

*Franziska M. Porsche*  
*Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau*

Erforschung und Entwicklung  
alternativer  
Mittelzubereitungen für die  
Apfelschorfbekämpfung  
im Falllaub



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt/Contact:  
Franziska Porsche  
Julius Kühn-Institut  
Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen  
Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau  
Schwabenheimer Str. 101  
69221 Dossenheim  
Germany

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind

The publication series „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ publishes doctoral dissertations originating from research doctorates completed at the Julius Kühn-Institut (JKI) either in close collaboration with universities or as an outstanding independent work in the JKI research fields.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot [www.jki.bund.de](http://www.jki.bund.de) Bereich Veröffentlichungen.

The monographs are distributed through the book trade (listed in German Books in Print - VLB) and OPEN ACCESS through the JKI website [www.jki.bund.de](http://www.jki.bund.de) (see Publications)

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.  
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.  
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:  
<http://www.jki.bund.de> Bereich Veröffentlichungen

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.jki.bund.de> (see Publications).

#### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation  
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische  
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

#### **Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek (German National Library)**

The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.dnb.de>.

ISBN 978-3-95547-024-1  
DOI 10.5073/dissjki.2015.007

#### **Herausgeber / Editor**

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland  
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2015.  
Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.



Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt

Fachgebiet Obstbau

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

Franziska M. Porsche

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. H. Bernhardt

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. Dr. h.c. D. Treutter (schriftl. Beurteilung)  
Univ.- Prof. Dr. R. Hückelhoven (mündliche Prüfung)  
2. apl. Prof. Dr. M. Fischer (Universität Regensburg)  
3. Priv.- Doz. Dr. J. Gross (Universität Ulm)

Die Dissertation wurde am 17.11.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.05.2015 angenommen.

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an  
interessant zu werden, wo sie aufhört.

Justus von Liebig

Teile der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht und auf nationalen und internationalen Fachkongressen präsentiert.

### Eigene Publikationen

Porsche, F.M.; Pfeiffer, B.; Fischer, M. & Kollar, A. 2014. A new phytosanitary method to reduce the ascospore potential of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease*. in preparation

Porsche, F.M. & Kollar, A. 2014. Das fungizide Potenzial von Saponinen gegen den Apfelschorferreger *V. inaequalis*. 59. Deutsche Pflanzenschutztagung, 23. - 26. September, Freiburg, *Julius-Kühn-Archiv* **447**: 263

Porsche, F.M. & Kollar, A. 2013. Saponins from *Sapindus mukorossi*: Extraction, purification and biological activity against apple scab. 6. Nachwuchswissenschaftlerforum 2013, *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut* **171**: 42

Porsche, F.M. & Kollar, A. 2013. Abschließende Ergebnisse alternativer Maßnahmen und Verfahren zur Apfelschorfbekämpfung. *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut*, im Druck

Rüdiger, F.M. & Kollar, A. 2012. Neue Strategien zur Apfelschorfbekämpfung im Falllaub - eine Übersicht der aktuellen Forschungsergebnisse. 58. Deutsche Pflanzenschutztagung, 10. - 14. September, Braunschweig, *Julius-Kühn-Archiv* **438**: 170

Rüdiger, F.M.; Nietsch, N.; Pfeiffer, B. & Kollar, A. 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, **pp.** 239-244

Rüdiger, F.M.; Nietsch, N.; Pfeiffer, B. & Kollar, A. 2012. Erforschung und Entwicklung alternativer Mittelzubereitungen für die Apfelschorfbekämpfung im Falllaub. *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut* **164**: 73-78

### Poster

Porsche, F.M.; Bermig, S.; Pfeiffer, B.; Nietsch, N. & Kollar, A. 2013. Wie kann die Attraktivität von schorfbefallenem Falllaub für Regenwürmer erhöht werden, um eine erfolgreiche Kupferminimierung zu ergänzen? 5. Dezember 2013, Fachgespräch Kupfer als Pflanzenschutzmittel, Berlin-Dahlem

Porsche, F.M. & Kollar, A. 2013. Saponins from *Sapindus mukorossi*: Extraction, purification and biological activity against apple scab. 6. Nachwuchswissenschaftlerforum, 27. - 29. November, Quedlinburg

Rüdiger, F.M.; 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

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	6
<b>Summary</b> .....	7
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	8
<b>1. Einleitung</b> .....	10
1.1. <i>Venturia inaequalis</i> .....	10
1.1.1. Vorkommen und Bedeutung .....	10
1.1.2. Biologie und Epidemiologie .....	10
1.1.3. Initiation und Reifung der Pseudothecien .....	12
1.1.4. Sporenausschleuderung und Infektion .....	14
1.2. Strategien zur Bekämpfung .....	14
1.2.1. Bekämpfung in der Vegetationsperiode .....	14
1.2.1.1. Resistente Sorten .....	14
1.2.1.2. Prognose .....	15
1.2.1.3. Fungizide .....	15
1.2.1.4. Biologische Verfahren .....	16
1.2.2. Bekämpfung der Überwinterungsform .....	17
1.2.2.1. Phytosanitäre Maßnahmen mit direkter Wirkung .....	17
1.2.2.2. Phytosanitäre Maßnahmen mit indirekter Wirkung .....	18
1.3. Der Prozess der Falllaubzersetzung beim Apfel .....	20
1.4. Saponine .....	22
1.4.1 Vorkommen, Eigenschaften und chemische Struktur .....	22
1.4.2. Extraktion und Aufreinigung .....	23
1.5. Ziele .....	25
<b>2. Material und Methoden</b> .....	26
2.1. Falllaubbehandlungen .....	26
2.1.1. Versuchsaufbau, Applikation und Präparate .....	26
2.1.2. Herstellung der Nährstoff- und Vitaminpräparate .....	28
2.1.3. Pflanzenextrakte .....	29
2.1.3.1. Tees und käufliche Saponinpräparate .....	29
2.1.3.2. Herstellung der Saponinextrakte .....	29
2.1.4. Applikation potenzieller Antagonisten .....	30
2.2. Bestimmung des Ascosporenpotenzials und makroskopischer Zustand der Blätter .....	31

2.3. Medien und Kulturverfahren .....	32
2.3.1. Kultivierung der Mikroben auf Agar .....	32
2.3.2. Kultivierung der Mikroben in Flüssigkultur .....	32
2.3.3. <i>V. inaequalis</i> -Isolat .....	33
2.4. Bestimmung der mikrobiellen Aktivität .....	33
2.4.1. Colony forming units (CFUs) .....	33
2.4.2. Biologischer Sauerstoffbedarf (BSB) .....	33
2.5. Isolierung von Mikroorganismen .....	34
2.5.1. Bakterien und Hefen .....	34
2.5.2. Fadenpilze .....	34
2.5.3. Stammkonservierung .....	35
2.6. Identifizierung der Pilz- und Bakterienisolate .....	35
2.6.1. MALDI-TOF .....	35
2.6.1.1. Zellaufschluss bei Bakterien und Hefen .....	36
2.6.1.2. Zellaufschluss bei Fadenpilzen .....	36
2.6.1.3. Messung der Proteinmassenspektren .....	37
2.6.1.4. Auswertung der Proteinmassenspektren mit der Bruker Software ..	37
2.6.2. Sequenzierung der ITS rDNA .....	38
2.6.2.1. Puffer und Lösungen .....	38
2.6.2.2. DNA Extraktion mit Xanthogenat .....	38
2.6.2.3. Nachweis der DNA-Extraktion durch Gelelektrophorese .....	39
2.6.2.4. Amplifikation der ITS rDNA .....	39
2.6.2.5. Aufreinigung und Sequenzierung des ITS-Amplifikates .....	40
2.7. Fungizides Potenzial der Bakterien- und Pilzisolat .....	40
2.7.1. Dualkultur-Testsystem auf Agar .....	40
2.7.2. Hemmtests mit Kulturfiltraten potenzieller Antagonisten .....	41
2.7.3. Hemmtest auf volatile Substanzen .....	41
2.7.4. Pilzlicher Antagonist <i>Leptosphaeria</i> sp. ....	42
2.7.5. Fungizide Wirkung von Vitaminen .....	43
2.8. Analyse der Nährstoffpräparate .....	43
2.8.1. Saccharide, Zuckeralkohole und Aminosäuren .....	43
2.8.1.1. HPLC-Analyse .....	43
2.8.1.2. Identifikation und quantitative Bestimmung der Analyte .....	43
2.8.1.3. Saccharide und Zuckeralkohole .....	44

2.8.1.4. Aminosäuren.....	44
2.8.1.5. TLC-Bestimmung von Dipeptiden und Aminosäuren .....	45
2.8.2. Proteine und Peptide.....	46
2.8.2.1. Quantifizierung von Proteinen mit dem Bradford-Test .....	46
2.8.2.2. Quantifizierung niedermolekularer Peptide nach Biuret .....	47
2.8.2.3. Ermittlung der Größenklassenverteilung mittels Gelfiltration.....	47
2.9. Saponine .....	48
2.9.1. Saponinextraktion .....	48
2.9.2. Nachweis membranolytischer Aktivität mit dem Hämolyse-Cuptest.....	49
2.9.3. Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln .....	50
2.9.4. Bestimmung der fungiziden Wirkung von Saponinextrakten .....	51
2.9.4.1. Konidienkeimtest.....	51
2.9.4.2. Wachstumshemmtest.....	52
2.9.4.3. Revival-Test .....	52
2.9.4.4. Hemmtest in Flüssigkultur.....	52
2.9.4.5. Bekämpfungsversuche im Gewächshaus .....	53
2.9.4.6. Bekämpfungsversuche mit Fangpflanzen im Freiland .....	54
2.9.5. Aufreinigung und Anreicherung von Saponinen .....	55
2.9.5.1. Festphasenextraktion.....	55
2.9.5.2. Säulenchromatographie .....	56
2.9.5.2.1. Affinitätschromatographie .....	56
2.9.5.2.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) .....	57
2.9.6. Analyse und Charakterisierung von Saponinextrakten.....	58
2.9.6.1. TLC .....	58
2.9.6.2. HPLC .....	60
2.9.7. Analyse und Charakterisierung der HPLC-Fractionen .....	60
2.9.7.1. Test auf Schaumbildung und Hämolyse-Cuptest.....	61
2.9.7.2. Konidienkeimtest.....	61
2.9.7.3. Agar-Diffusionstest.....	61
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
3.1. Ascosporenpotenzial der Falllaubdepots 2011-2014.....	62
3.2. Makroskopischer Zustand der Falllaubdepots 2011-2014 .....	66
3.3. Einfluss der Falllaubbehandlung auf die Mikroorganismen .....	69
3.3.1. Koloniebildende Einheiten.....	69

3.3.2. Biologischer Sauerstoffbedarf .....	72
3.4. Charakterisierung der mikrobiellen Falllaubbesiedler .....	76
3.5. Analyse des hemmenden Potenzials von Antagonisten .....	81
3.5.1. Dualkultur-Test.....	81
3.5.2. Hemmung in Flüssigkultur .....	83
3.5.3. Hemmttest volatile Substanzen .....	83
3.5.4. Pilzlicher Antagonist <i>Leptosphaeria</i> sp.....	83
3.5.5. Vitamine .....	85
3.6. Analyse der Nährmedienwirkstoffe .....	86
3.6.1. Saccharide und Zuckeralkohole .....	86
3.6.2. Aminosäuren .....	88
3.6.3. Peptide .....	91
3.6.4. Charakterisierung der Präparatzusammensetzung .....	94
3.7. Saponine .....	95
3.7.1. Biochemische Analysen .....	95
3.7.1.1. Spezifische und absolute Hämolyseaktivität von Saponinextrakten .....	95
3.7.1.2. Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln .....	95
3.7.2. Fungizide Wirkung von Saponinextrakten .....	96
3.7.2.1. Wirkung auf die Konidienkeimung und das Mycelwachstum von <i>V. inaequalis</i> .....	96
3.7.2.2. Protektive und kurative Wirkung bei Infektionsversuchen .....	99
3.7.2.3. Protektive Wirkung im Freiland .....	101
3.7.3. Aufreinigung von Saponinextrakten .....	102
3.7.3.1. Festphasenextraktion.....	102
3.7.3.2. Affinitätschromatographie .....	107
3.7.3.3. HIC.....	108
3.7.4. Auftrennung und Analyse von Saponinextrakten .....	110
3.7.4.1. TLC .....	110
3.7.4.2. HPLC .....	112
3.7.5. Charakterisierung von Saponinfraktionen .....	116
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>118</b>
4.1. Wirkung der Falllaubbehandlungen auf das Ascosporenpotenzial .....	118
4.2. Charakterisierung der mikrobiellen Aktivität auf dem Falllaub und dem Blattabbau durch Regenwürmer.....	123

---

4.3. Analyse der Epiphytengemeinschaft .....	127
4.4. Identifizierung potenzieller Antagonisten .....	132
4.5. Präparatanalyse .....	136
4.6. Bewertung der Extraktion und Löslichkeit von Saponinen mit dem Hämolyse-Cuptest.....	138
4.7. Charakterisierung des fungiziden Potenzials der Pflanzenextrakte .....	141
4.8. Analyse der aktiven Inhaltsstoffe von Saponinextrakten .....	144
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>148</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>166</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>175</b>

## Zusammenfassung

Das Ziel der Untersuchungen war, durch die Applikation von Nährmedien, potenziellen Antagonisten und/oder fungiziden Pflanzenextrakten (Saponine) nach dem Blattfall einen phytosanitären Effekt mit einer Entwicklungsstörung auf die Fruchtkörper von *V. inaequalis* zu erreichen. Die Auswirkungen der Behandlungen wurden durch das verbleibende Ascosporenpotenzial über die Primärsaison bewertet. Die Ursachen und Wirkungen der Präparate wurden mikrobiologisch und biochemisch analysiert. Eine Chloroform-Methanol-Extraktion wurde als alternative Methode zur Isolierung von Saponinen entwickelt. Die Pflanzenextrakte wurden mittels SPE-Kartuschen und erstmals durch Verwendung der Hydrophoben Interaktionschromatographie aufgereinigt. Es konnten nahezu alle unwirksamen Begleitsubstanzen abgetrennt werden. Die fungiziden Wirkstoffe wurden mit einem neu entwickelten Blutagar-Test, der die hämolytische Eigenschaft der Saponine nutzt, nachgewiesen und durch HPLC-Analysen charakterisiert. *In vitro* konnte für alle Saponinextrakte eine hemmende Wirkung auf die Keimung der Konidien und das Mycelwachstum des Erregers nachgewiesen werden. Die präventive Behandlung von Sämlingen in Gewächshausversuchen mit 1% Saponinextrakten von Waschnuss und Kastanie führte zu einer nahezu vollständigen Befallsreduktion. Eine „STOPP-Spritzung“ 6 h nach der erfolgten Inokulation bewirkte eine Verminderung der Schorfsymptome um mehr als 70% und eine Reduktion der Sporulation um 98-100%. Das Ascosporenpotenzial konnte durch Falllaubbehandlungen im Herbst/Winter um bis zu 90% reduziert werden. *In vitro* identifizierte Antagonisten, die in das Falllaub eingebracht wurden, konnten die Ascosporenmenge nicht vergleichbar reduzieren. In vier Versuchsjahren konnte standortunabhängig durch die Applikation von Nährmedien ein Wirkungsgrad von  $\geq 97\%$  zur Verminderung der Ascosporen-Freisetzung erreicht werden. Als besonders effektiv erwies sich ein konzentriertes LEIBER Hefeextrakt, welches die Ascosporenmenge nahezu vollständig reduzierte. Die mikrobiologischen Analysen des Falllaubes ergaben eine 10 bis 1.000-fache Erhöhung der Organismenzahl, einschließlich potenzieller Antagonisten. Die mikrobiologische Aktivität (biologischer Sauerstoffbedarf) war bis zu dreimal höher als in unbehandelten Blattdepots und hatte einen verstärkten und schnelleren Blattabbau zur Folge. Die bakteriellen und pilzlichen Falllaubbesiedler wurden von den Blättern isoliert und mit MALDI-TOF oder über die Sequenzierung ihrer ITS rDNA identifiziert. Pseudomonaden stellten mit 37-45% der Bakterienisolate die dominante Organismengruppe im Falllaub dar. *In vitro* wurde eine Hemmung des Mycelwachstums von *V. inaequalis* um 48-69% festgestellt. *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans* und *Epicoccum nigrum* waren mit einem Anteil von jeweils mehr als 10% die wichtigsten Vertreter der Pilze und hemmten das Wachstum *in vitro* um bis zu 57%. In der Mehrzahl der Proben war die Zusammensetzung der Mikroorganismen im Vergleich zu Kontrollblättern im Wesentlichen quantitativ verändert. Eine Verschiebung innerhalb der dominanten Spezies konnte nicht festgestellt werden. Als wirksame Stoffe konnten Peptide  $\leq 3$  kDa und Aminosäuren identifiziert werden. Die Behandlung des Falllaubes mit Nährmedien könnte als eine neue phytosanitäre Strategie in die obstbauliche Praxis integriert werden und zu einem Kupferersatz beitragen.

