter. Darüber hinaus wurden vereinzelt die Austriebe der Unterlage kontrolliert. Nirgends konnten Schorfsymptome gefunden werden, auch nicht bei den Sorten 'Topaz' und 'Rubinola' in dieser Anlage. Durch den Boniturtermin waren Infektionstermine bis Ende April abgedeckt (ca. 14 Tage Inkubationszeit)

#### 4.10.4. September 2013

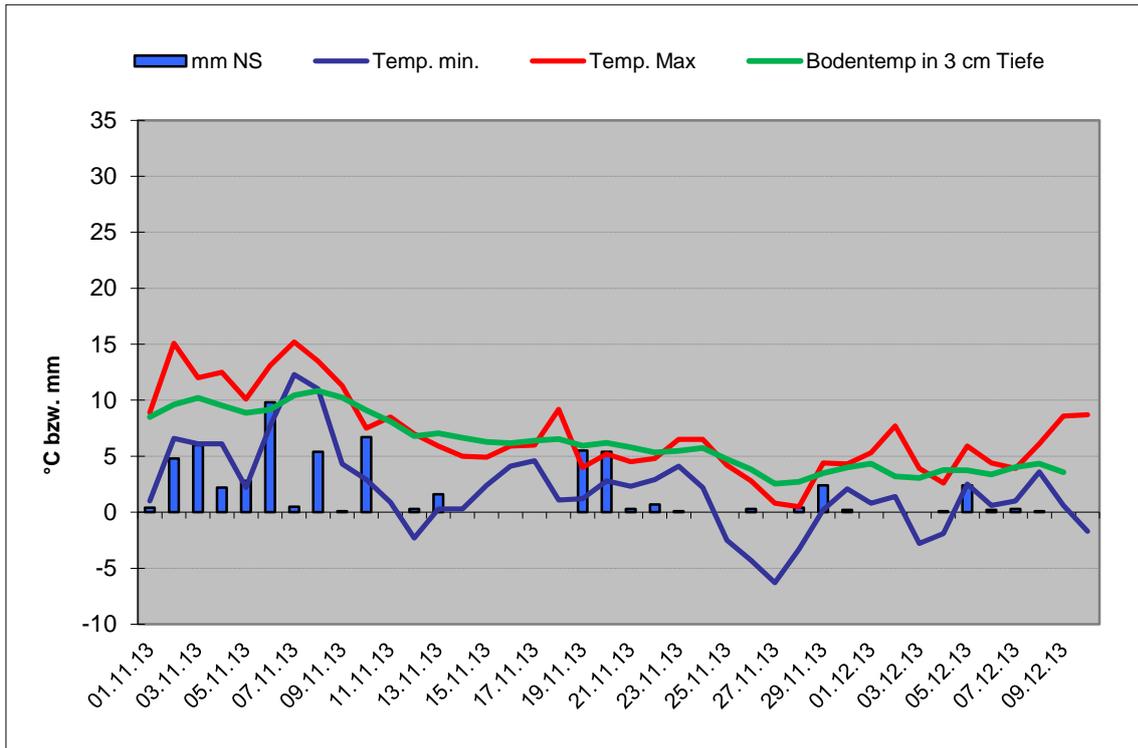
Die Versuchsanlage vom September 2013 gab Aufschlüsse über den Abbau des Falllaubes bei Saponinbehandlungen und gleichzeitig sollte die Fragestellung beantwortet werden, ob die hemmende Wirkung von Saponinen auf den Falllaubabbau durch anschließende Hefebehandlung aufgehoben werden kann. Pro Gitter wurden 220g Falllaub ausgebracht und pro Variante 4 Wiederholungen angelegt.



**Abb. 75:** Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen September 2013



**Abb. 76:** Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen Oktober 2013

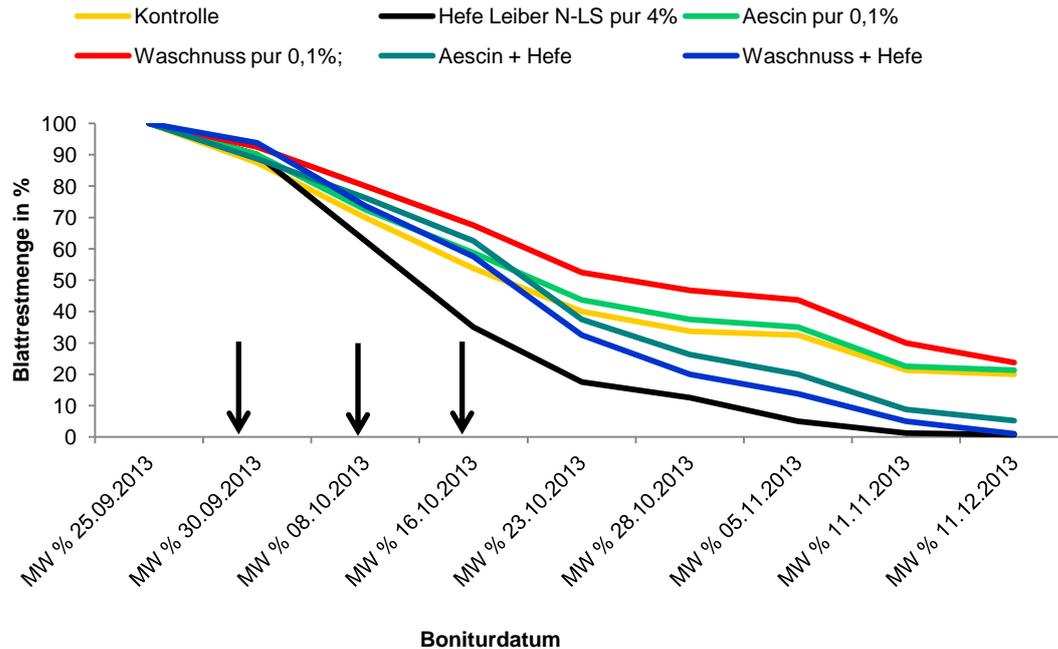


**Abb. 77:** Wetterverlauf am Obstversuchsgut Heuchlingen November 2013

**Tab. 25:** Entwicklung des Blattabbaus, Versuch von Ende September bis Ende November, Wiederholung 2

Termin/Variante	25.09.2013	9.10.13	17.10.13	23.10.13	5.11.13	11.11.13
Kontrolle 1.2.						
Leiber Hefe N- LS 4% 2.2.						
Aescin pur 0,1% 3.2.						

<p>Aescin 0,1% + Hefe 4% 5.2.</p>						
<p>Waschnuss pur 0,1% 4.2.</p>						
<p>Waschnuss 0,1% + Hefe 4% 6.2.</p>						



**Abb. 78:** Blattrestmenge des Versuches zum Stopp der Saponinwirkung auf Falllaub durch Hefebehandlung, 2013, LVWO Weinsberg

Es zeigte sich, dass nach dem Behandlungstermin der Saponinvarianten mit Hefe am 16.10.2013, die Blätter in diesen Varianten rasant abgebaut wurden, nachdem sie vorher auf beinahe demselben Niveau wie die Kontrolle stagnierten. Dies geschah bei zweimaliger Behandlung der Varianten mit den genannten Saponinen. Die 3. Behandlung erfolgte ausschließlich auf die zuvor mit Aescin bzw. Waschnuss behandelten Varianten. Als Vergleich blieb eine Variante mit Aescin pur und Waschnuss pur. Mit einem deutlichen Vorsprung im Blattabbau kristallisierte sich erneut die LEIBER Hefe N-LS 4% heraus. Diese wurde zu den beiden ersten Behandlungsterminen appliziert, auf eine dritte Anwendung wurde verzichtet. Bereits am 28.10.13 waren bei der Hefevariante nur noch knapp über 10% der Blattmenge übrig, 25% weniger als in der Kontrolle und 35% weniger als in der Variante Waschnuss pur 0,1 %. Die Varianten, bei denen Aescin bzw. Waschnuss pur und ohne Hefe „Stoppsspritzung“ angewandt wurden, schnitten in ihren Blattabbauraten noch schlechter als die Kontrollvariante ab. Die Wetterbedingungen boten zu den Behandlungszeitpunkten optimale Bedingungen für die Regenwürmer (> 10°C, feuchter Boden, siehe Wettergrafiken). Insgesamt benötigten die Regenwürmer unter diesen Voraussetzungen bei der Hefevariante 5 Wochen um die angebotene Laubmenge von 225 g pro 0,5 qm zu vertilgen.

#### 4.11. Ergebnisse der Literaturrecherche

Die Literaturrecherche wurde zu 3 Teilbereichen durchgeführt. Zum einen waren dies die Biologie des Schorfpilzes und die Biologie des Regenwurmes. Andererseits wurde Literatur zur Wirksamkeit von Pflanzenextrakten auf Pilzkrankheiten an verschiedenen Kulturpflanzen gesichtet. Auf letztere Recherche gründeten sich die Versuche mit Mangostan, Galgant, Zimtöl und anderen Extrakten zur Keimungshemmung von Konidien von *V. inaequalis*. Umfangreiche Literaturlisten können an der LVWO Weinsberg angefordert werden, im Anhang des Berichts wurde aufgrund des selbigen verzichtet.

