

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

Franziska Rüdiger<sup>1</sup>, Naomi Nietsch<sup>2</sup>, Barbara Pfeiffer<sup>2</sup>, Andreas Kollar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim

<sup>2</sup>Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau, Traubenplatz 5, 74189 Weinsberg

### **Einleitung**

Die Bekämpfung des Apfelschorfes im ökologischen Obstbau ist die kosten- und zeitaufwendigste Pflanzenschutzmaßnahme. Kupferpräparate wirken innerhalb der für den ökologischen Anbau zugelassenen Mittel vergleichsweise gut und sind derzeit nicht zu ersetzen. Vor dem Hintergrund des geplanten EU-weiten Verbots von Kupfer als Pflanzenschutzmittel (ab 2016) ist jedoch die Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel anzustreben. Ziel des Projektes ist es, Verfahren die zur Abtötung bzw. Schwächung der Überdauerungsorgane im Falllaub führen zu entwickeln, um somit den Infektionsdruck im Frühjahr zu verringern. Die auf diese Weise abgeschwächte Wirkung der Primärinfektionen soll den Bedarf an fungiziden Maßnahmen reduzieren und/oder die Effizienz bisher unzureichender Fungizide aus dem Bereich des ökologischen Pflanzenschutzes verstärken.

Die Reduktion des Sporenpotentials im Frühjahr, sollte durch eine Behandlung des Falllaubs mit unterschiedlichen Medien und Pflanzenextrakten erreicht werden. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Strategien in der Schorfbekämpfung verfolgt. Zum einen wurden fungizid wirkende Pflanzenextrakte eingesetzt, die eine direkte Wirkung auf die Fruchtkörperbildung haben. Zum anderen wurden verschiedene Nährmedien verwendet, die das Wachstum von „antagonistischen Mikroben“ fördern sollten und somit indirekt (Nahrungskonkurrenz, Blätterersetzung etc.) die Fruchtkörperreife hemmen.

### **Material und Methoden**

#### **Falllaubbehandlungen in Dossenheim 2010/11**

Im Herbst 2010, wurden mit beginnendem Laubfall (1.11.10) jeweils 80g stark schorfbefallene Blätter in 20 Plastikschaalen eingewogen. Die Schalen waren mit Drainagelöchern versehen, um das Abfließen von Regenwasser zu ermöglichen und mit einem Drahtgitter abgedeckt. Sie wurden im Freiland auf einem Sarannetz exponiert, um Regenwürmer fernzuhalten und an vier Terminen (11.1; 27.1; 16.2; 7.3.11) mit den jeweiligen Nährlösungen und Medien behandelt (Tab. 1). Die Medien und Pflanzenextrakte wurden in den entsprechenden Konzentrationen angesetzt und mit einer Handsprühflasche bis zum ersten Ablauf an der Blattoberfläche aufgebracht.

**Tab.1:** Medien und Pflanzenextrakte, sowie angewendete Konzentrationen für die Falllaubbehandlungen 2010/11 in Dossenheim

<b>Dossenheim</b>	<b>Konzentration</b>
Unbehandelte Kontrolle (Wasser)	-
TSB	9%
TSB 80% Ethanolextrakt	9%
TSB 80% Ethanolpräzipitat	9%
TSB 9% hitzebehandelt	9%
Hefeextrakt „Leiber“	1,1%
Hefeextrakt „Leiber“ 80% Ethanolextrakt	1,1%
Hefeextrakt „Leiber“ 80% Ethanolpräzipitat	1,1%
Hefeextrakt „Leiber“ hitzebehandelt	1,1%
Yuccasaponin 1,5%	1,5% (vol%)
Primelwurzel	10% Tee, davon 6% vol (kalt ansetzen, aufkochen, 10 min ziehen lassen)
Saponariawurzel	10% Tee, davon 6% vol
Quillajarinde	10% Tee, davon 6% vol
TSForte	1,5ml TSForte + 150ml Wasser
Palmarosa	150ml Wasser + 150µl Palmarosa + TSForte 1,5ml
Pepton Casein	6%
Pepton Soja	6%
Casaminoacids	6%
TSB	4,5%
Unbehandelte Kontrolle (Wasser)	-

Mit Beginn der Schorfprimärsaison 2011 wurden wöchentlich Blattproben entnommen (23.3-14.6.11), um das Ascosporenpotential mit der Wasserbadmethode (KOLLAR, A. 2000) zu bestimmen. Dabei wurde je ein Gram Blattaliquot in 50 ml destilliertes Wasser eingewogen und für 1h bei 100 U/min auf einem Horizontalschüttler geschwenkt. Die Sporensuspension wurde anschließend durch Miracloth gefiltert und in eine Kolkwitz Zählkammer gegeben. Nach kurzem Absetzen der Sporenlösung, konnte das Ascosporenpotential mikroskopisch bestimmt werden. Die Auszählung der Ascosporen erfolgte über einen Zeitraum von 13 Wochen (23.3.11-14.6.12). Zusätzlich wurde der optische Eindruck von den Blättern (Zersetzungsgrad, Ablösung der Epidermis usw.) ermittelt und dokumentiert.