## Summary

The objective of the study was to achieve a phytosanitary effect on fruiting bodies of *V. inaequalis* in apple leaf litter by application of nutrient media, potential antagonists and/or fungicidal plant extracts (saponins). The effects of leaf litter treatments on the remaining ascospore potential were assessed in course of the primary season of the pathogen. The principles and mode of action of the applied substances were evaluated by microbiological and biochemical analyses. As an alternative method for the isolation of saponins from plant materials an extraction with chloroform and methanol was developed. The saponin extracts were cleaned with SPE cartridges and for the first time with Hydrophobic Interaction Chromatography. Nearly all ineffective substances could be removed from the extracts. The detection of membranolytic/hemolytic fractions was performed with an agar diffusion assay amended with sheep erythrocytes. Hemolytic fractions were further characterized by HPLC analyses. *In vitro* all plant extracts showed a fungicidal effect on conidia germination and mycelia growth of *V. inaequalis*. In seedling assays, a preventative treatment with soap nut and chestnut extract (1%) reduced apple scab symptoms nearly completely. A treatment 6 h after inoculation with conidia reduced scab symptoms by more than 70%. Pathogen sporulation on infected leaves was reduced by 98-100% in comparison to control groups. Ascospore potential could be reduced by leaf litter treatments by up to 90%. The application of *in vitro* identified antagonists on apple scab litter showed no effect on ascospore amount. Leaf litter treatments with nutrient media in autumn/winter revealed a reduction in the ascospore potential of more than 97% in four following apple scab seasons. The effect did not depend on geographical location of the orchard site. The best results could be achieved with a concentrated LEIBER yeast extract, which reduced the ascospore amount nearly completely. The microbiological analyses of leaf litter showed an increase of the number of organisms, including potential antagonists, from 10 up to 1.000 times. The microbiological activity (biological oxygen demand) was up to three times higher and leaf decay was enhanced compared to untreated litter. Bacterial and fungal leaf colonizers were isolated and identified with MALDI-TOF or sequencing of ITS rDNA. *Pseudomonas* proved to be the dominant bacterial species in apple leaf litter and contributed 37 to 45% of bacterial isolates. *In vitro* an inhibition of mycelia growth of *V. inaequalis* from 48 to 69% was observed. *Cladosporium cladosporioides*, *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum* reduced mycelial growth by up to 57%. Each one of these species represented more than 10% of the fungal isolates. In the majority of samples the microbial composition was changed mainly quantitatively and a shift within the dominant species was not detectable. Peptides  $\leq 3$  kDa and amino acids could be identified as the effective constituents of the media. Leaf litter treatments with nutrient media could be established as a new phytosanitary strategy in organic fruit production and contribute to a replacement of copper fungicides.

## Abkürzungsverzeichnis

Acyl-HSL	Acyl-Homoserin Lacton
AUFS	Absorbance Units Full Scale
BSA	Rinderserum Albumin
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf
C4	Butyl-modifizierte Kieselgelphase
C18	Octyl-modifizierte Kieselgelphase
C18	Octadecyl-modifizierte Kieselgelphase
C18 <sub>ec</sub>	Octadecyl-endcapped Kieselgelphase
CFU	Colony Forming Unit
CN	Cyanopropyl modifiziertes Kieselgel
DAPG	2,4-Diacetylphloroglucinol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
LC	Liquid Chromatography
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR-P	hochporöses Polystyrol-Divinylbezol-Copolymer
HR-X	sphärisches Polystyrol-Divinylbezol-Harz
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ITS	Internal Transcribed Spacer
MALDI-TOF	Matrix Assistend Laser-Desorption/Ionisation and Time of Flight
MS	Massenspektrometrie
MWCO	Molecular Weight Cut-Off
n.B.	nicht bestimmt
OD	Optische Dichte
PA	Polyamid
PCR	Polymerase Chain Reaction

---

PBS	Phosphate Buffered Saline
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
ppm	parts per million
rDNA	ribosomale DNA
Rf-Wert	Retentionsfaktor
RI	Refractive Index
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Solid Phase Extraction
TAE	Tris-Acetat-Elektrophoresepuffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Trockengewicht
TLC	Thin Layer Chromatography
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
U/g	Units/g
U/min	Umdrehungen/min
V1	<i>Venturia inaequalis</i> -Isolat
v/v	volume/volume
XS	Xanthogenat-Natriumdodecyl

## 1. Einleitung

### 1.1. *Venturia inaequalis*

#### 1.1.1. Vorkommen und Bedeutung

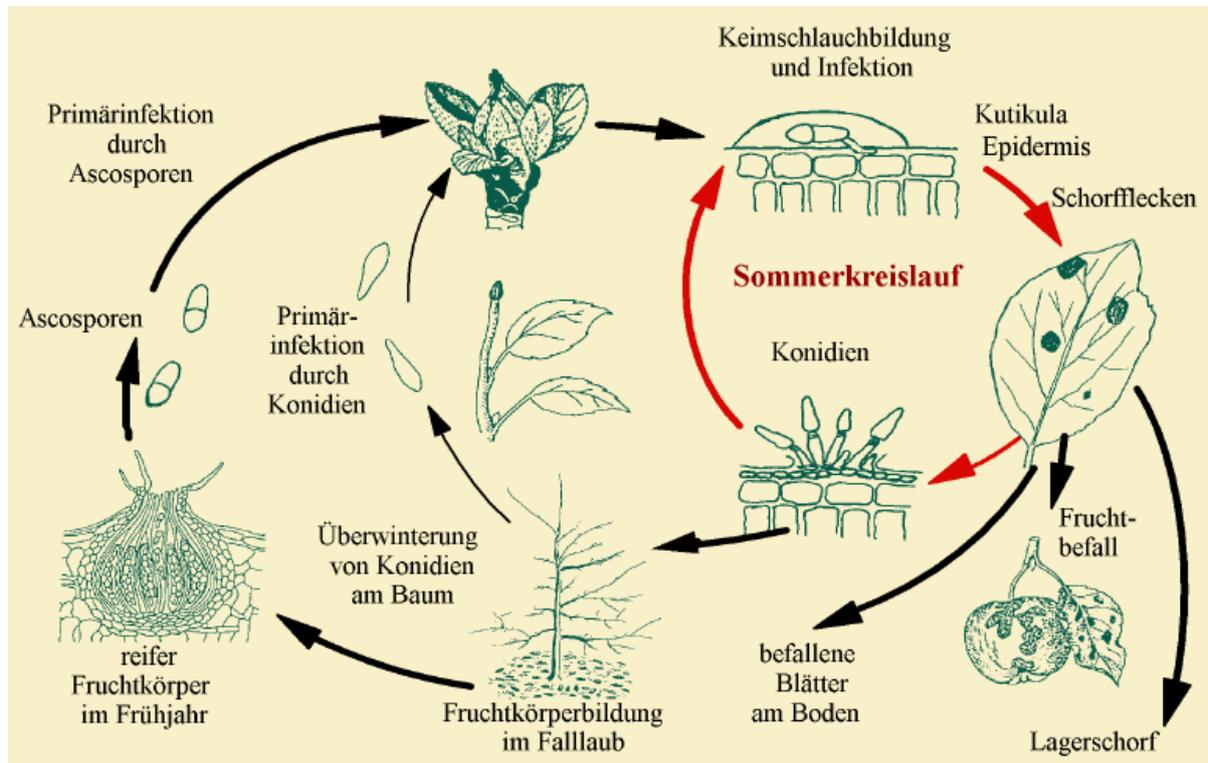
*V. inaequalis* (Cke.) Wint. (anamorph: *Spilocaea pomi* (Fries)), der Erreger des Apfelschorfs, ist ein Ascomycet, der weltweit überall vorkommt, wo Äpfel kommerziell angebaut werden (MacHardy et al., 2001). Er tritt besonders in Regionen mit einem kühlen und feuchten Frühjahr auf (MacHardy, 1996; Manktelow et al., 1996), ist aber auch in semiariden und ariden Gebieten verbreitet (Studt, 1975; Jones & Aldwinckle, 1990). Die Apfelschorfbekämpfung erfordert in Abhängigkeit von der Witterung und dem Infektionsdruck ca. 20-30 Behandlungen pro Saison (Oberhofer, 1985; Kollar, 1997; Roßberg, 2007). Der jährliche Kostenaufwand kann dabei 80% der gesamten Pflanzenschutzmaßnahmen im Obstbau betragen (Roßberg, 2007). Ohne den Einsatz von Fungiziden kann es vor allem bei der Tafelobsterzeugung zum vollständigen Verlust der Ernte kommen (Kollar, 1997). Damit stellt der Apfelschorf die wirtschaftlich bedeutendste Mykose im Erwerbsobstbau dar (Jones & Aldwinckle, 1990). Mögliche Folgen der Erkrankung sind eine Beeinträchtigung von Fruchtqualität und -quantität durch vorzeitigen Blatt- und Fruchtfall, Fruchtdeformationen und Lagerverluste. Der Befall kann sich indirekt auch auf den Ertrag des Folgejahres auswirken, da der Blütenansatz oft reduziert ist (Agrios, 1988).

#### 1.1.2. Biologie und Epidemiologie

*V. inaequalis* durchläuft eine parasitisch, biotrophe und eine saprophytische Phase (Abb. 1). Die sexuell saprophytische Phase beginnt mit dem Laubfall. Die Hyphen des Apfelschorfs dringen unter Zerstörung der Zellverbände ins tote Gewebe der Blätter ein und die Entwicklung der Pseudothecien wird initiiert (Wiesmann, 1932). Bis zum Frühjahr reifen die Ascosporen in den Fruchtkörpern heran, die bei Regenereignissen ausgeschleudert werden. An jungen Blättern und Blüten führen sie zu Primärinfektionen (Wallace, 1913; Frey & Keitt, 1925; Keitt & Jones, 1926). Eine weniger bedeutende primäre Infektionsquelle können am Baum sporolierende Mycelien sein, die auf verbleibenden Blättern und Knospenschuppen überwintert haben (Salmon & Ware, 1931; Kennel, 1987; Becker, 1990; Becker et al., 1992). In Anlagen mit hohem Vorjahresbefall tragen sie in geringem Umfang (~4%) zu Primärinfektionen bei (Holb et al., 2004).

Nach der erfolgten Infektion beginnt die parasitische, asexuelle Phase, in deren Verlauf sich ein primäres Stroma zwischen Cuticula und Epidermis entwickelt. Die subcuticulären Hyphen breiten sich auf den Epidermiszellen aus und es kommt zur Bildung von Konidophoren (Annelophoren), die durch Risse in der Cuticula über die Blattoberfläche ragen. Von diesen werden durch asexuelle Vermehrung einzellige Konidien abgeschnürt. Konidien (12-22 x 6-9 µm) sind oval bis lanzettförmige

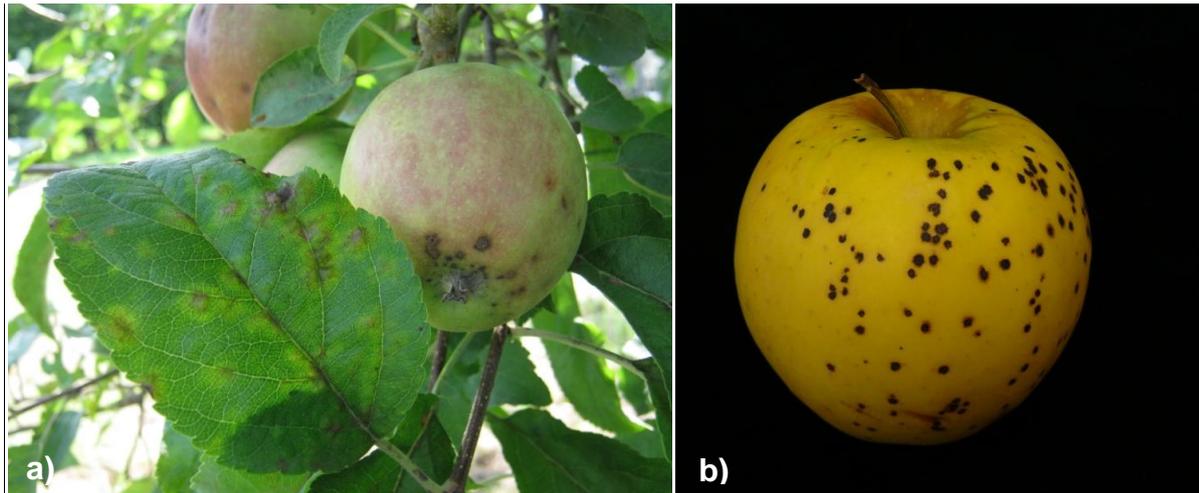
Sporen, die durch Spritzwasser und Wind auf andere Blätter getragen werden und dort zu Sekundärinfektionen führen (MacHardy et al., 2001; Bowen et al., 2011).



**Abb.1:** Entwicklungszyklus des Apfelschorferregers *V. inaequalis*, Bildquelle: Siegfried, W. 1997

Auf den infizierten Blättern bilden sich samtartig braun bis olivgrüne Flecken (Abb. 2 a), die sich beim „Nekrosetyp“ durch das Absterben der Gewebe braun färben können und oft nach oben wölben (Paul, 1981; Carisse & Dewdney, 2002). Bei einer „kompatiblen“ Infektion wird das Wirtsgewebe auch bei hoher Sporulation nicht bzw. kaum sichtbar verändert. Infiziert wird ausschließlich junges Gewebe, z.B. Blätter, die ihr Wachstum noch nicht abgeschlossen und daher keine Altersresistenz (ontogenetische Resistenz) entwickelt haben (Keitt & Jones, 1926; Biehn & Kuc, 1966; Schwabe, 1979; MacHardy & Jeger, 1983). Ältere Blätter können diese Resistenz verlieren und werden erneut anfällig für Infektionen (Kohl & Kollar, 1994; MacHardy, 1996; Kollar, 1996). Dadurch kommt es im Herbst häufig zu einem verstärkten Auftreten von neuen Schorfsymptomen.