### 5. Diskussion der Ergebnisse

#### 5.1. Fungizides Potenzial der Pflanzenextrakte

In den Konidien- und Wachstumshemmtests konnte für die meisten untersuchten Pflanzenauszüge eine hemmende Wirkung auf den Erreger des Apfelschorfs nachgewiesen werden. In den Konidienkeimtests wiesen neben dem käuflichen Aescin besonders das Waschnussextrakt, das Yuccasaponin und eine einfache Zubereitung aus *Primula veris* Wurzeln eine hohe Effektivität auf. Bei den Wachstumshemmtests bestätigte sich diese gute Wirkung nur für ein Waschnussextrakt, welcher ab einer Konzentration von 0,5 % fungizid wirkte. Für die Freilandversuche 2012/13 wurde deshalb, neben Aescin, das Waschnusspräparat verwendet, da dieses von allen extrahierten Saponinen das stärkste fungizide Potenzial aufwies. Für das Kastanien-, Saponaria-, und Yuccasaponinextrakt konnte eine schwächere fungizide Wirkung aufgezeigt werden. Alle vier Präparate können daher für zukünftige Versuche zur Apfelschorfbekämpfung im Falllaub oder auch für eine präventive Behandlung am Baum in Betracht gezogen werden. Das käufliche Quillajasaponin zeigte auch bei hohen Konzentrationen nur eine fungistatische Wirkung und ist daher nur als bedingt geeignet für die Schorfbekämpfung einzuschätzen.

Die Entwicklung eines Extraktionsverfahrens für Saponine, die fungiziden Inhaltsstoffe der Pflanzenextrakte, konnte erfolgreich umgesetzt werden. Die Ausbeute der Saponine war jedoch gering. Aufgrund der strukturellen Variabilität der Aglycone und der Vielzahl möglicher Kohlenhydratstrukturen weist diese Stoffgruppe eine große Strukturvielfalt auf, was eine hohe Variabilität ihrer chemischen Eigenschaften bedingt. Es ist daher äußerst schwierig ein geeignetes Extraktionsverfahren für „alle“ Saponine, die in einer Pflanze vorkommen zu entwickeln, insbesondere wenn es sich um unbekannte Substanzen handelt, da diese je nach Struktur eher polaren oder unpolaren Charakter haben können. Als mögliche Ursachen für die geringe Ausbeute der Butanol-Extraktion sind unter anderem eine möglicherweise zu kurze Extraktionsdauer, negative Synergieeffekte mit anderen Stoffen oder ein Überschreiten des Löslichkeitsproduktes der Saponine anzuführen.

Die Extraktion der Saponine aus den verwendeten Pflanzenmaterialien war reproduzierbar, allerdings kam es zu kleineren Schwankungen bei der Ausbeutemenge (g Pulver). Ursachen dafür sind die angeführten Verluste bei der Extraktion, sowie die Tatsache, dass das verwendete Pflanzenmaterial keinen konstanten Saponingehalt aufweist. Die Saponinkonzentration innerhalb des pflanzlichen Gewebes zeigt saisonale Schwankungen und kann während der Ontogenese stark variieren (Shimoyamada et al., 1990; Augustin et al., 2011). Der Saponingehalt ist zudem abhängig von abiotischen Umweltfaktoren, wie der

Wasser- und Nährstoffverfügbarkeit und den Lichtverhältnissen (Szakiel et al., 2011 a + b). Welche Auswirkung die Lagerung der getrockneten Pflanzenmaterialien auf den Saponingehalt hatte ist nicht bekannt. Es ist eine Weiterentwicklung der Methode anzustreben, bei der die Extraktion an die Löslichkeit der spezifischen Saponine einer Pflanze angepasst wird, um die Wirkstoffe in höheren Konzentrationen anzureichern.

## **5.2. Auswertung des Ascosporenpotenzials und Blattabbau**

Im ersten Versuchsjahr bestätigte sich die bereits in Vorversuchen (Kollar und Pfeiffer, 2005; Pfeiffer und Kollar, 2004) untersuchte Wirkung des TSB. Die Ascosporenmenge wurde durch die Falllaubbehandlung stark verringert und die Verrottung der Blätter deutlich gefördert. Eine vorherige Hitzebehandlung, die zu einer vollständigen Lösung des Pulvers, einer Abtötung aller enthaltenen Mikroorganismen und einer Denaturierung der Proteine führte, hatte keinen Einfluss auf die Effizienz des Präparates, so dass dieser energieaufwendige Probenvorbereitungsschritt in künftigen Behandlungen nicht mehr durchgeführt wurde. Das Ethanol-extrakt- und präzipitat von TSB wurden verwendet, um zu prüfen ob ausschließlich ethanollösliche/unlösliche Fraktionen des Präparates für die Wirkung verantwortlich sind. Beide Extrakte zeigten einen ähnlichen Wirkungsgrad, der jedoch deutlich niedriger war als der des Ausgangsproduktes. Für die Wirkung des Präparates sind demnach sowohl ethanollösliche Bestandteile, als auch das Pellet verantwortlich, so dass in folgenden Versuchsjahren das nicht aufgearbeitete Produkt appliziert wurde. Niedrigere TSB Konzentrationen (4,5%) führten nicht zu einer ausreichenden Verminderung des Ascosporenpotenzials.

Die Wirkung des Präparates ist auf die enthaltenen Abbauprodukte des Caseins zurückzuführen. Dies wurde durch die, in allen 3 Versuchsjahren, hohen Wirkungsgerade von pepsinverdaulichem Casein bzw. Säurehydrolyse Produkten von Casein auf das Ascosporenpotenzial bestätigt. Die Peptide von Soja, die ebenfalls ein wichtiger Bestandteil von TSB sind, wiesen einen geringeren Wirkungsgrad auf. Der Abbau des Falllaubs wurde durch alle Caseinbehandlungen verstärkt, was auf eine erhöhte mikrobielle Aktivität auf dem Falllaub bzw. eine Förderung der mikrobiellen Population hinweist.

Bei den Hefebehandlungen 2010/11 war, wie auch beim TSB, das unbehandelte Präparat am wirkungsvollsten. Eine vorherige Hitzebehandlung bzw. die Verwendung eines Ethanol-extraktes- oder präzipitates konnte die Wirksamkeit nicht entscheidend verbessern. Im folgenden Versuchsjahr wurde eine höher konzentrierte Hefebouillon getestet, die zu einer Steigerung der Wirkung um etwa 60% führte. Die Weiterentwicklung zu einem konzentrierten Hefeextrakt, in dem wasserlösliche Bestandteile angereichert waren, führte zu einer nahezu vollständigen Inhibierung der Ascosporenfreisetzung. Die Präparation des konzentrierten Hefeextraktes gestaltete sich dabei zunächst schwierig. Die hohe Hefeextraktkonzentration führte zu einem verklumpen der Suspension beim anrühren und war nur schwer in Lösung zu bringen (ca. 1 h), da das Löslichkeitsprodukt überschritten war. Dieses Problem wurde durch das mechanische einrühren des Hefeextraktes und einen anschließenden Zentrifugationsschritt, bei dem unlösliche Bestandteile abgetrennt wurden, gelöst. Das Pellet des konzentrierten Hefeextraktes wies eine relativ feste Konsistenz auf. Unter Zugabe von Wasser konnte das Pellet gelöst und ebenfalls auf dem Falllaub ausgebracht werden. Die Behandlung bewirkte eine Verminderung des Ascosporenpotenzials um 86%. Das Pellet enthält demnach ebenfalls wirksame Inhaltsstoffe. Die Weiterentwicklung des LEIBER Hefeextraktes in den 3 Versuchsjahren korrelierte mit der

## Förderung des Blattabbaus.

Pyridoxin (Vit. B<sub>6</sub>) und Nicotinsäure (Vit. B<sub>3</sub>) haben nachweislich einen positiven Effekt auf die Entwicklung von *V. inaequalis* (Leben und Keitt, 1948; Fothergill und Ashcroft, 1955 a + b). Das Vorhandensein von Thiamin gilt sogar als essentiell. Da diese Vitamine im Autolysat der Hefe vorkommen, sollte geklärt werden, ob sie in den verwendeten Konzentrationen zu einer Förderung des Erregers beitragen. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden. Eine Vitaminkonzentration, die den Vitaminen in dem 6%igen Hefeextrakt entsprach reduzierte die Ascosporenfreisetzung in geringem Umfang. Höhere Konzentration des Vitamin-Mixes hemmten die Ascosporenpoduktion nahezu komplett. Effektivster Bestandteil war dabei Vitamin B<sub>3</sub>, welches in einer Einzelbehandlung das gleiche Potenzial zeigte.