### **Bestimmung der mikrobiellen Aktivität**

Um zu überprüfen, ob die Medien bzw. Pflanzenextrakte das Wachstum von Mikroben und damit die mikrobielle Konkurrenz (natürlicher Antagonismus, Laubzersetzung) fördern, wurde die mikrobielle Aktivität im Falllaub bestimmt.

Die Quantifizierung der Bakterien in den behandelten und überwinterten Blättern erfolgte mit 1g Blattmaterial (7.3.11) aus dem jeweiligen Depot. Die Blätter wurden über Nacht getrocknet und bis zur Aufarbeitung bei -20°C eingefroren. Das abgewogene Blattmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff zermörsert 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  $\mu$ l der entsprechenden Verdünnung wurden auf Tryptic Soy Agar (TSA) ausplattiert. Dem Agar wurde Cycloheximid (0,4  $\mu$ g) zugesetzt, um das Wachstum von Pilzen zu unterdrücken. Nach einer dreitägigen Inkubationszeit bei 20°C konnten dann die Kolonien auf den Platten ausgezählt werden.

## Ergebnisse

### Ascosporenpotential 2011

Für die mit Pepton Casein 6% und TSB 9% hitzebehandelten Blätter konnte die stärkste Reduktion des Ascosporenpotentials gegenüber der Kontrolle verzeichnet werden (Abb.1). Der Wirkungsgrad lag für beide Medien bei 98%. Die anderen TSB Medien konnten das Ascosporenpotential ebenfalls wirksam senken, so konnte für TSB 9% eine Reduktion um 97% verzeichnet werden. Niedrige TSB Konzentration (4,5%) zeigten dabei einen geringeren Effekt. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass niedermolekulare Bestandteile des TSB, wie z.B. Peptide, wirksamer waren als hochmolekulare, da der Wirkungsgrad von TSB 80% Ethanolextrakt bei 85% lag, der von TSB 80% Ethanolpräzipitat dagegen nur bei 71%. Die Annahme, dass Präparate mit hohem Peptidanteil, das Ascosporenpotential effektiv herabsetzen können, wird auch durch die Ergebnisse der Pepton Soja 6% und der Casaminoacid 6% Behandlungen gestützt (siehe Abb.1).

Bei den Saponinbehandlungen zeigten nur der aus *Saponaria officinalis* gewonnene Tee, sowie das Yuccasaponin eine Wirkung. Das Ascosporenpotential konnte gegenüber den Kontrollbehandlungen um 42 bzw. 34% herabgesetzt werden. Bei den Behandlungen mit *Quillaja officinalis* und *Primula veris* konnte keine wirkungsvolle Reduktion des Sporenpotentials festgestellt werden. Auch die Hefepräparate, sowie Palmarosa und TS Forte konnten das Ascosporenpotential nicht signifikant herabsetzen.

Zusätzlich zum Ascosporenpotential wurde der optische Eindruck von den Blättern ermittelt und dokumentiert. Im Vergleich zu den Kontrollblättern (Abb.2) konnte bei den mit TSB, Pepton Casein (Abb.3), Pepton Soja und den mit Casaminoacids behandelten Blättern ein höherer Zersetzungsgrad festgestellt werden. Zudem konnten Strukturveränderungen, wie z.B. Ablösungen an der Epidermis beobachtet werden. Der sichtbare Blattabbau setzte bereits Mitte März ein und entwickelte sich bis zur letzten Probenahme Mitte Juni weiter fort.