Befallene Früchte weisen olivfarbene, später dunkelbraune und verkorkte Flecken auf (Abb. 2 a). Die nach außen fortschreitende Verkorkung führt bei einer Infektion in der frühen Wachstumsphase zu starken Missbildungen und ermöglicht durch das Aufplatzen der Flecken das Eindringen von Parasiten (Rudloff & Schmidt, 1935). Bei einer Infektion im späten Sommer oder frühen Herbst werden die Symptome erst während der Lagerung als „Lagerschorf“ sichtbar (Abb. 2 b). Dieser ist durch eingesunkene, schwarze und zirkuläre Läsionen gekennzeichnet und kann zu hohen Lagerverlusten führen (Jones & Aldwinckle, 1990).



**Abb. 2:** Blatt- und Fruchtschorfbefall an ‚Golden Delicious‘ (a) und Lagerschorfsymptome (b)

### 1.1.3. Initiation und Reifung der Pseudothecien

Die Initiation der Pseudothecienbildung erfolgt zwei bis drei Wochen nach dem Blattfall (MacHardy, 1996; Li & Xu, 2002). In den infizierten Blättern findet ein erneutes Wachstum der bipolaren „+ und –“ Mycelien statt (Müller & Löffler, 1992). Treffen zwei Hyphen vom unterschiedlichen Paarungstyp aufeinander, kommt es zur Bildung der Gametangien. Im Ascogonscheitel entwickelt sich ein wurmförmiger Fortsatz (Trichogyn), der sich an das benachbarte Antheridium anlegt. Über diese Verbindung können die Zellkerne aus dem Antheridium in das Ascogonium übertreten. Sie paaren sich mit den Zellkernen des Antheridiums und teilen sich mehrfach synchron (Dikaryophase). Diese frühe Entwicklungsphase kann als Initiation oder Anlage der Pseudothecienbildung betrachtet werden. Aus dem befruchteten Ascogonium wachsen ascogene Hyphen aus, in die jeweils zwei Zellkerne pro Zelle einwandern. Das Geflecht aus fertilen (ascogenen) und sterilen Hyphen bildet sich zu makroskopisch sichtbaren, dunkelbraun bis schwarz gefärbten, kugelförmigen (Durchmesser: 90-150  $\mu\text{m}$ ) Fruchtkörpern aus (Jones & Aldwinckle, 1990). Je nach Witterungsverlauf können die ersten Pseudothecien bereits Ende Dezember oder verzögert bis in den März hinein vollständig entwickelt sein.

Die Reifung der Asci beginnt damit, dass sich am Pseudotheciumboden, am Seitenzweig einer ascogenen Hyphe, ein U-förmiger Haken ausbildet. Die subterminale Zelle des Hakens beinhaltet zwei Zellkerne. Es kommt zur Karyogamie, wodurch eine diploide Zygote entsteht. Diese verlängert sich zu einer langgezogenen, schlauchförmigen Kapsel, dem eigentlichen Ascus (55-75 x 6-12  $\mu\text{m}$ ). Durch wiederholte Hakenbildung entstehen auf diese Weise eine Vielzahl an Asci. Die Anlage der Asci erfolgt in der Zeit von Ende Dezember bis Anfang März. In den Asci findet die Meiose mit anschließender Mitose statt, so dass am Ende acht Tochterkerne im Ascus vorliegen. Sie werden mit dem eigenen Zellplasma und einer

Zellwand umhüllt. Die vollständige Reifung der Ascosporen erfolgt stufenweise und kann von Mitte März bis Anfang Juni abgeschlossen sein.

Die Anzahl der initiierten Pseudothecien ist abhängig von der Stärke des Vorjahresbefalls (Vukovits, 1980; Gadoury & MacHardy, 1986) und wird wesentlich von der Temperatur und Feuchtigkeit beeinflusst. Die optimale Temperatur für die Anlage der Pseudothecien liegt zwischen 4-10°C (MacHardy, 1996), ist aber auch bei Temperaturen von unter 0°C möglich. Kurzzeitig niedrige Temperaturen im Herbst stimulieren die Pseudothecienbildung (Wilson, 1928). Die Initiation kann bis in den Februar erfolgen, Frost- und Ruheperioden sind nicht notwendig (Wiesmann, 1932). Trockenperioden nach dem Laubfall führen zu einer signifikant niedrigeren Pseudotheciendichte (MacHardy, 1996). Der Einfluss von Licht auf die Bildung und Entwicklung der Pseudothecien konnte von Jeger und Butt (1983) widerlegt werden. Einen entscheidenden Einfluss auf die Anlage der Fruchtkörper hat der Infektionszeitpunkt. Aus späten Infektionen (Juli, August, September) entstehen oft diffuse Befallsstellen, bei denen die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Hyphen vom unterschiedlichen Paarungstyp aufeinander treffen, erhöht ist (Wilson, 1928).

Teilweise ist die Entwicklung der Pseudothecien zum Zeitpunkt des Wintereinbruchs bereits bis zum Stadium der Ascusinitiation fortgeschritten (MacHardy, 1996). Im Winter stagniert die Entwicklung jedoch oder es findet nur eine geringfügige Differenzierung während wärmerer Winterperioden statt (Vukovits, 1980; MacHardy et al., 2001). Schneelagen können die Entwicklung der Pseudothecien insgesamt begünstigen (Vukovits, 1980).

Mit steigenden Temperaturen (0-25°C) reifen gegen Ende des Winters oder zu Beginn des Frühjahres die Asci in den Pseudothecien heran (MacHardy, 1996). Sie benötigen mehrere Wärmeperioden, um den physiologischen Status zu erreichen, der die Aufnahme von Wasser, das Anschwellen und Aufreißen des Exoascus, und die Ausschleuderung der Ascosporen ermöglicht (MacHardy, 1996). Ein Pseudothecium kann über 200 Asci, mit jeweils acht hell- bis olivgrünen Ascosporen, beinhalten (Vukovits, 1980).

Die optimale Temperatur für die Entwicklung der Ascosporen liegt zwischen 16-18°C, wobei ein Alternieren von Trockenheit und Nässe die Entwicklung begünstigt (Wilson 1928, Wiesmann, 1932). Eine kontinuierliche Blattnässe oder -trockenheit kann die Reifung der Asci dagegen verzögern oder hemmen (Wiesmann, 1932; Louw, 1951; James & Sutton, 1982; Jeger & Butt, 1983). Die Apfelsorte und der Zeitpunkt des Blattfalls haben neueren Studien zu Folge keinen Einfluss auf die Entwicklung der Pseudothecien und Ascosporen im Frühjahr (James und Sutton, 1982; Gadoury et al., 1984; Smith & MacHardy, 1991). Ein verzögerter Laubfall kann dagegen zu einer Verschiebung der primären Infektionsperiode und einem höheren Ascosporenpotenzial führen (Kollar, 2008).

Die Nährstoffe, die für die Anlage und Reifung der Fruchtkörper benötigt werden, stammen aus dem Falllaub. Biopolymere aus der pflanzlichen Zellwand sowie Proteine und Nucleinsäuren stellen die wichtigste Kohlenstoff- und Stickstoffquellen dar. Ein gleichbleibendes C:N Verhältnis ist für eine positive Entwicklung von *V. inaequalis* entscheidend (Leben & Keitt, 1948; Fothergill & Ashcroft, 1955 a + b).

#### **1.1.4. Sporenausschleuderung und Infektion**

Sind die Ascosporen im Frühjahr vollständig entwickelt, kommt es bei Regenereignissen zur aktiven Sporenausschleuderung (Hirst & Stedman, 1962; MacHardy & Gadoury, 1986). Da die Pseudothecien und/oder Asci nicht gleichzeitig reifen, ist ein Ausschleudern der Ascosporen über einen Zeitraum von fünf bis neun Wochen (Mitte März - Anfang Juni) möglich, was zu einer langen Infektionsperiode führt (Primärsaison) (Aderhold, 1896; Vukovits, 1980). Die Ascosporenenreifung ist mit der Wirtsentwicklung synchronisiert, so dass die ersten Asci mit Beginn des Knospenaufbruchs reif sind (MacHardy, 1996).

Zum Auskeimen benötigen die Sporen einen Wasserfilm auf der Blattoberfläche. Der Keimschlauch durchdringt die Cuticula (Keitt & Jones, 1926; Bowen et al., 2011) und die Primärinfektion wird etabliert. Die Zeit vom Auskeimen bis zur Etablierung der Infektion ist eine Funktion aus Temperatur und Blattnässedauer, wobei mit zunehmendem Blatt- und Fruchtalter die benötigte Blattnässedauer zunimmt. Nach Mills (1944) können Infektionen bei Temperaturen zwischen 1-26°C stattfinden. Die benötigte Blattnässedauer variiert von 26 h bei 5°C bis 9 h bei 16-24°C. Infektionen bei Temperaturen über 26°C finden nur selten statt.

### **1.2. Strategien zur Bekämpfung**

Primärinfektionen im Frühjahr erfolgen fast ausschließlich über Ascosporen, wobei schorfbefallene überwinternde Blätter das wichtigste Inokulum darstellen. Um das Primärinokulum so gering wie möglich zu halten und eine frühe Befallsentwicklung zu verhindern werden zwei Hauptstrategien der Bekämpfung angewandt: Maßnahmen zur Reduktion der Ascosporenenentwicklung während der saprophytischen Phase im Herbst und Winter sowie Maßnahmen zur Minderung von Schorfinfektionen während der Vegetationsperiode.

#### **1.2.1 Bekämpfung in der Vegetationsperiode**

##### **1.2.1.1. Resistente Sorten**

Die effektivste Strategie zum Schutz der Pflanze vor Schorfbefall ist der Anbau resistenter Sorten wie z.B. Topaz, Santana, Retina, Otava oder Rubinola. Durch den Anbau resistenter Sorten lassen sich 80% der sonst üblichen Fungizidmenge einsparen (Fischer, 2004). Ein vollständiger Verzicht von Pflanzenschutzmitteln ist nicht möglich, da fehlende Fungizidapplikationen häufig zu verstärktem Mehltaubefall

und zum Auftreten weiterer Pilzkrankheiten führen (Belz & Ruess, 2001). Fungizidbehandlungen sollten auch mit reduziertem Umfang durchgeführt werden, um einer möglichen Resistenzbrechung des Schorfpilzes entgegen zu wirken. Beim Verbraucher finden die neuen Apfelsorten bisher noch wenig Akzeptanz. Sie haben einen Marktanteil von etwa 5% (Erschbamer, 2013; Waldner, 2013).

### **1.2.1.2. Prognose**

Die ersten Schorfprognosemodelle wurden bereits 1940 von Mills entwickelt und sind bis heute Grundlage der Schorfwarnsysteme. Darauf aufbauend wurden seit Beginn der 1990er Jahre neue Simulationsprogramme (RIMpro, Welte-Schorfprognose, SIMSCAB) entwickelt, die auch biologische Parameter, wie die Reifung der Ascosporen, in die Vorhersage integrieren. Die Prognose ist dadurch zuverlässiger geworden und erlaubt dem Anbauer den gezielten Einsatz von Fungiziden (Jones & Aldwinckle, 1990) und die Einsparung von Spritzungen (Beresford & Manktelow, 1994).

### **1.2.1.3. Fungizide**

Seit den 1940er Jahren stehen im konventionellen Anbau organische Fungizide für die Schorfbekämpfung zur Verfügung (MacHardy, 1996). Im Gegensatz zu präventiven „Belagsfungiziden“ haben kurative Fungizide meist eine systemische/teilsystemische Wirkung mit einer Störung spezifischer physiologischer Abläufe, wie z.B. der Synthese von Ergosterol, der Atmungskette oder der Zellkernteilung. Aufgrund der häufigen Anwendungen dieser spezifisch wirkenden One-site Inhibitoren bildeten sich relativ schnell Resistenzen aus (Braun, 1994; Chapmann, 2011). Gegenüber Dodin, Benzimidazolen, Steroldemethylierungshemmern, Anilinopyrimidinen und Strobilurinen wurden bereits Resistenzen des Apfelschorferregers nachgewiesen (Carisse & Dewdney, 2002; Bertagnoll & Marschall, 2011). Multi-site Inhibitoren, die an verschiedenen Stellen in den Stoffwechsel eingreifen, z.B. Diathion (Delan®), Kupfer und Schwefelpräparate ermöglichen dagegen keine Resistenzbildungen.

Kupfer ist der älteste fungizide Wirkstoff in der Historie der Schorfbekämpfung und wird bis heute weltweit verwendet. Kupferpräparate weisen einen hohen Wirkungsgrad auf und können relativ kostengünstig hergestellt werden. Die Präparate zeigen eine phytotoxische Wirkung, deren Folge u.a. eine Verbräunung der Blütenblätter und Fruchtberostung sein kann. Zurzeit sind in Deutschland vier Präparate auf Basis von Kupferhydroxid, Kupferoctanoat und Kupferoxychlorid zugelassen. Im Apfelobstbau darf eine Aufwandmenge von 6 kg Kupfer pro Hektar und Jahr eingesetzt werden. Die ökologischen Obstbauverbände in Deutschland (DEMETER, BIOLAND) haben die maximale Aufwandmenge auf 3 kg Kupfer pro Hektar und Jahr begrenzt.

Durch die europaweite Einführung maximaler Kupferaufwandmengen und das verstärkte Auftreten von Schorfresistenzen gegen organische Fungizide haben Schwefelpräparate in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Die fungizide Wirkung der Präparate beruht auf Oxidationsprodukten des Schwefels, die an der Blattoberfläche entstehen (Börner, 1997) und Schwefelwasserstoff, der von fakultativ und obligat anaeroben, heterotrophen Bakterien als Stoffwechselprodukt freigesetzt wird (Madigan & Martinko, 2006). Mit dem Einsatz von Netzschwefel und Schwefelkalk konnten zum Teil gute Bekämpfungserfolge erreicht werden (Kelderer et al., 1997; Geipel, 1999; Holb et al., 2003; Montag et al., 2005). Die Wirkung ist jedoch geringer als die der Kupferpräparate (Holb et al., 2003). Hohe Aufwandmengen von Schwefelkalk fördern die Berostung und begünstigen Sonnenbrand, wodurch die Fruchtqualität reduziert wird (Mills, 1947; Holb, 2003). Die Behandlungen mit Netzschwefel wirken weniger phytotoxisch, haben aber auch ein geringeres Wirkungsspektrum, insbesondere bei Temperaturen  $\leq 10^{\circ}\text{C}$  kommt es zu einem Wirkungsverlust (Holb, 2003; Jamar et al., 2008). Ein Ersatz von Kupfer durch den verstärkten Einsatz von Schwefelpräparaten ist daher nicht möglich.

#### 1.2.1.4. Biologische Verfahren

Im ökologischen Obstbau wurde in den vergangenen 20 Jahren intensiv nach alternativen, biologischen Methoden zur Bekämpfung des Apfelschorferregers gesucht. Anorganische und organische Präparate, wie Gesteinsmehle, Tonerden, Algenextrakte, Komposte, Humuspräparate und  $\alpha$ -Tocopherol zeigten jedoch nur eine unzureichende Wirkung im Freiland (Golba, 2002).