Der Vitamin-Mix konnte nur als Dispersion angesetzt werden, da in der verwendeten Konzentration das Löslichkeitsprodukt überschritten war und einzelne Bestandteile ausfielen. Das Präparat war daher nicht homogen und wurde ungleichmäßig auf dem Falllaub ausgebracht. Die alleinige Verwendung von Vitamin B<sub>3</sub>, welches vollkommen löslich war, konnte das Ascosporenpotenzial genauso effektiv reduzieren wie der Vitamin-Mix. Trotz der hohen Wirksamkeit von Vitamin B<sub>3</sub> wäre im Vorfeld einer Präparatoptimierung/-weiterentwicklung eine Prüfung der Kosten zu diskutieren. Die Verrottung des Falllaubs war durch die Vitaminbehandlung leicht gefördert. Die Blätter wiesen kleinere Strukturveränderungen und Ablösungen an der Epidermis auf, was auf die Aktivität pectinolytischer Enzyme hindeuten könnte. Eine Förderung von Pectinasebildnern, durch die Behandlung des Falllaubs mit Vitaminen, wird daher als eine mögliche Ursache für den Blattabbau in Betracht gezogen.

Für die Heißwasser Auszüge aus Pflanzenextrakten (Tees) konnte nur ein geringer Effekt auf die Reduktion des Ascosporenpotenzials nachgewiesen werden. Die Konzentration der in Lösung gegangenen Saponine und/oder die verwendete Menge der Pflanzenextrakte war offenbar zu gering um einen fungiziden Effekt auf den Erreger zu erhalten. Im Versuchsjahr 2011/12 wurde daher eine Extraktionsmethode zur gezielten Anreicherung von Saponinen (3.1.2.) verwendet. Das fungizide Potenzial der Extrakte wurde in vorherigen Konidien- und Wachstumshemmtests ermittelt (4.1.1; 4.1.2.). Alle Saponine wurden in Konzentrationen von 1 000 ppm, Quillajasaponin mit 10 000 ppm appliziert. Die gewählten Konzentrationen lagen deutlich über den IC<sub>50</sub>-Werten der Saponinextrakte. Die Behandlung des Falllaubs mit diesen Extrakten führte zu einer starken Förderung des Ascosporenpotenzials. Eine mögliche Ursache wäre dass die sexuelle Phase des Apfelschorfs durch die „verschlechterten“ Umweltbedingungen verstärkt initiiert wurde. Zudem könnte die Saponinbehandlung auf Konkurrenten von *V. inaequalis* eine stärkere Wirkung als auf den Erreger selbst gehabt haben und somit indirekt die Vermehrung von *V. inaequalis* begünstigt haben. Weiterhin muss in Betracht gezogen werden, dass Saponine aufgrund ihrer membranolytischen Wirkung, das Nährstoffangebot verbessert haben (Aufschluss von Nährstoffen, Zellyseprodukte von Bakterien etc.) und somit indirekt zu einer Förderung des Erregers bewirkt haben.

Höhere Saponinkonzentrationen im Versuchsjahr 2012/13 bestätigten das Potenzial der Pflanzenextrakte für die Schorfbekämpfung. Die Ascosporenmenge konnte um bis zu 90% (1% Aescin) vermindert werden, wobei eine Terminierung der Falllaubbehandlungen im späten Winter (Jan., Feb.) sich als besonders günstig erwies. An einigen

Behandlungsterminen kam es bereits kurze Zeit nach dem Ausbringen der Extrakte zu starkem Niederschlag bzw. Schneefall, so dass auch von einer „Verdünnung“ der Saponine und damit einer abgeschwächten Wirkung der Präparate ausgegangen werden muss. Eine häufige Applikation der Extrakte (4x) oder aber eine noch höher konzentrierte Lösung scheint daher notwendig zu sein, um hohe Wirkungsgerade zu gewährleisten. Der Blattabbau wurde durch die Applikation von Saponinen nicht verstärkt, da diese eine fungizide/bakterizide Wirkung haben.

*Leptosphaeria* sp. (C8), der in *vitro* als Antagonist von *V. inaequalis* identifiziert wurde, konnte im Freiland nicht zu einer Reduktion des Ascosporenpotenzials beitragen. Mögliche Ursachen wären, dass der Pilz sich auf dem Falllaub nicht etablieren konnte, die Synthese von Hemmstoffen auf dem natürlichen Blattmedium nicht/oder nur in geringen Konzentrationen stattfand oder die Hemmstoffe eine geringe Stabilität aufwiesen.

Der pH-Wert aller vom Falllaub abgewaschenen, wässrigen Suspensionen lag zwischen 4 und 7,3 und sollte demnach keinen Einfluss auf die Entwicklung des Erregers gehabt haben.

### **5.3. Förderung der mikrobiellen Aktivität auf dem Falllaub**

Für die Nährmedien auf Basis von Casein und die Hefeextrakte konnte mit Hilfe der CFUs eine starke quantitative Förderung der laubzersetzenden Mikroben nachgewiesen werden. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der Konzentration der Nährmedien und einer steigenden mikrobiellen Aktivität aufgezeigt werden. Die beste Wirkung hatte ein konzentriertes Hefeextrakt. Die Nährmedien, die das Wachstum und die Aktivität der Falllaubepiphyten am stärksten gefördert hatten, stellten gleichzeitig auch die wirkungsvollsten Präparate zur Reduktion des Ascosporenpotenzials dar. Durch die Förderung der mikrobiellen Gemeinschaft konnte die Fruchtkörperbildung von *V. inaequalis* beeinträchtigt werden. Eine vorherige Hitzebehandlung und das Ethanolextrakt oder -präzipitat von TSB bzw. dem Hefeextrakt zeigten keine verbesserte Wirkung gegenüber dem Ausgangsprodukt.

Die Vitamin- und Saponinpräparate zeigten das Potenzial die Ascosporenmenge zu vermindern, hatten gleichzeitig aber keinen positiven Effekt auf das Wachstum und die Aktivität der Bakteriengemeinschaft. Eine verstärkte Aktivierung der mikrobiellen Abbauprozesse im Falllaub konnte daher nicht beobachtet werden. Eine direkte fungizide Wirkung der Saponine und Vitamine auf den Apfelschorf ist wahrscheinlich.

In allen Blattdepots konnte, unabhängig von der Behandlung, eine Zunahme der mikrobiellen Populationsstärke vom Winter bis zum Beginn der Primärsaison beobachtet werden. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich durch die jahreszeitlichen meteorologischen Bedingungen und den Fortschritt/Zustand des Laubabbaus bedingt.

Die Populationsgröße der Bakterien war Ende Februar etwa hundertfach höher als die der Pilze. Im Laufe der jahreszeitlichen Entwicklung nahm sie jedoch in allen Blattdepots ab. Dieser Prozess spiegelt die natürliche Sukzession der Mikroorganismen auf dem Falllaub wieder. Zu Beginn des Blattabbaus sind die Pilze die wichtigsten Destruenten. Sie können eine Vielzahl extrazellulärer Enzyme synthetisieren, die zum Abbau von Cellulose, Hemicellulosen und Pektin führen. Durch die Abbauprozesse der Pilze werden verstärkt Spaltprodukte von Polysacchariden freigesetzt, die als Substrat für Bakterien dienen können

(Romani et al., 2006). Dadurch steigt der Anteil der Bakterien an der mikrobiellen Gemeinschaft an. Die Bakterien agieren durch die Produktion fungizider Substanzen und die Freisetzung chitinolytischer Enzyme als pilzliche Antagonisten, so dass der Anteil der Pilze sinkt.

Das Oxi-Top-Messgerätes erwies sich als ein geeignetes Testsystem, um den Effekt der Nährmedien auf die mikrobielle Aktivität zu untersuchen. Für zukünftige Versuche zur Beeinträchtigung des Ascosporenpotenzials durch das Ausbringen von Nährmedien könnte es daher als erste Screening-Methode verwendet werden, um die potenzielle Wirkung der Nährmedien abzuschätzen.

#### 5.4. Analyse der Epiphytengemeinschaft

Bei der Analyse der qualitativen Zusammensetzung der Mikrobengemeinschaft auf dem Falllaub konnten die Pseudomonaden, als Leitorganismen identifiziert werden. Sie konnten sowohl von den unbehandelten Blättern der Kontrolle, als auch von allen behandelten Falllaubdepots isoliert werden. Einen besonders hohen Anteil an der Epiphytengemeinschaft stellten die Pseudomonaden bei den mit Hefeextrakt, TSB, Casaminoacids und dem Vitamin-Mix behandelten Falllaubdepots dar. Die Nährmedien hatten somit einen positiven Effekt auf das Wachstum der Pseudomonaden. Saponinbehandlungen führten, aufgrund ihrer bakterioziden Wirkung, zu einer Abnahme der Populationsstärke. Eine qualitative Verschiebung der Arten/Gattungen konnte durch die Behandlung der Blattdepots mit Nährmedien nicht nachgewiesen werden. Behandlungen mit Saponinen und Harnstoff führten dagegen zu einer größeren Diversität der Arten/Gattungen als in der Kontrolle. Diese traten jedoch nur mit geringen Populationsstärken auf.