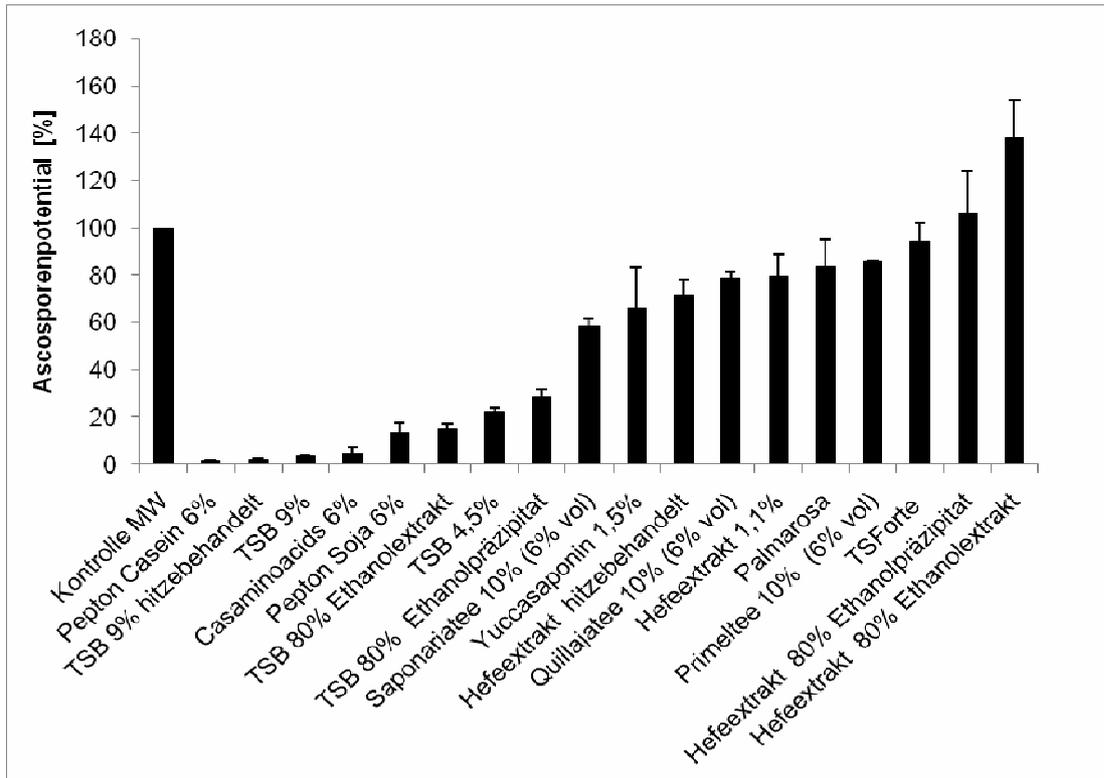


Abb. 1: Kumulatives Ascosporenpotential [%] 2011



Abb. 2: unbehandelte Blätter (Kontrolle)



Abb. 3: Pepton Casein 6% behandeltes Falllaub

### Koloniebildende Einheiten (CFU's)

Auf den unbehandelten Blättern (Kontrolle) konnte eine natürliche Populationsdichte von  $4,2 \cdot 10^{-7}$  CFU's nachgewiesen werden (Abb. 4). Im Vergleich dazu, wurde bei den mit TSB 9% behandelten Blättern eine deutlich höhere mikrobielle Besiedlung von  $2,42 \cdot 10^{-10}$  CFU's festgestellt. Auch die anderen Nährlösungen, wie die Pepton Casein, die Casaminoacid Behandlung, sowie die weiteren TSB Varianten, führten zu einer deutlichen Förderung der mikrobiellen Besiedlung gegenüber der Kontrolle. Bei den mit „Leiber“ Hefe behandelten Blättern konnten, im Vergleich zur Kontrolle, etwa doppelt soviel CFU's nachgewiesen werden. Die anderen Hefevarianten, sowie der Quillajatee, Palmarosa und Pepton Soja 6% hatten keinen Einfluss auf die

mikrobielle Besiedlung des Falllaubs. Die Populationsdichte entsprach annähernd der auf den Kontrollblättern. Eine hemmende Wirkung trat hingegen bei den Saponinbehandlungen mit Yucca, Saponariatee, Primeltee sowie bei den mit TS-Forte behandelten Blättern auf. Die Populationsdichte lag im Bereich im Bereich von  $10^{-6}$  CFU's.