Das Potenzial verschiedener saponinhaltiger Pflanzenextrakte, Pflanzenaufgüsse und Öle, als Pflanzenstärkungsmittel, wurde ebenfalls untersucht (Golba, 2002). Gilliver (1947) und Bosshard (1992) konnten *in vitro* eine Hemmung der Konidienkeimung und des Mycelwachstums von *V. inaequalis* mit einem wässrigen Efeuextrakt (*Hedera helix*) nachweisen. Die Wirkung konnte unter Freilandbedingungen nicht bestätigt werden. Bei Infektionsversuchen im Gewächshaus zeigten Pflanzenextrakte von *Saponaria officinalis*, *Quillaja saponaria* und *Primula veris* einen hohen Wirkungsgrad von bis zu 99% (Bosshard & Häseli, 1993; Pfeiffer, 2001; Pfeiffer et al., 2004; Späth, 2000). Im Zuge der REPCO-Studie wies ein Präparat von *Yucca schidigera* einen Wirkungsgrad von  $\sim 70\%$  im Freiland auf (Bengtsson et al., 2007; Heijne et al., 2007).

Der Einsatz von Antagonisten gegen den Apfelschorferreger *V. inaequalis* wurde in zahlreichen Arbeiten erprobt (Carisse & Dewdney, 2002). Für epiphytische Pilze der Gattung *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Microsphaeropsis* und *Trichoderma* konnte *in vitro* eine Hemmung des Mycelwachstums bis 80% und der Konidienkeimung bis zu 50% beobachtet werden. Im Freiland zeigte das Hefeisolat *Sporidiobolus* sp., mit einer Befallsreduktion von 81% eine gute Wirkung (Kucheryava et al., 1999). Die beiden Pilze aus der Apfelphyllosphäre *Athelia bombacina* und *Chaetomium globosum* zeigten an Apfelsämlingen im Gewächshaus

ein hohes antagonistisches Potenzial und reduzierten den Schorfbefall um bis zu 90% (Heye & Andrews, 1983). Die Wirkung konnte unter Freilandbedingungen nicht bestätigt werden (Boudreau & Andrews, 1987). Für Vertreter der Gattung *Pseudomonas*, *Penicillium*, *Nocardia*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Curtobacterium* und *Torula* sp. konnten *in vitro* starke Hemmeffekte auf die Keimung der Konidien und das Mycelwachstum nachgewiesen werden (Cinq Mars, 1949; Wassermann, 1969; Burr et al., 1996; Kucheryava, et al., 1999). *P. fluorescens* und *B. pumillus* zeigten dabei die höchsten Wirkungsgrade.

Im direkten Vergleich zu verfügbaren Fungiziden erwies sich die biologische Bekämpfung unter Freilandbedingungen häufig als unzuverlässig und nicht geeignet (Boudreau & Andrews, 1987; Burr et al., 1996). In der Praxis finden die beschriebenen Verfahren daher keine Anwendung.

### 1.2.2. Bekämpfung der Überwinterungsform

Die Historie des Falllaubmanagements reicht zurück bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts. Durch Arbeiten von Aderhold (1894, 1895, 1896, 1900) und Wallace (1913) wurde die Bedeutung der Ascosporen als Primärinokulum für Infektionen im Frühjahr erkannt. Brooks (1909) und Whetzel (1910) konnten in ersten Versuchen, bei denen das Falllaub mittels pflügen in den Boden eingearbeitet wurde, eine Reduktion der Schorfsymptome nachweisen. In den 1930er Jahren wurden Präparate auf Basis von Ammonium, Kalk und Kalium, die zu einer deutlichen Ascosporenreduktion führten, entwickelt (Wiesmann, 1935; Holz, 1938; Henrick, 1939). Diese Behandlungsstrategien konnten sich jedoch nicht durchsetzen, da in den 1940er Jahren organische Fungizide auf den Markt kamen, die effektiver als bisherige Kupfer- und Schwefelbehandlungen waren und sich durch eine geringe phytotoxische Wirkung auszeichneten. Durch das Auftreten von Resistenzen gegen organische Fungizide, Resistenzverluste bei widerstandsfähigen Apfelsorten und die Kupferproblematik ist die Bekämpfung der Überwinterungsform von *V. inaequalis* zur Zeit wieder stärker in den Fokus der Forschung gerückt (Kollar & Pfeiffer, 2003; 2005; Holb et al., 2006; Köhl et al., 2007; tSaoir et al., 2010; Rüdiger et al., 2012 a + b; Rüdiger & Kollar, 2012; Porsche & Kollar, 2014).

#### 1.2.2.1. Phytosanitäre Maßnahmen mit direkter Wirkung

Das energieaufwändige Verbrennen des Falllaubs wurde in den 1920er Jahren erprobt (Curtis, 1924). Die Methode wurde gleichzeitig zur Unkrautbekämpfung genutzt und ermöglichte eine Verringerung der Ascosporenmenge um 98% (Moritz, 1993). Für die Praxisanwendung wurde sie jedoch als zu zeit-/energieaufwändig und gefährlich eingestuft (Rudloff & Schmidt, 1935; MacHardy, 1996).

Das Mulchen ist eine Standardmaßnahme zur Bekämpfung der saprophytischen Phase von *V. inaequalis*. Die Blätter werden zerhäckselt und teilweise mit Erde bedeckt. Die Aktivität der Regenwürmer wird stimuliert (Raw, 1962) und der

biologische Abbau des Falllaubs verstärkt. Die Methode erlaubt eine Reduktion des Ascosporeninokulums um bis zu 85% (Vincent et al., 2004).

Mit einem Laubsauger wie ELISE oder EMMA lassen sich im Herbst bzw. Frühjahr etwa 92% der noch vorhandenen Blätter aus der Obstanlage entfernen. Der Anteil schorfbefallener Blätter kann um 76%, der Anteil befallener Früchte um 80% vermindert werden (Triloff, 2006). Andere im Falllaub überwinternde Krankheiten und Schädlinge werden mit entfernt (Triloff, 2006). Die Methode schont den Boden, da nur eine Fahrt mit dem Laubsauger notwendig ist. Voraussetzung für die Anwendung dieser Technik sind eine ebene Fahrgasse, ein Baumstreifen ohne größere Hindernisse (Sockel von Hagelpfosten etc.) und trockenes, frostfreies Wetter. Die Staubbelastung während des Laubsaugens ist hoch, wie auch die Anschaffungskosten für die Maschine.

Die ersten Feldversuche zur chemischen Bekämpfung der saprophytischen Phase des Apfelschorfs wurden 1924 von Curtis durchgeführt. Er applizierte im Frühjahr dreimalig Schwefelkalk auf das Falllaub und konnte den primären Blattschorfbefall um 60% reduzieren. Intensive Studien zum Einsatz chemischer Fungizide wurden in den 1930er und 1940er Jahren von Keitt und seinen Mitarbeitern in den USA durchgeführt. Anorganische Chemikalien, wie z.B. Kupferkalkarsen, Ammoniumsulfate, Phenylquecksilberchloride und Natrium dinitro-o-cresylate, erwiesen sich mit Wirkungsgraden von bis zu 100% als sehr effizient (Palmiter & Keitt, 1936; Keitt & Palmiter, 1937; Keitt, 1939; Keitt et al. 1940; 1941 a, b). In den 1960er Jahren wurde das Potenzial organischer Kontaktfungizide (Dodin, Captan) zur Hemmung der Pseudothecienbildung und/oder Ascosporenfreisetzung untersucht. Behandlungen im Herbst hemmten die Initiierung der Pseudothecienbildung nahezu vollständig (Connor & Heuberger, 1968; Gadoury et al., 1989). In den 1980er Jahren wurden systemische Fungizide entwickelt und auch für die Falllaubbehandlung getestet. Benzimidazole (Tubulinsystemhemmer), wie z.B. Benomyl und Bavistin (Burchill et al., 1965; McIntosh, 1969; Burchill, 1972; Qasba & Shah, 1981), sowie Ergosterolbiosynthesehemmer z.B. Vanguard (Gadoury et al., 1989) und Bitertanol (Qasba & Shah, 1981) verhinderten die Produktion der Ascosporen nahezu vollständig. Versuche, in denen die Fungizidapplikation vor dem Laubfall in Kombination mit Harnstoff durchgeführt wurde (Moller et al., 1981; Heijne et al., 2000; Holb et al., 2006), bewirkten eine Reduktion der Ascosporenmenge und der Schorfsymptome im Frühjahr. Alle genannten Stoffe wurden vor allem aufgrund von ökologischen Bedenken nicht in die obstbauliche Praxis eingeführt.

#### **1.2.2.2. Phytosanitäre Maßnahmen mit indirekter Wirkung**

Behandlungen mit Harnstoff erfolgen in der Praxis zu Beginn und gegen Ende des Laubfalls. Sie fördern das Wachstum und die Aktivität mikrobieller Populationen auf den Blättern (Crosse et al., 1968; Burchill und Cook, 1971). Die Mikroorganismen stören die Entwicklung der Pseudothecien und Asci (Ross, 1961; Crosse et al., 1968; Hossain et al., 2009), wodurch die Produktion der Ascosporen um bis zu 97%

reduziert wird (Burchill et al., 1965; Sutton & MacHardy, 1993). Im ökologischen Anbau gibt es keine Zulassung für Harnstoff.

Der natürliche Blattabbau im Winter und Frühjahr erfolgt hauptsächlich durch den Regenwurm *Lumbricus terrestris* (Raw, 1962; Niklas, 1980; Niklas & Kennel, 1981). Um den Blattabbau durch Regenwürmer zu unterstützen, sollte der Einsatz von Kupferbehandlung und anderen toxischen Chemikalien vermieden werden, da dies zu einer Abnahme der Regenwurmpopulation und einer „Konservierung“ der Falllaubsschicht führt (Cook & Burchill, 1973; Cook & Swait, 1975; Kennel, 1981; Niklas & Kennel, 1981). Ohne den Einsatz regenwurmschädigender, toxischer Chemikalien ist die natürliche Population von *L. terrestris* so effizient, dass etwa 90% der Blattmasse vor dem Knospenaufbruch abgebaut werden (Deutschland, Stuttgart) (Raw, 1962; Kennel, 1981; Niklas & Kennel, 1981; Aalbers 2001). Als besonders attraktiv für Regenwürmer wurde mit Hefeextrakt oder TSB (Tryptic Soy Broth) behandeltes Falllaub bewertet (Kollar & Pfeiffer, 2005). Das Trockengewicht der Blätter war am Ende der Primärsaison um 80 bis 90% reduziert.

Die Behandlung des Falllaubs mit verschiedenen mineralischen und organischen Pflanzenstärkungsmitteln (Komposte, Humus-, Kalk- und Stickstoffpräparate) wurde untersucht (Golba, 2002). Kalkhaltige Präparate haben nur in hohen Aufwandmengen und in nicht reproduzierbarem Ausmaß eine Reduktion des Ascosporenausstoßes zur Folge. Komposte und Humuspräparate können den Laubabbau deutlich fördern und folglich die Ascosporenfreisetzung mindern. Für den Wirkungsgrad scheinen Alter, Konsistenz und die Zusammensetzung der Präparate eine Rolle zu spielen. Bei der Ausbringung von Kompost muss der Stickstoffeintrag bedacht werden, um eine Überdüngung zu vermeiden (Groß-Spangenberg, 1992).

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit dem Einsatz von Antagonisten. *Athelia bombacina* zeigt auf natürlichen schorfbefallenen Blättern im Labor und Freiland das Potenzial die Pseudothecien- und Ascosporenproduktion vollständig zu unterdrücken (Heye & Andrews, 1983; Cesari, 2001). Die antagonistische Wirkung, die nur bei einem hohen Inokulum gewährleistet wird, beruht auf Nahrungskonkurrenz und Antibiose (Heye, 1982; Heye & Andrews, 1983; Pillion et al., 1997). *Chaetomium globosum* konnte bei einer Applikation nach dem Blattfall das Ascosporeninokulum um 65-70% reduzieren (Heye & Andrews, 1983; Miedke & Kennel, 1990), *Microsphaeropsis* sp. und *Trichoderma* sp. um 71-80% (Carisse et al., 2000). *Ophiosoma* sp. zeigte *in vitro* mit 89% eine sehr gute Wirkung, die in Freilandversuchen jedoch nicht bestätigt werden konnte, da sich der Pilz nicht im Falllaub etabliert hatte (Pillion et al., 1997). Die Behandlung des Falllaubs mit Bakterienisolaten der Gattungen *Pseudomonas*, *Erwinia* und *Enterobacter* reduzierte die Pseudothecienentwicklung in geringem Umfang (Meszka & Bielenin, 2006).

Derzeit findet die Applikation von Antagonisten in der Praxis nicht statt. Ursachen dafür sind die unzureichende Etablierung der Antagonisten auf dem Falllaub und die Problematik, einen Organismus „künstlich“ ins Ökosystem einzubringen. Vor diesem

Hintergrund und der Tatsache, dass Harnstoff im ökologischen Anbau keine Zulassung hat und Dünger und Komposte einen unzureichenden Wirkungsgrad zeigen, untersuchten Kollar & Pfeiffer (2003, 2005) erstmals die Applikation von Nährmedien auf das Falllaub. Getestet wurden Bestandteile von Nährmedien aus der Mikrobiologie, Zuckerlösungen, Apfelsaft, Malz, Maischeenzyme, Bohnenextrakt, Milchpulver, Kompostzusätze und Harnstoff. Am effektivsten erwiesen sich in zwei Versuchsjahren Behandlungen mit TSB 9%. Es kam zu einer Reduktion des kumulativen Ascosporenpotenzials von > 90% (Kollar & Pfeiffer, 2005). Ein Hefeextrakt 3% führte zu einer Reduktion des Ascosporenpotenzials um etwa 80% und einem durch die Regenwürmer verstärkten Blattabbau um 25%.

### **1.3. Der Prozess der Falllaubzersetzung beim Apfel**

Der Abbau eines Apfelblattes erfolgt in mehreren Phasen, an denen unterschiedliche Organismen beteiligt sind (Berg & McClaugherty, 2003; Ventura et al, 2010; Snajdar et al., 2011). Die Blätter werden nach dem Blattfall von Pilzen, Bakterien, Algen und Einzellern besiedelt. Durch die enzymatische Aktivität der Organismen werden die Zellwände der Blätter „aufgeweicht“. Milben und Springschwänze fressen Löcher in das abgestorbene Pflanzengewebe und machen das Blattinnere für Pilze und Bakterien besser zugänglich. Mücken- und Fliegenlarven vergrößern die Löcher und durch die Aktivität von Tausendfüßlern, Asseln und Schnecken werden die Blätter zerkleinert. Die mit dem Abbau einhergehende Oberflächenvergrößerung der Blätter stimuliert die biologische Aktivität der Mikroorganismen zusätzlich.