Die identifizierten Gruppen der Pilze zeigten eine weitgehend gleichmäßige Verteilung an der Epiphytengemeinschaft, es konnten keine dominanten Arten nachgewiesen werden. Wichtige Vertreter waren jedoch die Hefen, *A. pulluans* und die systematischen Einheiten 4+7, die einen Anteil > 10% an der Gesamtgemeinschaft hatten. Andere Pilzarten/gattungen kamen nur in geringerem Umfang vor. Die Analyse der pilzlichen Epiphytengemeinschaft zeigt, dass es durch die Behandlung mit Nährmedien zu einer geringfügigen quantitativen und qualitativen Verschiebung des Artgefüges kam.

Im Vorfeld der mikrobiologischen Populationsanalysen wurde erwartet, dass Actinomyceten zu den Leitorganismen des Falllaubs gehören. Sie gelten als wichtige Destruenten und haben einen entscheidenden Anteil am Abbau organischer Materialien. Vom Falllaub konnten zwei Vertreter der Actinomyceten isoliert werden. *C. flaccumfaciens* und *R. fascians* die zusammen einen Anteil von bis zu 12% an der Gemeinschaft der Mikroben aufwiesen. Zu Beginn der Isolationsversuche von Mikroben des Falllaubs wurde ein Actinomyceten-Isolationsagar verwendet, auf diesem konnte jedoch nur das Wachstum von *Pseudomonaden* nachgewiesen werden. Der geringe Anteil der Actinomyceten im Falllaub ist möglicherweise darauf zurück zu führen, dass der Abbau der Blätter zum Zeitpunkt der Isolation (08.03.11; 26.04.12) noch nicht so weit fortgeschritten war. Actinomyceten besiedeln frische Substrate langsamer als Pilze und andere Bakterien. Ihr Anteil steigt erst im Verlauf der Falllaubsukzession, durch ihre Fähigkeit u.a. Lignin und die pilzliche Biomasse abzubauen, weiter an (Benner et al., 1984; Kirby, 2006).

Es wurde ebenfalls erwartet, dass die Behandlung der Falllaubdepots mit Nährmedien zu

einer größeren qualitativen/quantitativen Verschiebung innerhalb des Artgefüges führt und einzelne Arten, die die zusätzliche Nährstoffquelle besonders gut verwerten können die Gemeinschaft dominieren oder neue Arten hinzukommen. Diese Hypothese bestätigte sich nicht.

Die Biodiversität der isolierten Arten/gattungen war gering. Dies könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass ausschließlich die Analyse der mit den verwendeten Nährmedien kultivierbaren Arten erfolgte. Um die tatsächliche Diversität der mikrobiellen Gemeinschaft zu erfassen sollten in zukünftigen Analysen molekularbiologische Methoden, wie z.B. FISH (fluoreszente In - situ - Hybridisierung) - Technik oder die DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) mit einbezogen werden.

Die Zusammensetzung der natürlichen bakteriellen Gemeinschaft wurde an den Standorten Dossenheim und Weinsberg vergleichend untersucht. Die Pseudomonaden stellten an beiden Standorten die dominante Gattung dar. *P. agglomerans*, *C. flaccumfaciens* und nicht identifizierte Arten kamen ebenfalls an beiden Standorten in annähernd gleichen quantitativen Verhältnissen vor. Das Auftreten von *E. americana* konnte nur in Dossenheim, das von *Burkholderia* sp. in Weinsberg nachgewiesen werden. Insgesamt betrachtet konnten an den beiden Standorten jedoch keine größeren qualitativen und quantitativen Unterschiede in der Zusammensetzung der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft festgestellt werden. Dies bestätigt die wissenschaftliche Hypothese, dass die Zusammensetzung des Aeroplanktons weltweit sehr gleichmäßig und qualitativ sogar im Hochgebirge identisch sein kann. Selbst bei einer geringen Abweichung folgt dem Mikrobenniederschlag die Selektion durch die Blattökologie, die standortunabhängig ist. Es wird daher von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Dossenheim und Weinsberg auf andere Standorte ausgegangen. Die hinsichtlich des Ascosporenpotenzials gleichartig wirkenden mikrobienfördernden Nährmedien bestätigen diese Schlussfolgerung.

### 5.5. potenzielle Antagonisten

Als potenzielle Antagonisten des Apfelschorfs konnten in Dualkulturen *S. rhizophilla*, *Pseudomonas* spp. und *S. silvestris* identifiziert werden. Dabei ist besonders das antagonistische Potenzial der Pseudomonaden als bedeutend einzuschätzen, da diese mit 37% die dominante Gattung der Bakteriengemeinschaft darstellen. Die Freisetzung von Hemmstoffen konnte auch durch Versuche in Flüssigkultur bestätigt werden. Fadenpilze hemmten das Wachstum von *V. inaequalis* auf Agarplatten bis zu etwa 70%. Zusammen haben diese antagonistischen Arten/Gattungen einen Anteil von 42% an der pilzlichen Epiphytengemeinschaft und somit einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung und das Wachstum von *V. inaequalis*.

Die Ergebnisse aus den Hemmtests zeigen das antagonistische Potential der Epiphyten des Falllaub auf. Durch die „Düngung“ der Blätter mit Nährmedien konnte diese Mikroorganismengemeinschaft gefördert werden und durch Nahrungskonkurrenz/Freisetzung von Hemmstoffen die Entwicklung des Apfelschorferregers beeinträchtigen. Wie hoch das antagonistische Potenzial dieser Gemeinschaft tatsächlich ist bzw. wie stark der Konkurrenzdruck auf den Apfelschorferreger erhöht wird kann nicht genau abgeschätzt werden. Es muss berücksichtigt werden, dass mit den angewendeten Kultivierungsverfahren/-techniken nicht alle auf dem Falllaub vorkommenden Mikroorganismen isoliert werden konnten, so dass die tatsächliche Artendiversität als

deutlich höher einzuschätzen ist. Zudem kann von den Ergebnissen der Hemmstofftests *in vitro* nicht auf das fungizide Potential der Organismen im Freiland geschlossen werden, da dort andere abiotische (Nährstoffverfügbarkeit, Licht, Wasser) und biotische (Konkurrenz, Parasitierung) Bedingungen vorliegen, die die Produktion und Freisetzung von Hemmstoffen beeinflussen. Auch das Verteilungsverhalten/Toxizität dieser Substanzen im Falllaub kann gegenüber dem von Hemmstoffen auf Agarplatten stark verändert sein und somit zu einer verstärkten/abgeschwächten Wirkung auf den Erreger führen.

## 5.6. Präparatanalyse

Die Zusammensetzung der Nährmedien, die eine Förderung der Falllaubepiphyten und einen damit verbundenen stärkeren biologischen Abbau der Blätter bewirkten, wurde analysiert. Saccharide und Zuckeralkohole stellten bei den Nährmedien einen Anteil von 12-46% am Gesamtpräparat dar. Bei den Casaminoacids, die in allen 3 Versuchsjahren die Ascosporenmenge um  $\geq 80\%$  herabsetzen konnten, nur einen Anteil von 0,6%, so dass davon auszugehen ist, dass diese Fraktion der Nährmedien nicht zu einer wesentlichen Förderung der Epiphyten beiträgt.

Bei den Nährmedien handelte es sich um Abbauprodukte von Casein und Soja, sowie Autolysate von Bierhefen. Es wurde daher angenommen, dass größere Peptide nur einen geringen Anteil am Gesamtpräparat aufweisen. Die Bestimmung des Peptidgehaltes nach Biuret bestätigte diese Hypothese. Peptide mit einem Molekulargewicht zwischen 5 und 3 kDa hatten nur einen Anteil  $< 0,01\%$  an der Zusammensetzung der Nährmedien und wurden daher als nicht wirksame Stoffe angesehen. Als wichtigste Stoffgruppen konnten freie Aminosäuren und Peptide  $< 3$  kDa identifiziert werden. Diese beiden Stoffgruppen wiesen zusammen einen Anteil von mehr als 80% am Gesamtpräparat auf. Vermutlich sind diese Werte jedoch leicht überbestimmt, da es sich bei den Konzentrationen der Aminosäuren teilweise um abgeschätzte Werte aus der TLC handelt und die Biuret-Methode, durch die starke Eigenfärbung der Präparate, zu einer Überbestimmung des Peptidgehaltes geführt haben könnte.