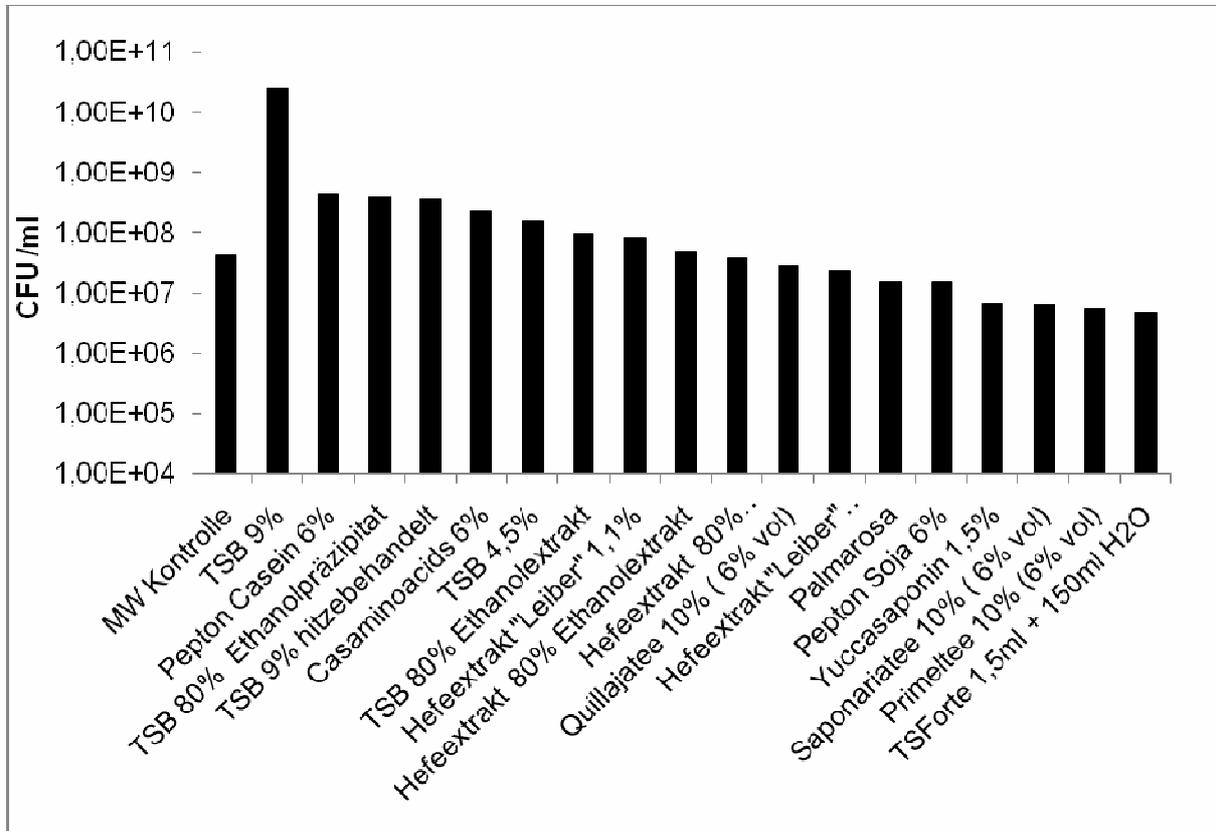


Abb. 4: Anzahl der colony forming Units/ml (CFU's) auf den mit Nährlösungen und Pflanzenextrakten behandelten Blätter

## Diskussion

Trotz der späten Behandlung und dem frühen Beginn der Schorfprimärsaison konnte mit einigen Medien eine wirkungsvolle Reduktion des kumulativen Ascosporenpotentials erreicht werden. Die effektivsten Nährlösungen waren dabei Pepton Casein 6%, sowie TSB 9%, die das Sporenpotential um 98% reduzierten. Da eine Korrelation zwischen dem verminderten Ascosporenpotential und dem Zersetzungsgrad der Blätter bestand ist davon auszugehen, dass dieser Effekt durch die Förderung von mikrobiellen Antagonisten zustande kam, die eine schnellere Blattzersetzung gewährleisten und zu einer effizienten Bekämpfung der sexuellen Vorgänge, Fruchtkörperbildung und/oder Sporenausschleuderung führen. Die wichtigsten Wirkbestandteile sind dabei vermutlich Peptide, die das Wachstum der Mikroben fördern. Unterstützt wird diese Hypothese auch durch die Bestimmung der CFU's. Sowohl für Pepton Casein 6%, als auch für TSB 9% konnte eine mikrobielle Förderung nachgewiesen werden. Für die Behandlung des Falllaubs mit Saponinen konnte ebenfalls eine Hemmung der Fruchtkörperbildung nachgewiesen werden. Das kumulative Ascosporenpotential konnte um bis zu 42% reduziert werden. Ferner führten die Behandlungen zu einer Hemmung des mikrobiellen Wachstums (CFU's), was vermutlich auf die membranolytischen Eigenschaften der Saponine zurückzuführen ist. Dementsprechend konnte im Vergleich mit den Kontrollblättern auch keine schnellere Blattzersetzung beobachtet werden.

Im weiteren Verlauf des Projektes sollen die Extraktionsverfahren für die Pflanzenextrakte und Nährlösungen optimiert werden. Zusätzlich sollen die Wirkbestandteile des Soja-mediums bestimmt werden, die das Wachstum der „antagonistischen Mikroben“ bewirken. Dies erfordert biochemische Analysen, um entsprechende Konzepte und Strategien im Sinne einer Weiterentwicklung des Mediums zu entwickeln, die den Anforderungen des ökologischen Anbaus entsprechen.

### **Literatur**

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