Die Phyllosphäre der Apfelblätter wird in erster Linie von Mikroorganismen des Aeroplanktons besiedelt (Kinkel et al., 1989). Die mikrobielle Gemeinschaft auf den Apfelblättern spiegelt sowohl die Immigration der Mikroorganismen und ihr Wachstum, als auch die Verluste durch Emigration und Zelltod wider (Kinkel et al., 1989). Nach dem Blattfall im Herbst findet eine Anreicherung der Mikroorganismen durch die Nähe zum Boden statt. Die folgende mikrobielle Sukzession ist abhängig von der Jahreszeit, Blattökologie, Witterung und der Fähigkeit der einzelnen Arten, Nährstoffe aufzuschließen (Frankland, 1998).

Pilze sind bei allen bisher untersuchten Falllaubtypen die wichtigsten Destruenten (Swift, 1976; Hendrix et al., 1986; Holland & Coleman, 1987; Neely et al., 1991; Voříšková & Baldrian, 2013). Sie stellen in den ersten Monaten nach dem Blattfall die dominante Organismengruppe dar (Snajdr et al., 2011). Saprophytische Ascomyceten gehören zu den wichtigsten Primärbesiedlern. Sie setzen extrazelluläre Enzyme frei, die zum Abbau von Polysacchariden führen, z.B. Hemicellulosen, Cellulosen und Pektin (Romani et al., 2006; Valášková et al., 2009). Um ihren N- und P-Bedarf zu decken, können sie mit Hilfe von Ureasen, Peptidasen und Phosphatasen Peptide und Proteine abbauen, (Sinsabaugh et al., 2002).

Die oberflächliche Sukzession der Pilze auf dem Apfelfalllaub ist ein dynamischer Prozess. In den unterschiedlichen Blattabbauzustadien entstehen fortwährend Nischen,

die von neuen Arten besiedelt werden (Frankland, 1998). Durch die Abbauprozesse werden Spaltprodukte von Polysacchariden frei, die als Substrate für Bakterien dienen (Romani et al., 2006). Der Anteil der Bakterien an der mikrobiellen Gemeinschaft des Falllaubs steigt und es stellt sich konstantes Verhältnis von Pilzen zu Bakterien ein. Im weiteren Verlauf der mikrobiellen Sukzession verlagert sich das Verhältnis zu Gunsten der Bakterien. Sie agieren durch die Produktion fungizider Substanzen und die Freisetzung chitinolytische Enzyme als pilzliche Antagonisten (Romani et al., 2006). Besonders der Anteil an Actinobakterien steigt im Verlauf der Falllaubsukzession durch ihre Fähigkeit, Lignin, niedermolekulare Verbindungen und die pilzliche Biomasse abzubauen, immer weiter an (Benner et al., 1984; Kirby, 2006). Durch die mikrobielle Besiedlung mit Bakterien werden die Blattabbauprozesse weiter verstärkt. Dies begünstigt den Fraß durch Regenwürmer, die die Blätter zu Mull weiterverarbeiten. Etwa 80-90% der Nährstoffe aus den Apfelblättern werden dem Boden durch die Remineralisierung jährlich wieder zugeführt (Tagliavini et al., 2007).

Die Abbaurrate der Apfelblätter wird von der Qualität des Falllaubs (Nährstoffzusammensetzung), der Zusammensetzung der Destruenten und abiotischen Umweltfaktoren, wie Temperatur und Feuchtigkeit, beeinflusst (Parr & Papendick, 1978). Die initiale N-Konzentration gilt als Schlüsselfaktor für einen schnellen Abbau, da Stickstoff der limitierende Faktor für die mikrobiologische Aktivität ist (Neely et al., 1991; Aber & Melillo, 2001). Bei Falllaub der Sorte *Golden Delicious* konnte in Neuseeland eine Stickstoffkonzentration von 1,5%, bei *Mondial Gala* in Italien eine Konzentration von 1,3% des Trockengewichts nachgewiesen werden (Haynes & Goh, 1980; Tagliavini et al., 2007). Die Biopolymere der pflanzlichen Zellwand stellen die wichtigste Kohlenstoffquelle für die mikrobiellen Zersetzer des Falllaubs dar (Chapin & Kedrowski, 1983). Kohlenstoff hat einen Anteil von 46% am Trockengewicht des Apfelfalllaubs, wobei Cellulose mit 33% die Hauptkohlenstoffquelle darstellt (Tagliavini et al., 2007). Der Abbau von Hemicellulosen setzt nach dem Blattfall, der von Cellulose erst im Frühjahr ein (Tagliavini et al., 2007). Aufgrund ihrer komplexen Struktur sind beide Moleküle enzymatisch schwer zugänglich, so dass an den Abbauprozessen eine Reihe von Enzymen beteiligt sind (Baldrian & Valášková, 2008).

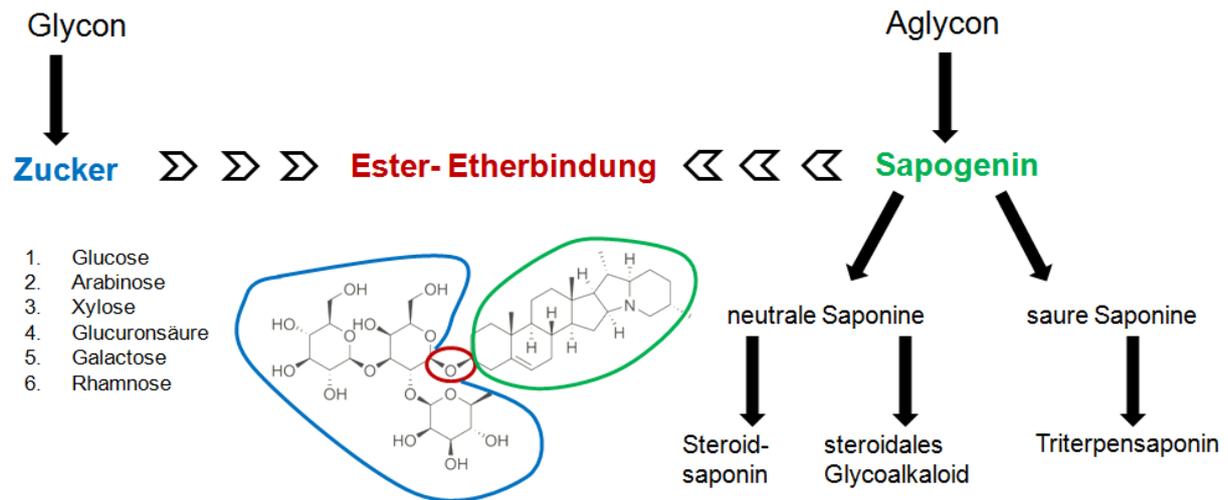
Lignin hat einen Anteil von etwa 13% am Apfelfalllaub (*Mondial Gala*) (Tagliavini et al., 2007). Ein Abbau findet in den ersten Monaten nach dem Laubfall nur in geringem Umfang statt, da durch das steigende C:N Verhältnis im Apfelfalllaub die Produktion ligninolytischer Enzyme unterdrückt wird (Keyser et al., 1978; Carreiro et al., 2000; Tagliavini et al., 2007; Han et al., 2011). Der langsame Abbau der Biopolymere spiegelt sich im C-Gehalt des Apfelfalllaubs wider. In den ersten vier Monaten nach dem Laubfall bleibt die C-Konzentration konstant (Tagliavini et al., 2007). Nach sechs Monaten sind etwa 6,5%, nach neun Monaten 9% der initialen Kohlenstoffmenge abgebaut.

## 1.4. Saponine

### 1.4.1 Vorkommen, Eigenschaften und chemische Struktur

Saponine sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die als Glycoside von Steroiden, Steroidalkaloiden oder Triterpenen in Pflanzen vorkommen. Sie werden als natürlicher Schutz vor Pathogenbefall (Viren, Bakterien, Pilze) und Herbivoren (Insekten, Mollusken) gebildet (Francis et al., 2002; Sparg et al., 2004; Desai et al., 2009). Saponine sind oberflächenaktive Stoffe, die in wässriger Lösung stabile Schäume bilden (Osbourne, 1996). Sie kommen bei höheren Pflanzen in etwa 100 Familien vor (Vincken et al., 2007), z.B. den Fabaceae (Soja, Erbsen), Asparagaceae (Spargel), Araliaceae (Ginseng) und Hippocastanaceae (Roskastanie). Akkumuliert werden die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe besonders in den nährstoffreichen Geweben der Wurzeln, Knollen, Blüten, Samen und Blätter. Sie können 0,1-30% des Trockengewichts von Pflanzen ausmachen (Tschetsche & Wulf, 1973). Der Saponingehalt ist von abiotischen Umweltfaktoren wie der Wasser- und Nährstoffverfügbarkeit und dem Licht (Szakiel et al., 2011 a) abhängig. Die Variationen können auch auf die gezielte Synthese der Saponine bei Fraßdruck durch Herbivore oder Pathogenbefall zurückzuführen sein (Ndamba et al., 1994; Lin et al., 2009; Szakiel et al., 2011 b).

Saponine entstammen dem Phytosterolanabolismus und bestehen aus einem lipophilen Sapogenin (Aglycon), an das verschiedene hydrophile Saccharidseitenketten gebunden sind (Abb. 3). Die Nomenklatur erfolgt in erster Linie anhand der Aglycone, bei denen drei verschiedene Grundstrukturen vorliegen können (Abb.1): Triterpenoide, die aus einem C<sub>30</sub>-Grundgerüst bestehen, Steroidsapogenine mit einer C<sub>27</sub>-Grundstruktur oder steroidale Glycoalkaloide, ebenfalls mit einem C<sub>27</sub>-Grundgerüst, in das zusätzlich ein N-Atom eingelagert ist (Osbourne, 1996; Desai et al., 2009). Über eine Ester- oder Etherbindung sind an der C<sub>3</sub>- (monodesmosidisch) und C<sub>26</sub>- bzw. C<sub>28</sub>-Position (bidesmosidisch) die Saccharidseitenketten angeknüpft. Die Saccharidketten bestehen aus 2-7 Monosaccharideinheiten, wobei die häufigsten Glucose, Galactose, Rhamnose, Xylose, Arabinose und Glucuronsäure sind (Bialy et al, 1999). Die Glycosylierung wird durch eine UDP-Glycosyltransferase katalysiert und ist notwendig, um die biologische Aktivität des Saponins zu gewährleisten (Watzl, 2001). Die strukturelle Variabilität der Aglycone und die Vielzahl möglicher Kohlenhydratstrukturen haben eine große Variabilität der biologischen Eigenschaften dieser Stoffgruppe zur Folge.



**Abb. 3:** Struktur der Saponine

Saponine besitzen eine hohe Affinität zu Sterolen, wie z.B. Cholesterin. Sie binden an Phospholipide und Ergosterol in der pilzlichen Zellmembran (Desai et al., 2009) und führen zur Zellyse. Die Oberflächenaktivität der Saponine bedingt auch ihre starke hämolytische Aktivität (Watzl, 2001). Diese ist bei den einzelnen Saponinen unterschiedlich stark ausgeprägt (Chwalek et al., 2006; Gauthier et al., 2009 a + b).

Verwendung finden Saponine unter anderem als Futterzusatz für Wiederkäuer, in Zahnpasta, Mundwässern, Shampoos und als Reinigungsmittel. Auch in der Medizin gibt es zahlreiche Verwendungsmöglichkeiten, so werden Saponine zur Senkung des Cholesterinspiegels eingesetzt sowie als Venen- oder schleimlösendes Mittel (Augustin et al., 2011). Sie weisen eine immunologische Wirkung auf, da sie die Lymphozytenproliferation stimulieren und bei T-Lymphozyten antikörperspezifische Gedächtniszellen induzieren. *In vitro* konnte eine hemmende Wirkung auf die Replikation verschiedener Viren z.B. HIV nachgewiesen werden (Watzl, 2001).

#### 1.4.2. Extraktion und Aufreinigung

Zum Nachweis von Saponinen wurden in der Vergangenheit Methoden verwendet, die die chemischen oder biologischen Eigenschaften dieser Stoffgruppe nutzten (Augustin et al., 2011). Die Fähigkeit, stabile Schäume in wässriger Lösung zu bilden, wurde verwendet, um nach Pflanzenmaterialien zu suchen, die einen hohen Saponingehalt aufweisen (Oleszek, 2002). Allerdings bilden nicht alle Saponine stabile Schäume, besonders viele bi- und tridesmosidische Saponine besitzen diese Eigenschaft nicht, so dass der Test auf Schaumbildung häufig zu falschen Schlussfolgerungen führte. Die hämolytische Aktivität wurde untersucht, indem das entsprechende Pflanzenmaterial mit Blut in isotonischer NaCl-Lösung zentrifugiert wurde. Durch das Vorhandensein des Hämoglobins im Überstand konnte die Hämolyse nachgewiesen werden (Oleszek, 1990).

In den letzten Jahren wurden viele nicht-biologische Methoden zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Saponinen entwickelt. Dazu gehören die Spektrophotometrie, die Dünnschichtchromatographie (TLC), die Gaschromatographie (GC), die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) sowie die kombinierten Techniken LC-MS und LC-NMR. Eine moderne Methode zur Vorreinigung der Saponine ist die SPE (solid phase extraction). C18-Säulen werden genutzt um Kohlenhydrate, Flavonoide und Phenole aus der Probe zu entfernen (Oleszek, 1988; 2002; Ha et al., 2006; Zhang & Cheng, 2006). Eine weitere Aufreinigungsmethode ist die präparative Säulenchromatographie (LC). Hierbei werden fast ausschließlich Sephadex LH-20 Säulen verwendet (Reznicek et al., 1990; Shimoyamada et al., 1990; 1995; Schwarzbach, 2004; Lendl & Reznicek, 2007).

Die HPLC ist die beste und meistgenutzte Technik zur Bestimmung und Quantifizierung von Saponinen. Die Trennung erfolgt an reversed-phase-Säulen (C8, C18) (Oleszek, 2002). Durch das Fehlen von chromophoren Gruppen, mit Ausnahme von Glycyrrhizinsäure, ist eine UV-Detektion nur in einem Wellenlängenbereich von 200-210 nm möglich (Absorptionskante), wobei eine Vielzahl anderer Stoffe in diesem Bereich absorbieren. Die Auswahl der Eluenten und Gradienten wird dadurch stark limitiert. Der RI-Detektor wird nur in seltenen Fällen genutzt, da hierbei keine Gradienten verwendet werden können. Andere Techniken nutzen eine Vorsäulenderivatisierung, um chromophore Gruppen an die Saponine anzuknüpfen und die Detektion bei höheren Wellenlängen (254 nm) zu ermöglichen oder kombinieren HPLC-Analysen mit Massenspektrometrie und kernmagnetischer Resonanz (Oleszek, 2002).

## 1.5. Ziele

Das übergeordnete praktische Ziel dieser Arbeit war es, durch Falllaubbehandlungen mit verschiedenen Naturstoffen einen phytosanitären Effekt zu erhalten, der bewirkt, dass die Fruchtkörper von *V. inaequalis* nicht angelegt oder in ihrer darauffolgenden Entwicklungsphase geschädigt werden. Als Folge der Behandlungen sollte das noch vorhandene Ascosporenpotenzial bewertet werden, da es das Primärinokulum des Erregers darstellt und bei einer wesentlichen Reduktion des Ascosporenausstoßes den Pflanzenschutz in seiner Effizienz steigern könnte. Mittel- bis langfristig sollten Grundlagen erforscht werden, die den Kupferersatz oder die -minimierung und die Wirksamkeit schwächer wirkender Fungizide unterstützen könnten.