Bei den hochwirksamen Casaminoacids machten die Aminosäuren 86 % der Inhaltsstoffe aus, die Peptide nur 10%. Eine alleinige Wirkung der Aminosäuren kann jedoch ausgeschlossen werden, da mit einer Aminosäurebehandlung des Falllaubs in der Saison 2011/12 nur eine unzureichende Verminderung der Ascosporenmenge um 64% bewirkt werden konnte. Die Wirkung der Peptide, die in allen anderen Nährmedien die dominante Stoffgruppe stellen, ist daher als ebenso bedeutend einzuschätzen wie die der Aminosäuren. Beide Wirkstoffgruppen stellen offenbar eine wichtige N-Quelle für die Mikroorganismen dar. Es wurde vermutet dass auch Dipeptide einen großen Anteil am Gesamtpräparat aufweisen. Diese konnten mit der TLC jedoch nicht in größeren Konzentrationen nachgewiesen werden.

Welche Stoffklassen für die quantitative Förderung der jeweiligen Epiphyten verantwortlich sind, ist abhängig von den Nährstoffansprüchen der einzelnen Mikroben und ihrer Fähigkeit diese aufzuschließen. Zudem spielt auch die Verfügbarkeit dieser Wirkstoffe auf dem Falllaub, die durch ihre Löslichkeit bzw. die Abwaschung der Nährmedien durch Regen/Schnee bedingt wird eine entscheidende Rolle.

## 5.7. Auswertung der Versuchsparameter Regenwurmaktivität, Blattabbau und Ascosporenpotenzial an der LVWO Weinsberg

In den drei Überwinterungsphasen des Apfelschorfs, während derer Versuche zum Blattabbau, zur Attraktivität der behandelten Blätter für Regenwürmer und zum Ascosporenpotenzial durchgeführt wurden, herrschten sehr unterschiedliche Bedingungen, die erheblichen Einfluss auf die Bodentemperatur und die Bodenfeuchtigkeit hatten. TSB, Pepton Casein, Casaminoacids und der Vitaminmix zeigten auch in den Depots mit Bodenkontakt ein Potential zur Reduzierung der Ascosporenmenge. Allerdings sind die Kosten für die wirksamen Konzentrationen sehr hoch, wenn die Ergebnisse auf Behandlungen einer ganzen Obstanlage übertragen werden müssten.

In der Wirkung sehr wechselnd erwiesen sich die meisten saponinhaltigen Pflanzenextrakte (bei Anwendungen auf das Falllaub in den Wintermonaten). In einigen Fällen wurde das Ascosporenpotenzial im Vergleich zur Kontrolle noch gefördert (z.B. Waschnussaponin). Die folgenden Pflanzenextrakte konnten am Standort Weinsberg das Ascosporenpotenzial nicht senken:

- Waschnuss (leichte Förderung),
- Foodgreen Hefe (5 fache Behandlung ungünstiger als 3 fache),
- 'Jonagold' Mix (bei Variante mit feuchten Bodenverhältnissen Ascosporenwerte fast doppelt so hoch, gleichzeitig schlechtere Abbau durch Regenwürmer)

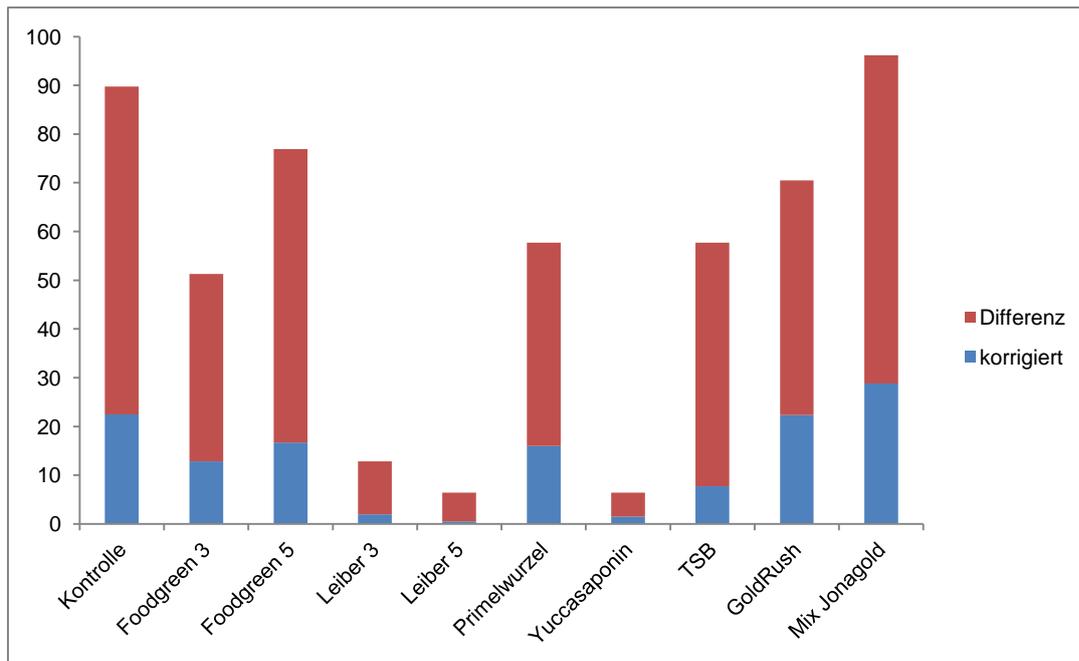
Folgende Behandlungen wurden von Regenwürmern über einen langen Zeitraum „verschmäht“:

- Waschnuss (bis zu 10% schlechter als Kontrolle)
- Yuccasaponin (analog zur Kontrolle)
- Primelwurzelextrakt (10% langsamer als Kontrolle)
- 

Potenzial zur Reduktion der Ascosporenmenge hatten diese Präparate:

- TSB (2011 bis zu 30% Reduktion)
- Vitaminmix (2012 bis zu 50 – 60% Reduktion)
- Baldrian (2012 bis zu 50% Reduktion)
- Pepton Casein (2012 bis zu 80% Reduktion)
- Casaminoacids (2012, ein Termin höher als Kontrolle, danach Reduktion wegen bereits abgebauter Blätter)
- 

Bei der Bewertung des Ascosporenpotenzials bei den Falllaubdepots ohne Bodenkontakt wird in der Regel die Tätigkeit der Regenwürmer völlig außer Acht gelassen, die aber einen ganz erheblichen Einfluss auf die verbleibenden Blattrestmengen hatten. Als Beispiel solle hier ein wichtiger Infektionstermin aus dem Frühjahr 2011 herausgegriffen werden. In Abb. 80 ist eine gestapelte Säule für jede Variante zu sehen.



**Abb. 80:** korrigiertes Ascosporenpotenzial (Abbau der Blätter durch Regenwürmer berücksichtigt)

Die gesamte Höhe entspricht dem ausgeschüttelten Ascosporenpotenzial ohne Berücksichtigung des Abbaus durch die Regenwürmer. Je nach Variante waren aber zu diesem Termin unterschiedliche Laubmengen übrig, z. B. in der Kontrolle 30%, bei LEIBER Hefe N – LS 6% dagegen aber nur 10%. Bei einer hohen Attraktivität behandelter Blätter für die Regenwürmer käme es zu einer entsprechenden rechnerischen Reduktion des Ascosporenpotenzials. Dies würde v.a. den Zeitraum vor der Blüte der Apfelbäume betreffen, der ja hinsichtlich einer Einsparung von kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln im Öko-Obstbau der wichtigste Zeitraum ist. Eine gute Regenwurmaktivität kann dazu führen, dass Laubmengen mit einem Gesamtstickstoffgehalt von ca. 15kg N/ha dem Standort erhalten bleiben und nicht aus dem Ökosystem Obstanlage entfernt werden wie durch mechanische Verfahren (EMS oder EMMA [Laubsauger]). In der kombinierten Bewertung beider Boniturkriterien verschiebt sich das Bild ganz klar zugunsten der Anwendungen der Hefepräparate. Auf der anderen Seite sollten Präparate, die im ökologischen Obstbau als interessant für einen Einsatz gegen Pilzkrankheiten erscheinen, unbedingt hinsichtlich ihrer Effekte auf das Abbauverhalten des Falllaubes durch Regenwürmer geprüft werden. Innerhalb der Anwendungen des Hefeautolysats LEIBER Bouillon N – LS wurden verschiedenste Konzentrationen getestet von 1,1% bis 6%, im Extremfall sogar 60%, diese Konzentration ist zwar hochwirksam bei der Reduktion des Ascosporenpotenzials, aber derzeit sehr teuer. Konzentrationen zwischen 4% und 6% förderten einen schnellen Abbau durch die Regenwürmer, wenn die Bodenbedingungen günstig für die Regenwürmer waren (Temperatur, Feuchtigkeit) und die Bodenstruktur und Bodenart für *Lumbricus terrestris* passten. In den Untersuchungen am Standort Weinsberg zeigte sich, dass nicht unbedingt die der Röhren, in die die Blätter eingezogen wurden, erhöht war, aber die Geschwindigkeit des Blattabbaus höher war. Allerdings bewegt man sich zeitlich in ganz anderen Dimensionen, etwa 4 Wochen günstige Bedingungen waren bei den Hefevarianten für einen vollständigen Abbau von 440 bis 500 g trockenen Blättern je Quadratmeter erforderlich. Eine ungünstige Bodenstruktur verlangsamte den Abbau erheblich und überlagerte die Behandlungseffekte. Der Kupfergehalt des Falllaubes, der aus im Öko - Obstbau üblichen

Kupferbehandlungen resultierte, hatte keinen Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit. Alle Behandlungen, die zu einer Erhöhung des biologischen Sauerstoffbedarfs führten, schienen somit attraktiver für die Regenwürmer. In einem ersten Versuch gelang es sogar, durch eine zusätzliche Hefebehandlung, den hemmenden Einfluss einer Spritzung mit saponinhaltigen Pflanzenextrakten aufzuheben und so den Abbau wieder zu beschleunigen.