Das übergeordnete wissenschaftliche Ziel war es, den Einfluss von Naturstoffen auf die Lebensgemeinschaft der Falllaubdestruenten, die den Apfelschorferreger einschließen, zu untersuchen. Hierbei sollte eine Charakterisierung hinsichtlich der Wirkung auf die mikrobiologische Gesamtheit der Falllaubbesiedler erfolgen, die eine wissenschaftliche Analyse der möglichen Hemmwirkungen auf den Zielorganismus erklären. Durch die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten und des biologischen Sauerstoffbedarfes sollte geklärt werden, ob es infolge der Behandlung zu quantitativen und/oder qualitativen Verschiebungen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft kommt. Mögliche Leitorganismen und potenzielle Antagonisten sollten mittels MALDI-TOF und ITS-Sequenzierung identifiziert werden. Die antagonistische Wirkung einzelner Mikroorganismen sollte in Biotests nachgewiesen werden.

Ein weiteres Teilziel war es, das ursächliche Wirkungsspektrum der eingesetzten Stoffe zu identifizieren. Die Entwicklung von SPE und präparativen LC Verfahren sollte eine Aufreinigung der Naturstoffe und eine spätere biochemische Analyse der Substanzklassen mit Hilfe verschiedener Chromatographie-Techniken (TLC, HPLC, LC) ermöglichen. Die Analyse der stofflichen Wirkungsspektren vor dem Hintergrund der mikrobiologischen und/oder der fungiziden Effekte sollte zur Optimierung der allgemeinen Rezepturen, der Applikationstermine und der Extraktionsverfahren für Pflanzenpräparate dienen. Die Optimierung der Präparate sollte auch die potenzielle Verträglichkeit mit den Grundsätzen der ökologischen Produktion hinsichtlich der Ausgangsmaterialien und der Methoden berücksichtigen, um den Transfer in die Praxis zu erleichtern. Die Optimierungen sollten die Ergebnisse des Verbundpartners (Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau, Weinsberg) zur Attraktivität der Behandlungen auf den Blattabbau durch Regenwürmer integrieren, um die Synergieeffekte in den Projektphasen zu berücksichtigen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Falllaubbehandlungen

#### 2.1.1. Versuchsaufbau, Applikation und Präparate

Mit dem beginnenden Laubfall im Herbst (01.11.2010; 27.10.2011; 05.11.2012; 12.11.2013) wurden jeweils 80 g stark schorfbefallene und im Freiland unter Regenschutz getrocknete Blätter in Plastikschaalen (55 x 30 x 7 cm) eingewogen. Die Schalen waren mit Drainagelöchern versehen, um das Abfließen von Regenwasser zu ermöglichen, und mit einem Drahtgitter abgedeckt. Sie wurden im Freiland auf dem Boden exponiert, der mit einem Saranetz abgedeckt war, um Regenwürmer fernzuhalten. Die Falllaubdepots wurden an vier Terminen im Herbst und Winter (Tab.1) mit verschiedenen Nährstoffpräparaten, Fungiziden und potenziellen Antagonisten behandelt (Tab. 2). Die Applikation von etwa 100 ml erfolgte mit einer Handsprühflasche bis zum ersten Abfließen an den Blattoberflächen.

**Tab. 1:** Behandlungstermine der Falllaubdepots in den Versuchsjahren 2010-2014

Behandlung	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14
1	11.01.2011	21.11.2011	21.11.2012	09.12.2013
2	27.01.2011	19.12.2011	19.12.2012	07.01.2014
3	16.02.2011	16.01.2012	15.01.2013	28.01.2014
4	07.03.2011	16.02.2012	13.02.2013	24.02.2014

**Tab. 2 :** Präparate für die Falllaubbehandlungen 2010-2014

Behandlungen	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14
<b>Kontrolle, 2x</b>	Wasser	Wasser	Wasser	Wasser
<b>Nährstoff- und Vitaminpräparate</b>	TSB 9%	TSB 9%	Vitamin-Mix	Vitamin B <sub>3</sub> (1/10)
	TSB 80% Ethanolextrakt	TSB 9% + Saccharose 6%	Vitamin-Mix (1/1000)	Vitamin B <sub>3</sub> (1/100)
	TSB 80% Ethanolpräzipitat	TSB 9% + Hefeextrakt LEIBER 6%	Vitamin B <sub>3</sub>	Hefeextrakt LEIBER konzentriert
	TSB 9% hitzebehandelt	Vitamin-Mix	Vitamin B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub>	Hefeextrakt LEIBER konzentriert <sup>(2)</sup> (Dez., Jan.)
	TSB 4,5%	Aminosäuregemisch	Casaminoacids 6%	Hefeextrakt LEIBER konzentriert <sup>(2)</sup> (Jan., Feb)
	Pepton Casein 6% <sup>(1)</sup>	Pepton Casein 6%	Hefeextrakt LEIBER 6%	Hefeextrakt LEIBER konzentriert <sup>(3)</sup> (Jan.)
	Casaminoacids 6% <sup>(1)</sup>	Casaminoacids 6%	Hefeextrakt LEIBER konzentriert	Hefeextrakt LEIBER 30%
	Hefeextrakt LEIBER 1,1%	Hefeextrakt LEIBER 6%	Pellet Hefeextrakt LEIBER konzentriert	Hefeextrakt LEIBER 30% <sup>(2)</sup> (Dez., Jan.)

Behandlungen	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14
<b>Nährstoff- und Vitaminpräparate</b>	Hefeextrakt LEIBER 80% Ethanolextrakt		Hefeextrakt LEIBER konzentriert + Saccharose 6%	Hefeextrakt LEIBER 30% <sup>(2)</sup> (Jan., Feb.)
	Hefeextrakt LEIBER 80% Ethanolpräzipitat		Hefeextrakt LEIBER konzentriert (1:4 verd.) + Saccharose 6%	Hefeextrakt LEIBER 30% <sup>(3)</sup> (Jan.)
	Hefeextrakt LEIBER 1,1% hitzebehandelt		Hefeextrakt LEIBER konzentriert (1:4 verd.)	
			Pellet Hefeextrakt LEIBER konzentriert (1:4 verd.)	
<b>Saponine/ Fungizide</b>	Yuccasaponin 1,5% (v/v)	Yuccasaponin-extrakt 0,1%	Waschnuss-extrakt 0,1%	Waschnuss-extrakt 3%
	Primelwurzelttee 6% (v/v)	Kastanien-extrakt 0,1%	Waschnuss-extrakt 1%	Waschnuss-extrakt 3% <sup>(3)</sup> (Jan.)
	Seifenrindenbaumtee 6% (v/v)	Waschnuss-extrakt 0,1%	Aescin 0,1%	Kastanien-extrakt 3%
	Seifenkrautwurzelttee 6% (v/v)	Waschnuss-extrakt 0,1% + Kastanien-extrakt 0,1%	Aescin 1%	Kastanien-extrakt 3% <sup>(3)</sup> (Jan.)
		Aescin 0,1%	Waschnuss-extrakt 1% <sup>(2)</sup> (Nov., Dez.)	Aescin 3%
		Seifenkraut-extrakt 0,1%	Waschnuss-extrakt 1% <sup>(2)</sup> (Jan., Feb.)	Aescin 3% <sup>(3)</sup> (Jan.)
		Quillaja-saponin 1%	Aescin 1% <sup>(2)</sup> (Nov., Dez.)	
		Glycyrrhizinsäure 0,1%	Aescin 1% <sup>(2)</sup> (Jan., Feb.)	
			Waschnuss-extrakt 1% + Netzschwefel 1%	
			Netzschwefel 1%	
		Harnstoff 5%	Harnstoff 5%	Harnstoff 5%
<b>Antagonisten</b>			<i>Leptosphaeria</i> sp. <sup>(3)</sup> (Nov.)	<i>Pseudomonas synxantha</i> <sup>(3)</sup> (Dez.)
			<i>Leptosphaeria</i> sp. <sup>(3)</sup> (Nov.) + 4x Hefeextrakt LEIBER konzentriert (1:4 verd.)	<i>Sporidobolus pararoseus</i> <sup>(3)</sup> (Dez.)
				<i>Cystofilobasidium capitatum</i> <sup>(3)</sup> (Dez.)
				<i>Aureobasidium pullulans</i> <sup>(3)</sup> (Dez.)
				<i>Epicoccum nigrum</i> <sup>(3)</sup> (Dez.)

(1) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

(2) zwei Applikationstermine

(3) ein Applikationstermin

### 2.1.2. Herstellung der Nährstoff- und Vitaminpräparate

Die Präparate wurden in der angegebenen Konzentration (Tab. 2) in Reinstwasser gelöst. Bei einer geringen Löslichkeit wurde eine möglichst homogene Suspension hergestellt. Bis zur Applikation wurden Aliquots von 300 ml für die jeweilige Behandlung bei -20°C eingefroren (Whirl-Paks<sup>®</sup>, 500 ml, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe).

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 Zentrifugenbecher (250 ml) eingewogen und mit 200 ml 80% Ethanol für 1,5 h auf einem Magnetrührer extrahiert. Diese Suspension wurde für 10 min, bei 20°C und 15.300 x 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 vereinigt (ca. 1,6 l) und am Rotationsverdampfer unter mechanischem Vakuum (100 mbar, 40°C) eingeeengt. 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 Reinstwasser aufgenommen. Sie stellte das 80% Ethanolpräzipitat dar. Für die Herstellung der hitzebehandelten Nährstoffpräparate wurden jeweils 1 l TSB 9% bzw. LEIBER Hefeextrakt 1,1% für zwei Stunden gekocht und anschließend aliquotiert.

Die Präparation des konzentrierten LEIBER Hefeextraktes erfolgte, indem 600 g Hefeextrakt in 1 l Reinstwasser für 1 h auf einem Magnetrührer in Lösung gebracht wurden. Die homogene Suspension wurde 30 min bei 15.300 x g und 21°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und erneut 30 min zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde als konzentrierter Hefeextrakt verwendet. Die Pellets wurden zur Applikationsanwendung in Wasser gelöst. Zur Herstellung des Aminosäuregemisches wurden 18 Aminosäuren in der angegebenen Konzentration (Tab. 3) in Suspension gebracht.

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 Suspension gebracht. Für die Behandlungen 2012/13 wurde zusätzlich ein Vit-Mix mit einer niedrigeren Konzentration (1/1000) eingesetzt. Im Jahr 2012/13 wurde eine Behandlung mit Vit. B<sub>3</sub> 4,2% und eine Kombination aus Vit. B<sub>1</sub> (0,5%); B<sub>2</sub> (0,2%); B<sub>3</sub> (0,2%) ausgebracht. In 2013/14 wurde Vitamin B<sub>3</sub> als Einzelbehandlung in einer Konzentration von 0,42 und 0,042% verwendet

**Tab. 3:** Zusammensetzung Aminosäuregemisch

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

### 2.1.3. Pflanzenextrakte

#### 2.1.3.1. Tees und käufliche Saponinpräparate

Jeweils 20 g Primelwurzel (*Primula veris*), Seifenkrautwurzel (*Saponaria officinalis*) und Rinde vom Seifenrindenbaum (*Quillaja saponaria*) (Heinrich Klenk, Schwebheim) wurden in 200 ml Reinstwasser aufgeköcht und 10 min ziehen gelassen. Von diesen Tees wurden jeweils 6% (v/v) für die Falllaubbehandlung eingesetzt. Das Aescinpräparat ( $\geq 97,9\%$ ) (Euro OTC Pharma GmbH, Bönen), die Glycyrrhizinsäure ( $\geq 98\%$ ) (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe), das Yuccasaponin (aus *Yucca shidigera*, DeruNed Bv., Niederlande) und das Quillajasaponin (10-11%) (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) wurden wie in Tab. 2 angegeben verwendet.

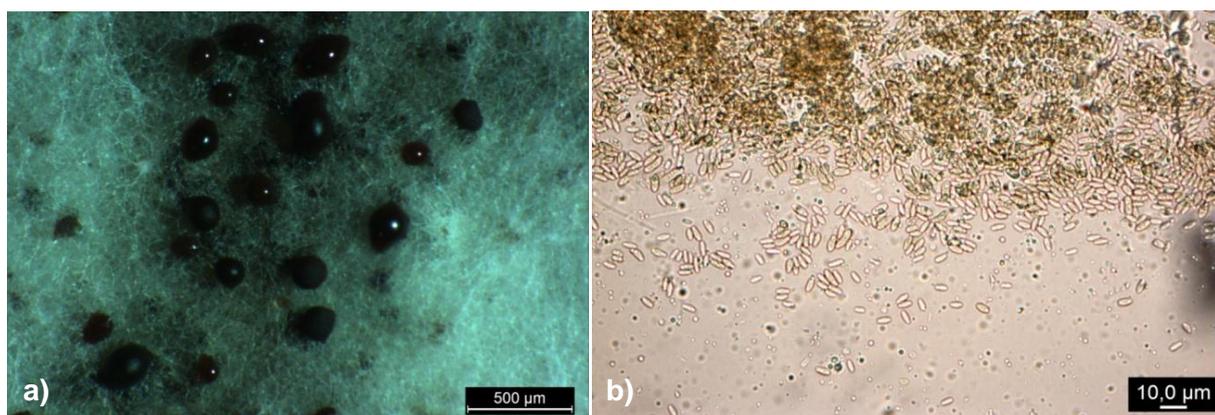
#### 2.1.3.2. Herstellung der Saponinextrakte

Aus dem Pericarp der indischen Waschnuss (*Sapindus mukorossi*) (Handelsvertretung für Naturprodukte, Leisnig), den frisch geernteten Samen (ohne Pericarp) der Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*), Seifenkrautwurzeln (*S. officinalis*) und dem o.g. flüssigen Yuccasaponin wurden nach einem modifizierten Protokoll von Saha et al. (2010) Saponine extrahiert. Das Pflanzenmaterial wurde mit einer Baumschere zerkleinert, eingefroren ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), für 2-3 d bei einer Kammertemperatur von etwa  $0^{\circ}\text{C}$  lyophilisiert (Hetosic CD8, Heto Lab Equipment, Birkerød, Dänemark) und anschließend mit einer Ultra-Zentrifugalmühle (ZM 200, Retsch, Siebgröße 6,0 mm) zu einem feinen Pulver gemahlen. Jeweils 50 g Pulver bzw. 50 ml Yuccasaponin wurden mit 100 ml n-Hexan zum Entfetten in einen Zentrifugenbecher (250 ml) gegeben und 30 min auf einem Horizontalschüttler (Rotationsfrequenz: 100/min; Radius 4,5 cm) geschüttelt. Nach der Zentrifugation ( $15.300 \times g$ , 30 min,  $20^{\circ}\text{C}$ , JA 14, Beckman Coulter) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit einem Spatel aufgelockert und 24 h unter dem Abzug im offenen Zentrifugenbecher getrocknet. Nach Zugabe von jeweils 100 ml Methanol wurde w.o. 10 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Überstände bzw. das Yuccasaponin wurden am Rotationsverdampfer

zu einem viskosen Sirup eingengt ( $\sim 40^{\circ}\text{C}$ , 130 mbar) und auf zwei Zentrifugenbecher aufgeteilt. Der Rundkolben wurde mit etwa 50 ml Reinstwasser gespült. Jeweils 25 ml „Waschflüssigkeit“ wurde in die Zentrifugenbecher mit dem eingengten Extrakt überführt. Anschließend wurden, um eine Füllmenge von 200 ml zu erreichen, je 50 ml Reinstwasser und 100 ml n-Butanol zugegeben. Die Emulsion wurde 10 min geschüttelt und im Anschluss zentrifugiert. Die Butanolphase wurde abgenommen und am Rotationsverdampfer ( $\sim 65^{\circ}\text{C}$ , 130 mbar) zu einer viskosen Flüssigkeit eingengt. Diese wurde in einem Zentrifugenbecher mit 200 ml Aceton gemischt. Nach 10-minütigem Schütteln und erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand abdekantiert und verworfen. Das honigartige Pellet wurde eingefroren ( $80^{\circ}\text{C}$ ), lyophilisiert und im Mörser zu einem feinen Pulver gemahlen.

#### 2.1.4. Applikation potenzieller Antagonisten

Vom Falllaub wurden im Jahr 2011/12 Mikroorganismen isoliert und über die Sequenzierung ihrer ITS rDNA oder mit MALDI-TOF identifiziert. Von *Leptosphaeria* sp. wurden Einsporenisolate auf PDA-Platten (Potato Dextrose Agar) angelegt. Diese wurden bei  $20^{\circ}\text{C}$  im Klimaschrank (RUMED<sup>®</sup>, Rubarth Apparate GmbH, Laatzen) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von etwa zwei Monaten begann der Pilz zu sporulieren (Abb. 4 a + b). Die Sporen wurden mit einigen Tropfen Reinstwasser abgewaschen und mikroskopisch ausgezählt. *Leptosphaeria* sp. wurde am 21.11.2012 mit  $8 \cdot 10^4$  Sporen/100 ml auf das Falllaub appliziert. Die Keimfähigkeit der Sporen wurde durch Ausplattieren der Sporensuspension (100  $\mu\text{l}$ ) auf PDA überprüft. Nach einer dreitägigen Inkubationszeit bei  $20^{\circ}\text{C}$  im Klimaschrank wurde die Keimung der Sporen bzw. das Mycelwachstum dokumentiert. In einer zweiten Variante wurde das Falllaubdepot mit der Sporensuspension und zusätzlich an allen vier Behandlungsterminen mit der 1:4 verdünnten Präparation der LEIBER Hefe behandelt.



**Abb. 4:** Pyknidien (a) und Sporen (b) von *Leptosphaeria* sp.

Von dem Bakterium *Pseudomonas synxantha* und den beiden Hefeisolaten *Sporidobolus pararoseus* und *Cystofilobasidium capitatum* wurden je zwei Übernacht-Kulturen angelegt. Ein 250 ml Erlenmeyerkolben wurde mit jeweils 50 ml TSB für die Bakterien- bzw. PDB (Potato Dextrose Broth) für die Hefeisolate (Tab. 4)

befüllt. Mit einer Impföse wurde von einer Agarplatte (s. 2.3.1.) etwas Zellmaterial einer 24 h alten Bakterien/Hefekolonie abgenommen und das sterile Nährmedium angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht auf einem Horizontalschüttler (Rotationsfrequenz: 140/min; Radius 5 cm) bei 26°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde am Photometer (Specord 200, Analytik Jena) die OD<sub>600</sub> bestimmt und mittels Verdünnung auf einen Wert von 1,0 eingestellt. Als Referenz wurde TSB/PDB verwendet. Von jedem Isolat wurden 100 ml Übernachtskultur für 10 min bei 2.540 x g (GH 3.7., Beckman GPR Centrifuge) und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Das Pellet wurde in 100 ml Reinstwasser aufgenommen. Von *Aureobasidium pullulans* und *Epicoccum nigrum* wurden je zwei Flüssigkulturen angelegt (s. 2.3.2.) und für 42 d bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Die Mycelien wurden durch Miracloth (Calbiochem) abgetrennt und mit einem Skalpell in kleine Würfel (ca. 0,5 x 0,5 cm) geschnitten. Die Mycelbruchstücke wurden am 10.12.2013 gleichmäßig auf dem Falllaub verstreut.

## 2.2. Bestimmung des Ascosporenpotenzials und makroskopischer Zustand der Blätter

Mit Beginn der Ascosporenreife (Ende März/Anfang April) wurden wöchentlich Blattproben aus den Falllaubdepots entnommen, um das Ascosporenpotenzial mit der Wasserbadmethode (Kollar, 1998) zu bestimmen. Die Blätter wurden über Nacht getrocknet und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Je ein Gramm Blattaliquot wurde in 50 ml Reinstwasser gegeben 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) pipettiert. Nach 10-minütigem Absetzen lassen konnten die Ascosporen mikroskopisch ausgezählt werden (Abb. 5). Die Sporensuspension jeder Probe wurde zweimal gezählt und der Mittelwert für die Auswertung verwendet. Bei weniger als 20 Ascosporen pro Einzelquadrat wurden 30 Kästchen der Kolkwitz Zählkammer ausgezählt, bei einem höheren Sporenpotenzial 20 Kästchen. Für Proben, in denen mehr als 100 Ascosporen in einem Einzelquadrat lagen, wurden 10 Kästchen gezählt.



**Abb. 5:** Ascosporen von *V. inaequalis*, Vergrößerung: 125 fach

Das wöchentliche Ascosporenpotenzial der jeweiligen Falllaubdepots wurde kumulativ aufsummiert und die Hemmung der Ascosporenfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle berechnet. Der pH-Wert der abgewaschenen Sporensuspension wurde gemessen und der Zersetzungsgrad der behandelten Blätter in unregelmäßigen Abständen von Ende Januar bis Mitte April ermittelt und fotografisch dokumentiert.

## 2.3. Medien und Kulturverfahren

### 2.3.1. Kultivierung der Mikroben auf Agar

Als Standardmedium für die Kultivierung von Pilzen und Hefen wurde Potato Dextrose Agar (PDA) verwendet, für die Kultivierung von Bakterien Tryptic Soy Agar (TSA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) (Tab. 4). Zur Isolierung von Actinomyceten wurde als Selektivmedium ein Actinomyceten Agar (Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim) (Tab. 4) eingesetzt. Alle Agarplatten wurden bei RT gelagert. Beimpfte Platten wurden bei 10 oder 20°C im Klimaschrank (RUMED®, Rubarth Apparate GmbH, Laatzen) inkubiert.

**Tab. 4:** Zusammensetzung der verwendeten Medien zur Kultivierung von Mikroorganismen

<b>Tryptic Soy Broth (TSB) (40 g/l)</b>	
Caseinpeptone, pankreatisch verdaut	15,0 g/l
Sojapepton, Papainverdau	5,0 g/l
Natriumchlorid	5,0 g/l
Dikaliumhydrogenphosphat	2,5 g/l
Glucose	2,5 g/l
pH-Wert	7,2 ± 0,1

\* TSA zusätzlich mit 15 g/l Agar

<b>Actinomyceten Agar (22 g/l)</b>	
Natriumcaseinat	2,0 g/l
L-Asparagin	0,1 g/l
Natriumpropionat	4,0 g/l
Dikaliumphosphat	0,5 g/l
Magnesiumsulfat	0,1 g/l
Eisensulfat	0,001 g/l
Agar	15 g/l
pH-Wert	8,1 ± 0,2

<b>Potato Dextrose Broth (PDB) (24 g/l)</b>	
Kartoffel-Extrakt	4 g/l
Glucose	20 g/l
Agar	15 g/l
pH-Wert	5,6 ± 0,2

\* PDA (39 g/l) zusätzlich mit 15 g/l Agar

### 2.3.2. Kultivierung der Mikroben in Flüssigkultur

Flüssigkulturen der Pilzisolat wurden angelegt, indem ein Mycelstück einer 14 d alten Kultur auf Agarplatte mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 0,8 cm) ausgestochen und steril in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt wurde. Der Erlenmeyerkolben war mit 50 ml autoklaviertem PDB (Tab. 4) befüllt. Die angeimpften Flüssigkulturen wurden bei 20°C im Klimaschrank inkubiert.

Für die Flüssigkulturen der Bakterien und Hefen wurden Erlenmeyerkolben (250 ml) verwendet, die jeweils mit 50 ml TSB/PDB befüllt (Tab. 4) waren. Mit einer Impföse wurde etwas Zellmaterial einer 24 h alten Bakterien- /Hefekolonie abgenommen und das sterile Nährmedium angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht auf einem Horizontalschüttler (Rotationsfrequenz: 140/min; Radius 5 cm) bei 26°C inkubiert.

### **2.3.3. *V. inaequalis*-Isolat**

Das in dieser Arbeit eingesetzte Isolat von *V. inaequalis* (V1), aus der Stammsammlung der Mykologie (Julius Kühn-Institut, Dossenheim), wurde ursprünglich als Einsporenisolat aus einer Blattläsion von 'Golden Delicious' gewonnen (Kollar, 1994). Das Isolat wurde auf PDA bei 20°C kultiviert. Alle vier Wochen wurde von dieser Kultur ein Mycelstück mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 0,8 cm) ausgestanzt und auf eine neue PDA Platte überführt.

## **2.4. Bestimmung der mikrobiellen Aktivität**

Im Winter und Frühjahr des jeweiligen Versuchsjahres wurden Blattproben aus den Falllaubdepots entnommen. Die Blätter wurden über Nacht getrocknet und bis zu ihrer späteren Analyse bei -20°C eingefroren.

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

Die Quantifizierung der Bakterien und Pilze auf den behandelten Blättern erfolgte mit 1 g Blattmaterial aus dem jeweiligen Falllaubdepot. Das Blattmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff gemörsert und in 100 ml Reinstwasser aufgenommen. Die Suspension wurde für 15 min auf dem Horizontalschüttler geschwenkt (Rotationsfrequenz: 100/min; Radius 4,5 cm). Ausgehend von dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe bis zu einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  angelegt. Jeweils 100 µl der entsprechenden Verdünnung wurden auf TSA, PDA und Actinomycetenagar mit einem Drigalskispatel ausplattiert. Den Agaransätzen wurden zusätzlich Antibiotika zugegeben, um einerseits mit Cycloheximid (0,4 g/l) das Wachstum von Pilzen und andererseits mit Chloramphenicol (0,4 g/l) das Wachstum von Bakterien zu unterdrücken. Nach einer dreitägigen Inkubationszeit bei 10 bzw. 20°C (KBK/LS 4330, Ehret GmbH & Co KG, Tulln; RUMED<sup>®</sup>, Rubarth Apparate GmbH, Laatzen) konnten die Kolonien auf den Agarplatten ausgezählt werden. Die CFUs je Gram Falllaub wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{CFU/1g TG Falllaub} = \text{Kolonienzahl} * \text{Verdünnung} * 1000$$

### **2.4.2. Biologischer Sauerstoffbedarf (BSB)**

Als Parameter für die mikrobielle Aktivität wurde der biologische Sauerstoffbedarf der behandelten Blätter ermittelt. Jeweils 1 g Blattmaterial wurde mit 10 ml Reinstwasser in ein Oxi-Top Messgerät (WTW, Weilheim) gegeben. Das Messgerät bestand aus

einer Glasflasche und einem Messkopf. In den Gummiköcher des Messkopfes wurden zwei NaOH-Plätzchen zur Bindung des freigesetzten CO<sub>2</sub> gegeben. Der dadurch entstehende Unterdruck in der Flasche wurde manometrisch vom Messkopf detektiert. Die Flaschen wurden bei einer konstanten Temperatur von 20°C inkubiert (RUMED®, Rubarth Apparate GmbH, Laatzen). Der BSB (mg/ml) wurde im 24 h Rhythmus über einen Zeitraum von fünf Tagen gemessen. Am Ende der Inkubationsperiode konnten die automatisch aufgezeichneten Werte am Messkopf abgelesen werden.

Im Versuchsjahr 2011/12 wurden jeweils 0,5 g Blattmaterial mit 5 ml Wasser pro Messflasche verwendet. Für jede Falllaubprobe wurde der BSB von zwei Versuchsansätzen gemessen. In einem Ansatz wurden 50 µl Cycloheximid (0,4 g/l), im anderen 50 µl Chloramphenicol (0,4 g/l) hinzugefügt, um eine Differenzierung zwischen dem Sauerstoffbedarf der Bakterien und dem der Pilze zu erhalten. Die gemessenen BSB<sub>5</sub>-Werte wurden mit dem der Kontrolle verglichen.

## **2.5. Isolierung von Mikroorganismen**

### **2.5.1. Bakterien und Hefen**

Von den Agarplatten der CFUs (s. 2.4.1.) (08.03.2011/ 23.02.2012) wurden morphologisch unterschiedliche Kolonien isoliert. Mit einer Impföse wurde Zellmaterial der gewachsenen Bakterien-, Actinomyceten- und Hefekolonien abgenommen und auf frischen TSA, PDA oder Actinomycetenagar-Platten ausgestrichen. Die angeimpften Platten wurden für 48 h bei 10 und 20°C im Klimaschrank inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden durch Reinheitsausstriche vereinzelt. Für jedes Isolat wurden die Ausstriche mindestens dreimal wiederholt, um sicher zu stellen, dass es sich um Reinkulturen handelt. Die isolierten Mikroorganismen wurden zur mittelfristigen Stammkonservierung bei 4°C gelagert (Kühlraum) und alle vier Wochen auf neue Agarplatten überführt.

### **2.5.2. Fadenpilze**

Einzelne, kolonieförmig gewachsene Mycelien auf den CFU-Platten wurden mit dem Korkbohrer an ihrem Rand ausgestanzt und auf eine neue PDA Platte überführt. Die Platten wurden bei 10 oder 20°C im Klimaschrank inkubiert. Nach drei (20°C) bzw. sechs Tagen (10°C) Wachstum wurde von den Kolonien erneut ein kreisrundes Mycelstück am Wachstumsrand ausgestanzt und auf eine frische PDA-Platte aufgebracht. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Pilzisolat wurden bei 4°C im Kühlraum gelagert und alle vier Wochen auf neue PDA-Platten überführt.