Die gewonnenen Daten zur Abbaugeschwindigkeit könnten unter Berücksichtigung von Wetterdaten in Prognosemodelle zum Apfelschorf einfließen, wenn eine grobe Abschätzung der Laubmenge, die von den Apfelbäumen abgeworfen wird und natürlich auch von der Baumhöhe abhängt, vorgenommen wird. Allerdings müsste ein Einsatz von Präparaten, die die Attraktivität des Falllaubes für die Regenwürmer erhöhen, von der obstbaulichen Beratung gut begleitet werden, um optimale Einsatzzeitpunkte zu identifizieren. Ergänzende Messungen zum jeweiligen biologischen Sauerstoffbedarf mit dem Oxitop-Messgerät könnten Aufschluss über die Höhe der mikrobiellen Besiedlung auf dem Falllaub der betreuten Apfelanlage geben.

## **6. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse**

Durch die Falllaubbehandlungen mit Nährmedien konnte eine starke Reduktion des Ascosporenpotenzials bewirkt werden. Ein konzentriertes Hefeextrakt erwies sich als besonders effektiv und hatte gleichzeitig eine attraktive Wirkung auf Regenwürmer. Die Fressleistung der Regenwürmer war so stark gesteigert, dass bis zum Beginn der primären Infektionszeiten für den Schorfpilz die Blätter vollständig in den Boden gezogen waren. Der Infektionsdruck war dadurch im Frühjahr deutlich gesenkt, was die Gefahr für Blatt- und Fruchtschorf reduzieren könnte. Die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten könnten daher mittel- bis langfristig zu einer höheren Produktivität des ökologischen Obstbaus führen. In der Praxis könnte durch die Anwendung phytosanitärer Maßnahmen die Aufwandmenge an Fungiziden und die Zahl der Spritzungen deutlich verringert werden. Möglicherweise könnten auch Fungizide mit einem geringeren Wirkungsgrad erfolgreich eingesetzt werden. Die wirtschaftliche Bedeutung alternativer Präparate für die Schorfbekämpfung ist daher als hoch einzuschätzen.

Vor dem Hintergrund einer ungewissen Zulassungssituation bei Pflanzenschutzmitteln für den ökologischen Obstbau, sowie dem Durchbruch der Schorffresistenz bei mehreren schorffresistenten Apfelsorten, werden „Hygienemaßnahmen“ speziell im ökologischen Obstbau zunehmend von großer Bedeutung sein. Die Entwicklung eines hochwirksamen phytosanitären Präparates für die Falllaubbehandlung ist daher als sehr bedeutend einzuschätzen. Die Unbedenklichkeit des Präparates und die Konformität mit der EG-Ökoverordnung sind gegeben, da es sich bei dem Hefeextrakt um eine laut Öko-Kontrollstelle: „Zubereitung aus Mikroorganismen (nicht lebend) zur Förderung der natürlichen Kompostierung“ (kein Pflanzenschutzmittel) handelt. Das Präparat könnte als nicht toxischer Bodenhilfsstoff zur Anwendung kommen, ohne die Zulassungshürden eines Pflanzenschutzmittels überwinden zu müssen, so dass eine schnelle Einführung in die Praxis möglich wäre. Das Originalprodukt, wäre derzeit für den Pflanzenschutz jedoch noch nicht oder nur bedingt vermarktungsfähig. Die praktischen Einschränkungen sind vor allem vor dem Hintergrund der Kosten, der eigenen notwendigen Aufarbeitungen (Rezepturen) und einer fundierten Anwendungsberatung zu erkennen. Für eine gezielte Entwicklung eines Bierhefeproduktes bis hin zur Marktreife wäre daher die Zusammenarbeit mit einem

Industriepartner wünschenswert, der ab der „Brauerei“ alle Produktionsschritte über Zwischenprodukte bis zum gewünschten Endprodukt mit hoher eigener Expertise und mit den notwendigen Qualitätskontrollen in Eigenregie umsetzen kann.

Die im vorliegenden Projekt gewonnenen Ergebnisse fließen in großflächige Versuche zur Kombination aus Förderung des Laubabbaus und der Kupferminimierung, in Öko – Obstanlagen im Rheinland, im Alten Land, in Sachsen und am Bodensee, ein. Ein Teil der saponinhaltigen Pflanzenextrakte sollte unbedingt bei der protektiven Anwendung gegen Apfelschorf auf dem Blatt getestet werden. Zwei kleinere Vorversuche zum Waschnussaponin wurden bereits außerhalb dieses Forschungsprojektes im „normalen“ Versuchsprogramm der LVWO Weinsberg durchgeführt.

## **7. Geplante – erreichte Ziele. Eine Gegenüberstellung**

Prinzipiell sollten in dem Projekt zwei Hauptziele verfolgt werden. Zum einen sollte eine effektive Reduktion des Ascosporenpotenzials durch die Förderung mikrobieller Konkurrenz oder durch eine fungizide Wirkung auf den Schorfpilz selbst erreicht werden. Zum anderen sollte die Attraktivität der behandelten Blätter für Regenwürmer gefördert werden, um somit die Ascosporenmenge indirekt zu vermindern. Beide Ziele konnten erfolgreich experimentell umgesetzt werden. Für die Falllaubbehandlung konnten Medien auf Basis von Caseinabbauprodukten entwickelt werden, die zu einer starken Förderung der mikrobiellen Konkurrenz und einer Reduktion des Ascosporenpotenzials führen. Als besonders effektiv erwies sich ein konzentriertes Hefeextrakt, welches das Ascosporenpotenzial nahezu vollständig inhibieren konnte. Das Präparat erreichte offenbar durch die Förderung von laubzersetzenden natürlichen Mikroben eine effiziente Bekämpfung der Fruchtkörperbildung und/oder Sporenausschleuderung. Der hohe Wirkungsgrad des konzentrierten LEIBER Hefeextraktes konnte sowohl in Dossenheim, als auch in Weinsberg bestätigt werden. Gleichzeitig erwiesen sich die so behandelten Blätter als sehr attraktiv für Regenwürmer. Die Fressleistung der Regenwürmer war so stark gesteigert, dass bis zum Beginn der primären Infektionszeiten für den Schorfpilz die Blätter vollständig in den Boden gezogen waren. Indirekt konnte somit das Ascosporenpotenzial fast vollständig reduziert werden. Ein weiteres Teilziel war es die Wirkung der Nährmedien genauer zu untersuchen, um Fragen bezüglich der genauen mikrobiologischen Wirkmechanismen zu beantworten. Die Analyse der Mikrobengemeinschaft sollte Aufschluss darüber geben welche qualitative Mikrobenezusammensetzung für die Wirkung der Nährmedien verantwortlich ist und ob es infolge der Behandlungen zu quantitativen Verschiebungen innerhalb der Gemeinschaft kommt.

Es konnte gezeigt werden, dass höhere Konzentrationen der Präparate zu einer gesteigerten Wirkung führten, was durch eine verstärkte Förderung laubzersetzender Mikroben bedingt wurde. Die vergleichende Analyse der Mikrobengemeinschaft in Dossenheim und Weinsberg zeigte, dass die qualitative Zusammensetzung weitgehend standortunabhängig ist. Durch die Behandlungen mit den Nährmedien konnte bei den Bakterien keine qualitative Verschiebung innerhalb der Epiphytengemeinschaft nachgewiesen werden, bezüglich der Pilze kam es zu leichten Verschiebungen. Als Leitorganismen konnten die Pseudomonaden identifiziert werden, die bei einer Behandlung des Falllaubs mit den Nährmedien quantitativ anstiegen. Bei den Pilzen wurden keine dominanten Arten/gattungen nachgewiesen. Auch hier konnte eine gleichmäßige Förderung der Gemeinschaft infolge der Behandlungen nachgewiesen

werden. Der Wirkmechanismus der Nährmedien konnte zum Teil aufgeklärt werden. In allen Fällen korrelierte die Verminderung des Ascosporenpotenzials mit einem verstärkten Laubabbau. Eine enzymatische Laubzersetzung durch die Organismen des Falllaubs wird daher als sehr wahrscheinlich angenommen. Ferner führten die Applikation von Nährmedien zu einer starken Förderung konkurrierender Mikroben und potenzieller Antagonisten des Apfelschorfs. Die antagonistische Wirkung einzelner Mikroorganismenarten/gattungen konnte dabei in Biotests nachgewiesen werden.

Ein weiteres Ziel war die Entwicklung von gezielten Extraktionsverfahren zur Herstellung der Nährmedien. Dieses konnte insofern umgesetzt werden, als das für die Herstellung des konzentrierten LEIBER Hefeextraktes ein spezielles Extraktionsverfahren entwickelt wurde, welches zu einer besseren Applikationsfähigkeit führte. Eine Extraktion mit thermischen Verfahren bzw. eine Extraktion der Medien mit Lösungsmitteln führte nicht zu einer Steigerung der Produkteffizienz. Die Quantifizierung von Substanzklassen der Nährmedien und Einordnung in Wirkstoffgruppen sollte durch verschiedene Analysemethoden wie z.B. die HPLC, TLC und Gelfiltration erfolgen. Mit den genannten Verfahren konnten die Nährmedien in die verschiedenen Substanzklassen aufgetrennt werden. Kleine Peptide (< 3 kDa) und freie Aminosäuren konnten dabei als wirksame Substanzen identifiziert werden. Die geforderte Unbedenklichkeit der Substanzen und die Vereinbarkeit mit den Prinzipien des ökologischen Anbaus war bei den entwickelten Präparaten gegeben, da es sich um Autolysate von Hefen bzw. Abbauprodukte von Casein handelt, die als nicht toxische Bodenhilfsstoffe definiert werden können (Öko-Kontrollstelle).

Die Entwicklung von fungiziden Präparaten aus Pflanzenextrakten war nur zum Teil erfolgreich. Mit Hilfe von Konidien- und Wachstumshemmtests konnten Pflanzenmaterialien, welche ein hohes fungizides Potential aufweisen identifiziert werden. Als Leitsubstanzen wurden dabei sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, in Form von Saponinen nachgewiesen. Durch die Entwicklung geeigneter Extraktionsverfahren gelang es unwirksame Substanzen z.B. Lipide abzutrennen und wirksamen Substanzen anzureichern. Die Ausbeute der Saponinextrakte war jedoch zu gering, so dass eine Weiterentwicklung der Methode, mit verbesserten Extraktionsbedingungen anzustreben ist. Im Vorfeld sollten Löslichkeitsstudien einen Anhaltspunkt für die Entwicklung neuer Verfahren liefern. Die gewonnenen Extrakte zeigten trotz geringer Saponinkonzentrationen eine fungizide Wirkung und das Potenzial den Erreger des Apfelschorfs in der Phase der Fruchtkörperentwicklung zu „stören“. Ein Problem waren jedoch die hohen benötigten Aufwandmengen der Extrakte im Freiland, sowie die Gefahr den Erreger in seiner Entwicklung zu fördern (erhöhtes Ascosporenpotenzial). Vor diesem Hintergrund sind weitere Analysen zur Wirkweise der Saponine und zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse/stabilität der Wirkung zwingend notwendig.

## **8. Zusammenfassung**

Der Falllaubabbau im Sinne einer offensiven Bekämpfung des Apfelschorfs tötet oder schwächt die pilzlichen Strukturen, die für die Primärinfektionen im Verlauf der Epidemiologie im Frühjahr verantwortlich sind. Die Aufgabenstellung des Projektes war die Förderung von Mikroben zur Verbesserung des Blattabbaus durch Nährmedien und die Entwicklung fungizider Pflanzenextrakte. Die Effekte im Freiland auf den Blattabbau durch

mikrobiologische Zersetzung, Regenwurmaktivität und auf das Ascosporenpotenzial wurden untersucht. Die biochemischen Fraktionen der Medien und der Pflanzenextrakte wurden zur Detektion von Substanzklassen verwendet die für die jeweilige Wirkungsweise verantwortlich waren. Die mikrobiologische Analysen des Falllaubes ergaben eine deutliche Erhöhung der Organismenzahl sowie der mikrobiologischen Aktivität. In der Mehrzahl der Proben war die Zusammensetzung der Mikroorganismen im Vergleich zu Kontrollblättern nur quantitativ verändert und eine Verschiebung innerhalb der dominanten Spezies konnte nicht festgestellt werden. Die Falllaubbehandlungen bewirkten in Abhängigkeit der Zusammensetzung der Medien (Stickstoffverbindungen) eine signifikante Reduktion des Sporenpotenzials bis zu einem vollständigen Verlust. Hefepräparate bewirkten einen deutlich beschleunigten Abbau durch die Regenwürmer. Die gesteigerte Aktivität der Mikroorganismen könnte ein Grund für die Attraktivität von hefebehandeltem Falllaub für Regenwürmer sein, da diese von Mikroben angedaute Blätter bevorzugen. Die Wirksamkeit der Saponine konnte anhand biochemischer Präparationen und pflanzlichen Rohextrakten aufgezeigt werden. Die grundlegenden Ergebnisse der Studie können zur Verbesserung der Bekämpfungstrategien gegen den Apfelschorf im ökologischen Obstbau im Sinne eines Kupferersatzes führen.

## 9. Literaturverzeichnis

Augustin, J.M.; Kuzina, V.; Andersen, S.B. & Bak, S. 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **72**: 435-457

Benner, R.; Newell, S.Y.; Maccubbin, A.E. & Hodson, R.E. 1984. Relative contributions of bacteria and fungi to rates of degradation of lignocellulosic detritus in small-marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **48**: 36-40

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254

Fothergill, P.G. & Ashcroft, R. 1955 a. Further nutritional requirements of *Venturia inaequalis*. *Journal of General Microbiology* **13**: 399-407

Fothergill, P.G. & Ashcroft, R. 1955 b. The nutritional requirements of *Venturia inaequalis*. *Journal of General Microbiology* **12**: 387-395

Golba, B. 2001. Alternativen zum Einsatz von kupferhaltigen Präparaten im Apfelanbau, Ergebnisse einer Literaturrecherche im Auftrag der BLE, TU-München, Fachgebiet Obstbau

Kirby, R. 2006. Actinomycetes and lignin degradation. *Advacet Applied Microbiology* **58**: 125-132

Kohl, R., Blanco, J., Kollar, A. 1994. Detection of infection periods and evaluation of the parameters for the epidemiology of the apple scab disease. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **101 (4)**: 378-385

Kollar, A. 1998. A simple method to forecast the ascospore discharge of *Venturia inaequalis*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **105 (5)**: 489-495.

Kollar, A . 1998. Eine einfache Methode zur Bestimmung der potentiellen Ascosporenausschleuderung von *Venturia inaequalis*. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem **357**: 259.

Kollar, A. 2000. A waterbath method for detection of potential ascospore discharge of *Venturia inaequalis*. Bulletin IOBC wprs, **23 (12)**: 53-60.

Kollar, A. und Pfeiffer, B. 2005. Schorfbekämpfung in der Zeit nach dem Blattfall ? Obstbau **30 (10)**: 518-521.

Kollar, A. und Pfeiffer, B. 2005. Schorfbekämpfung in der Zeit nach dem Blattfall ? Öko-Obstbau **3**: 8-10.

Kollar, A. & Pfeiffer, B. 2005. Schorfbekämpfung in der Zeit nach dem Blattfall? Obstbau **30 (10)**: 518-521

Kollar, A. & Pfeiffer, B. 2003. Schlussbericht zum Forschungsprojekt Nr. 02OE109, Untersuchungen zum Einsatz alternativer Stoffe zur Regulierung des Apfelschorfes. Geschäftsstelle Bundesprogramm ökologischer Landbau in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Bonn

Leben, C & Keitt, G.W. 1948. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. V. The influence of carbon and nitrogen sources and vitamins on growth in vitro. *American Journal of Botany* **35**: 337-343

Pahlow, M. 1993. Das grosse Buch der Heilpflanzen. Gräfe und Unzer, München, **119**: 288, 289.

Pfeiffer, B. 2002. Greenhouse experiments on control of *Venturia inaequalis* – First results. In: FÖKO (Hrsg.): 10<sup>th</sup> International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture – 4<sup>th</sup> to 7<sup>th</sup> February 2002, Weinsberg. Proceedings 81-85.

Pfeiffer, B. und Kollar, A. 2004. Untersuchungen an Pflanzenextrakten zur Bekämpfung von Apfelschorf im ökologischen Obstbau. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtsch. Berlin-Dahlem **396**: 145.

Pfeiffer, B. und Kollar, A. 2004. Untersuchungen zum Falllaubabbau beim Apfel zur Bekämpfung des Apfelschorfes, *Venturia inaequalis*. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtsch. Berlin-Dahlem 396, 145.

Romani, A.M.; Fischer, H.; Mille-Lindblom, C. & Tranvik, L.J. 2006. Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. *Ecology* **87**: 2559-2569

Saha, S.; Walia, S.; Kumar, J. & Parmar, B. S. 2010. Structure-biological activity relationships in triterpenic saponins: the relative activity of protobassic acid and its derivatives against plant pathogenic fungi. *Pest Management Science* **66 (8)**: 825-831

Shimoyamada M.; Kudo S.; Okuba K.; Yamauchi F.; Harada K., 1990. Distributions of saponin constituents in some varieties of soybean plant. *Agricultural & Biological Chemistry* **54(1)**: 77-82

Späth, S. 2000. Versuche an Apfelsämlingen zur Regulierung von Apfelschorf *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderhold im Ökologischen Landbau. Diplomarbeit FH Nürtingen.

Szakiel, A.; Paczkowski, C. & Henry, M. 2011 a. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews* 10 (4): 471-495

Szakiel, A.; Paczkowski, C. & Henry, M. 2011 b. Influence of environmental biotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews* 10 (4): 493-502

## 10. Veröffentlichungen und Aktivitäten zur Verbreitung der Ergebnisse

### Vorträge

- „Erforschung und Entwicklung alternativer Mittelzubereitungen für die Apfelschorfbekämpfung im Falllaub“. 15.06.11. Tagung der Fachreferenten für Obstbau, Jork
- „Kurzvorstellung des Projektes zur Förderung des Falllaub-Abbaus und zur Reduzierung des Askosporenpotentials– Ergebnisse zum Falllaubabbau am Standort Weinsberg“. 15.06.11 Tagung der Fachreferenten für Obstbau, Jork
- „Askosporenpotential und Schorfprognose im Öko-Obstbau“. November 2011 Fachgespräch Krankheitsprognose am JKI Dossenheim
- „Erforschung und Entwicklung alternativer Mittelzubereitungen für die Apfelschorfbekämpfung im Falllaub“, 01.12.11 Fachgespräch „Kupfer im Pflanzenschutz“, Julius-Kühn-Institut, Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin-Dahlem
- „Schorf: Vorstellung der begonnenen Forschungsprojekte zu Falllaub-Hygienemaßnahmen“. 27. und 28.- Januar 2012, Ökologische Obstbau-Tagung Jork
- „Apfelschorfbekämpfung im Falllaub-Erste Ergebnisse“, 02.05.12, Kolloquium, Julius-Kühn-Institut, Institut für Obst- und Weinbau, Schwabenheimer-Str. 101, 69221 Dossenheim
- Neue Strategien zur Apfelschorfbekämpfung im Falllaub - eine Übersicht über aktuelle Forschungsergebnisse, Pflanzenschutztagung 2012, Braunschweig
- „Entwicklung alternativer Pflanzenschutzmittel für die Apfelschorfbekämpfung im ökologischen Obstbau“, 18.06.12, Vortrag an der TU München, Lehrstuhl für Obstbau
- Tag der Offenen Tür auf dem Obstversuchsgut Heuchlingen, 02.09.2012, Informationsstand zum Falllaubprojekt (ca. 2500 Besucher)
- „Erforschung des Wirkungsspektrums alternativer Rezepturen für die Apfelschorfbekämpfung über Behandlungen des Falllaubes“, Teilvortrag im Obstbau-Block. 07. Dezember 2012, Fachgespräch „Kupfer im Pflanzenschutz“, Julius-Kühn-Institut, Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin-Dahlem
- „Ergebnisse aus den Falllaubversuchen am Standort Weinsberg“. 25.und 26.Januar 2013, Ökologische Obstbau-Tagung Weinsberg, Außerdem Demonstrationsstand zur Aktivität der Regenwürmer
- Saponine und ihr Einsatz zur Bekämpfung des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis*, 24.4.13 Kolloquium, Julius-Kühn-Institut, Institut für Obst- und Weinbau, Schwabenheimer-Str. 101, 69221 Dossenheim
- „Ergebnisse zur Bekämpfung des Apfelschorfs im Falllaub“, 12.06.13, Tagung der Fachreferenten für Obstbau, Bad Kreuznach

- „Abschließende Ergebnisse alternativer Maßnahmen und Verfahren zur Apfelschorfbekämpfung“, 05.12.13, Fachgespräch „Kupfer im Pflanzenschutz“, Julius-Kühn-Institut, Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin-Dahlem

Weitere geplante Vorträge:

Ökologische -Obstbau-Tagung Ahrweiler, 30. Januar – 01. Februar 2014. Zusammenfassender Vortrag über die Versuchsergebnisse aus dem Falllaubprojekt am Standort Weinsberg

44. Weinsberger Obstbautag, 11. Februar 2014, Vortrag zum Schwerpunkt Apfelschorf – Kurzfristige Maßnahmen zur Förderung des Falllaub-Abbaus im Obstbaubetrieb (vor dem Hintergrund des Resistenzdurchbruchs).

Poster

- Rüdiger, F., Nietsch, N., Pfeiffer, B. & Kollar, A.: (2012): Efficacy of alternative substances to control apple scab by leaf litter treatment, Eco-Fruit: 15<sup>th</sup> international conference on organic fruit growing from February 20<sup>th</sup> to February 22<sup>th</sup> 2012 at the University of Hohenheim, Germany (ed. By Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau e.V. Weinsberg)
- Porsche, F.M. & Kollar, A. (2013): Saponins from *Sapindus mukorossi*: Extraction, purification and biological activity against apple scab. Nachwuchswissenschaftlerforum 2013, Quedlinburg
- Bermig, S., Pfeiffer, B., Nietsch, N., Porsche, F., Kollar, A. (2013): „Wie kann die Attraktivität von schorfbefallenem Falllaub für Regenwürmer erhöht werden, um eine erfolgreiche Kupferminimierung zu ergänzen?“ 05.12.13, Fachgespräch „Kupfer im Pflanzenschutz“, Julius-Kühn-Institut, Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin-Dahlem

Paper

- Rüdiger, F., Nietsch, N., Kollar, A. & Pfeiffer, B. (2012): Efficacy of alternative substances to control apple scab by leaf litter treatment. In Eco-Fruit: Proceedings of the 15<sup>th</sup> international conference on organic fruit growing from February 20<sup>th</sup> to February 22<sup>th</sup>, 2012 at the University of Hohenheim, Germany (ed. By Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau e.V. Weinsberg: Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau, 239-244)
- Rüdiger, F., Nietsch, N., Pfeiffer, B. & Kollar, A.: (2012): Erforschung und Entwicklung alternativer Mittelzubereitungen für die Apfelschorfbekämpfung im Falllaub, Beitrag zum Fachgespräch „Kupfer im Pflanzenschutz“, 01.12.11, Julius-Kühn-Institut, Königin-Luise-Straße 19, 14195 Berlin-Dahlem; Berichtsheft Julius Kühn-Institut
- Rüdiger, F., Kollar, A. (2012): Neue Strategien zur Apfelschorfbekämpfung – eine Übersicht der aktuellen Forschungsergebnisse. Julius-Kühn-Archiv 438: 170

- Porsche, F.M. und Kollar, A. (2013): Saponins from *Sapindus mukorossi*: Extraction, purification and biological activity against apple scab. Sechstes Nachwuchswissenschaftlerforum 2013, Berichtsheft Julius Kühn-Institut 171: 42

In den Jahresberichten der LVWO Weinsberg wurde regelmäßig kurz über die aktuellen Ergebnisse aus dem Falllaubprojekt berichtet, außerdem fließen die Erkenntnisse in die Unterrichtsinhalte im Fach Ökologischer Obstbau bei der Obstbau-Meister-Klassen ein, in denen Schüler aus dem gesamten Bundesgebiet vertreten sind. Aktuelle Ergebnisse zum Askosporenpotential wurden während der Primärsaison des Apfelschorfes zeitnah dem Beratungsdienst für ökologischen Obstbau für den Pflanzenschutzempfehlungen zur Verfügung gestellt.

## Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserum Albumin
BSB	biologischer Sauerstoffbedarf
CFU	colony forming unit
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
FISH	fluoreszente In-situ-Hybridisierung
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
ITS rDNA	internal transcribed spacer rDNA
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption/ionisation and time of flight
PDA	potato dextrose agar
PDB	potato dextrose broth
TSA	tryptic soy agar
TSB	tryptic soy broth
Vit.-Mix	Vitamin-Mix
n.d.	nicht detektiert