### 2.5.3. Stammkonservierung

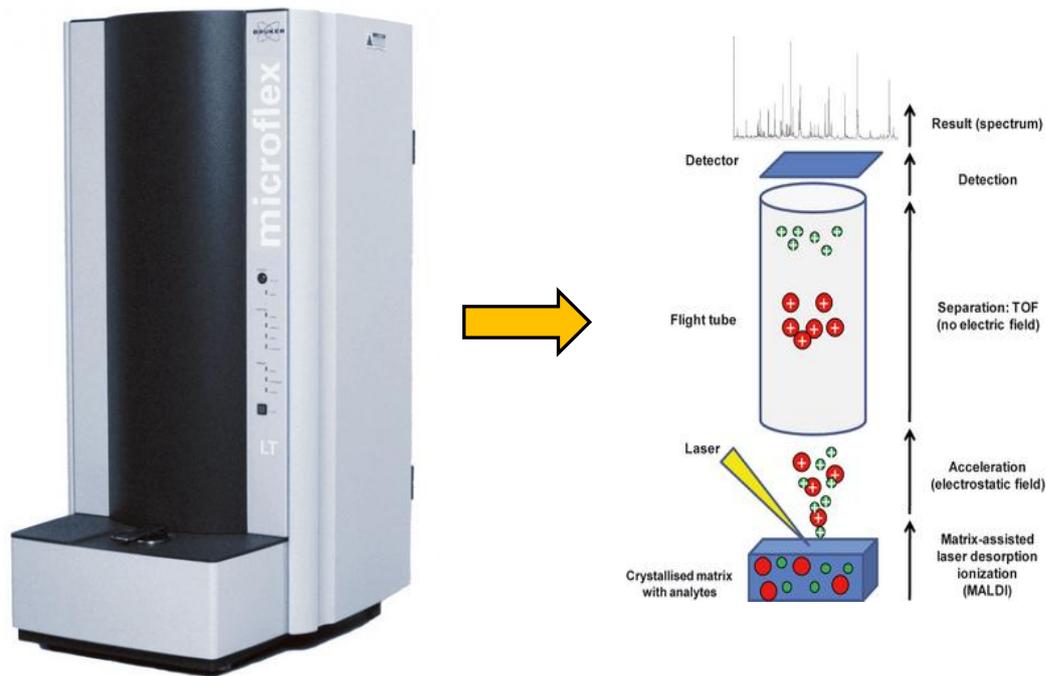
Für die langfristige Stammkonservierung der isolierten Hefen und Bakterien wurde mit einer Impföse etwas Zellmaterial von den Kolonien auf Agarplatte abgenommen. Mit dem Zellmaterial wurde 5 ml TSB (Bakterien) oder 5 ml PDB (Hefen) in einem 15 ml Falconröhrchen (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) angeimpft. Die Röhrchen wurden auf einem Horizontalschüttler (Rotationsfrequenz: 140/min; Radius 5cm), bei einer Temperatur von 26°C, über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden 800 µl der entsprechenden Bakterien-/ Hefesuspension (Mitte-Ende log. Phase) mit 200 µl Glycerinlösung (50%, v/v) steril in ein 2 ml Kryoröhrchen (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) pipettiert und mittels vortexen gut gemischt. Die Röhrchen wurden zunächst für 1 h bei 4°C inkubiert und dann eine weitere Stunde bei -20°C. Die Dauerlagerung erfolgte bei -80°C. Für jedes Isolat wurden zwei Stammkonserven angelegt. Die Vitalität der Neuisolate wurde eine Woche und einen Monat nach der Konservierung geprüft. Dazu erfolgte ein Ausstrich der noch gefrorenen Zellsuspension auf einer TSA bzw. PDA Platte.

Zur Stammkonservierung der Pilze wurden mit einem Korkbohrer (Durchmesser 0,8 cm) kreisrunde Mycelstücke aus den Kolonien (14 d) auf Agarplatte ausgestochen. Die Mycelstücke wurden in 2 ml Kryoröhrchen überführt und bei -80°C dauerhaft konserviert.

## 2.6. Identifizierung der Pilz- und Bakterienisolate

### 2.6.1. MALDI-TOF

Die Identifizierung der Bakterien- und Pilzisolat e erfolgte mit MALDI-TOF (matrix assistend laser-desorption/ionisation (MALDI) and time of flight (TOF)) und wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Heidelberg durchgeführt. Bei der MALDI-TOF Analyse werden aufgeschlossene Zellen von Mikroorganismen auf eine Probenplatte pipettiert und mit einer Matrix überschichtet (s. 2.6.1.1.; 2.6.1.2.). Die Proben-Platte wird in das MALDI-TOF-MS-Gerät eingeführt und im Hochvakuum mit einem fokussierten Laserstrahl beschossen (Abb. 6). Dadurch kommt es zum explosionsartigen Verdampfen der Matrix mit den Bestandteilen der eingebetteten Mikroorganismen. Gleichzeitig findet eine Ionisierung der Analytmoleküle (Proteine) statt. Die Ionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und die Flugzeit der Analytmoleküle bis zu einem Ionendetektor wird gemessen. Aus der resultierenden Flugzeit lassen sich die Massen der einzelnen Proteine bestimmen, die ein Gesamtspektrum liefern, welches für jeden Mikroorganismus einzigartig ist (molekularer Fingerabdruck).



**Abb. 6:** Aufbau des MALDI- Biotyps (Bruker Daltronics), Bildquelle: Croxatto et al., 2012

### 2.6.1.1. Zellaufschluss bei Bakterien und Hefen

Für den Zellaufschluss bei Bakterien und Hefen wurden 5 ml Über-Nacht-Kulturen in TSB oder PDB Medium angelegt (s. 2.5.3.). Je 1 ml Über-Nacht-Kultur wurden am folgenden Tag in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für 7 min bei  $16.060 \times g$  und  $20^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert (Fresco Biofuge, PP 4/97 #3324, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml sterilem Reinstwasser aufgenommen. Die Probe wurde zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurden 0,8 ml Ethanol absolut und 0,3 ml steriles Reinstwasser hinzugefügt. Die Probe wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet unter der Sterilbank getrocknet. Danach wurden  $20 \mu\text{l}$  Ameisensäure (70%) hinzugefügt. Die Probe wurde für 30 min zentrifugiert. Im Anschluss wurden zur Gesamtprobe (inklusive Überstand)  $20 \mu\text{l}$  Acetonitril dazu pipettiert. Es folgte ein erneuter 30-minütiger Zentrifugationsschritt. Der so erhaltene Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, in ein 0,2 ml PCR-Tube überführt und bis zur Analyse bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.6.1.2. Zellaufschluss bei Fadenpilzen

Für den Zellaufschluss bei den Pilzen wurde ein kleines Mycelstück der Isolate steril mit einer Impföse abgenommen und in ein 15 ml Falconröhrchen mit 5 ml PDB überführt. Die Röhrchen wurden horizontal auf einem Schüttler fixiert (Rotationsfrequenz: 140 U/min, Radius: 5 cm) und über Nacht bei  $26^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

Etwa 1,5 ml Mycelsuspension wurden am folgenden Tag in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert. Die Proben wurden 2 min bei 16.060 x g und 20°C zentrifugiert (Fresco Biofuge, PP 4/97 #3324, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde abpipettiert und 1 ml steriles Reinstwasser zum Pellet hinzugefügt. Die Proben wurden gevortext, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde das Pellet in 300 µl Reinstwasser und 900 µl Ethanol aufgenommen. Nach erneutem vortexen, zentrifugieren und dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet mit der SpeedVac (Savant, Bachhofer, Reutlingen) getrocknet. Je nach Pelletgröße wurden bis zur vollständigen Bedeckung des Pellets 10 bis 100 µl Ameisensäure und die gleiche Menge Acetonitril hinzugegeben. Die Proben wurden 2 min zentrifugiert, der erhaltene Überstand abgenommen, in ein 0,2 ml PCR-Tube überführt und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

### **2.6.1.3. Messung der Proteinmassenspektren**

Jeweils 1 µl des Aufschlusspräparates wurde auf eine MALDI-Probenplatte (Targetplatte) mit 96 Targetplätzen pipettiert. Die getrockneten Proben wurden mit 1 µl Dihydroxybenzoesäure (Matrix) überschichtet. Nach dem Trocknen der Matrix wurde die Targetplatte in das MALDI-TOF-MS-Gerät (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics, Bremen) eingeführt. Es folgte die Analyse der Proben, wobei die Gesamtspektren der Proteine für das jeweilige Isolat gemessen wurden. Jedes Isolat wurde dabei mindestens zweimal, bei Spektren, die in der ersten Analyse keine Identifizierung des Isolates ermöglichten, viermal gemessen.

### **2.6.1.4. Auswertung der Proteinmassenspektren mit der Bruker Software**

Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Bruker Biotyper 2.0. Software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). 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. Für die Identifizierung der Mikroorganismen wurden dabei die vom Hersteller angegebenen Kriterien berücksichtigt. Die Identifizierung bis auf Artniveau war bei einem sehr hohen Score Value von 2.300-3.000 möglich. Bei einem Score Value von 2.000-2.299 handelte es sich bei dem von der Referenzdatenbank angegebenen Mikroorganismus mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit um die richtige Gattung und möglicherweise auch um die richtig identifizierte Art. In diesem Fall wurde zusätzlich ein Vergleich mit den Spektren anderer Isolate durchgeführt, die dieser Art mit hoher Wahrscheinlichkeit zugeordnet werden konnten. Bei einem Score Value von 1.700-1.999 konnte nur von der Zuordnung der richtigen Gattung ausgegangen werden, bei einem Score Value von 0.000-1.699 war keine Identifizierung des Isolates möglich. 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 Proteinmassenspektren auf und wurden in Komplexen zusammengefasst.

## 2.6.2. Sequenzierung der ITS rDNA

Von den mit MADI-TOF identifizierten Pilz-Gruppen wurden jeweils ein bzw. zwei Isolate ausgewählt und durch die Sequenzierung ihrer ITS rDNA bestimmt.

### 2.6.2.1. Puffer und Lösungen

Für die DNA-Extraktion wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

#### Tris-EDTA Puffer (TE-Puffer):

1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0) und 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) wurden mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt und in Lösung gebracht.

#### Xanthogenat-Natriumdodecyl-Puffer (XS-Puffer):

10 ml einer 1 M Tris-HCL-Lösung (pH 7,4), 4 ml einer 0,5 M EDTA Lösung (pH 8), 1 g Natriumdodecylsulfat (SDS) und 6,16 g von 800 mM Ammoniumacetat wurden mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt und in Lösung gebracht. Diese Lösung wurde anschließend in der Mikrowelle leicht erhitzt, um das SDS vollständig zu lösen. Das Xanthogenat (1g) (Fluka, Buchs, Schweiz) wurde erst kurz vor der Verwendung des Puffers hinzugefügt.

#### Tris-Acetat-Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer):

242 g Tris, 57,1 ml reine Essigsäure und 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) wurden mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt und in Lösung gebracht. Der pH-Wert wurde auf 8,3 eingestellt.

### 2.6.2.2. DNA Extraktion mit Xanthogenat

Die DNA-Extraktion erfolgte nach dem Protokoll von Tillett & Neilan (2000). Um eine ausreichende Menge an frischem Mycel zur Verfügung zu haben, wurden Flüssigkulturen der einzelnen Pilzisolat angelegt (s. 2.3.2.) und bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Nach 7 d wurde der Kulturüberstand durch Miracloth abfiltriert und das Mycel in ein steriles 15 ml Falconröhrchen überführt. Dieses wurde an der Öffnung mit zuvor autoklavierter Watte steril verschlossen. Die Proben wurden eingefroren (-20°C) und 3 d lyophilisiert. Das getrocknete Pilzgewebe wurde mit flüssigem Stickstoff, in einem sterilen Mörser, zu einem feinen Pulver gemahlen. Das Pulver wurde in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es wurden 50 µl kalter TE-Puffer und 750 µl XS-Puffer zugefügt. Die Probe wurde 1 h bei 70°C inkubiert und zwischendurch gevortext. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. Die gekühlte Probe wurde für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand (ca. 600-700 µl) wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde

mit dem gleichen Volumen an Isopropanol (80%, 4°C) ausgefällt und durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt pelletiert. Das Pellet wurde mit 250 µl kaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (w.o.). Der Ethanolüberstand wurde abdekantiert, das Pellet bei 30°C getrocknet und anschließend in 100 µl TE-Puffer aufgenommen.

### 2.6.2.3. Nachweis der DNA-Extraktion durch Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der erfolgreichen DNA-Extraktion wurde eine Gelelektrophorese auf Agaroseflachbettgelen (7 x 10 cm) durchgeführt. Für die Herstellung des Gels wurden 30 ml 0,8% Agarose in der Mikrowelle aufgekocht. Zur Färbung der DNA wurden dieser Suspension 4,5 µl Serva DNA Stain Clear G zugegeben. Je 2,5 µl Ladepuffer wurden zusammen mit 5 µl Reinstwasser und 1 µl-DNA-Template in die Geltasche pipettiert. Für jedes Isolat wurde dabei auch eine 1:100 Verdünnung der Probe sowie grundsätzlich eine Positiv- (verdünnte Probe einer erfolgreichen Extraktion) und eine Negativ-Kontrolle (Reinstwasser) aufgetragen. Als Größenmarker fand ein 100 bp DNA-Leiter (Peqlab, Erlangen) Verwendung. Der Lauf fand bei einer konstanten Spannung von 110 V für 20 min statt. Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert (Camag Reprostar 3 Imaging System, Switzerland) und der Erfolg der DNA-Extraktion bewertet.

### 2.6.2.4. Amplifikation der ITS rDNA

Im Anschluss an die DNA-Extraktion wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, um ausgewählte Abschnitte der ITS rDNA zu amplifizieren. Vorbereitend für die PCR wurden 900 µl TE-Puffer mit 100 µl Probe aus der DNA-Extraktion (Pelletüberstand) verdünnt. Eine 1:10 und eine 1:100 Verdünnung dieser Probe wurden vorbereitet. Jeweils 19 µl Mastermix (Tab. 5) (INNUSPEED soil - DNA kit (ITS 5/4), Analytik Jena) wurden zusammen mit 1 µl Template in ein PCR-Tube pipettiert.

**Tab. 5:** Mastermixansatz für die PCR

<b>Mastermix</b>	<b>Probenansatz</b>
Polymerase	0,2 µl
dNTP	0,2 µl
P1 (ITS 5)	0,5 µl
P2 (ITS 4)	0,5 µl
Puffer	4,0 µl
Reinstwasser	13,6 µl
<b>gesamte Menge:</b>	<b>19,0 µl</b>

Die Proben sowie eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle wurden kurz zentrifugiert. Die Reaktionsansätze wurden in den Thermocycler (AB 2720 Thermal Cycler) gestellt und für 5 min bei 98°C denaturiert. Danach folgte der eigentliche Zyklus mit einem weiteren Denaturierungsschritt für 20 s bei 95°C. Es folgte ein Hybridisierungsschritt (Primerannealing) für 15 s bei 53°C und ein

Polymerisationsschritt für 20 s bei 72°C. Dieser Zyklus wurde 25 x wiederholt. Nach Vollendung aller Zyklen wurden die Reaktionsansätze im Thermocycler auf 8°C abgekühlt. Zur Überprüfung wurden 5 µl des PCR-Produktes auf ein Agarosegel (s.2.6.2.3.) aufgetragen.

### 2.6.2.5. Aufreinigung und Sequenzierung des ITS-Amplifikates

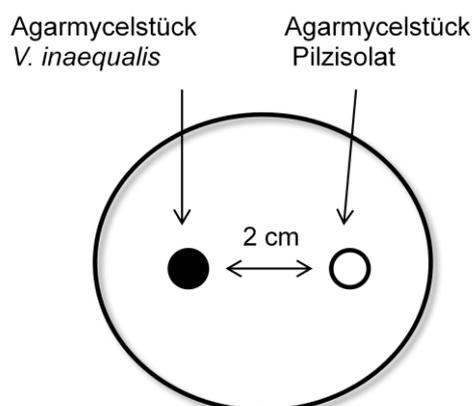
Die Aufreinigung der ITS-Amplifikate erfolgte mit dem Quia Quick PCR Purification Kit von Qiagen nach den Vorschriften des Herstellers. Nach Bestimmung der DNA-Konzentration am Nanodrop 200c Spectrometer (Peqlab, Erlangen) wurde die entsprechende Probenmenge zusammen mit je 1 µl Sequenzierungs-Primer eingeschickt (SEQLAB, Göttingen). Die erhaltene Sequenz wurde mit dem Programm BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ausgewertet.

## 2.7. Fungizides Potenzial der Bakterien- und Pilzisolat

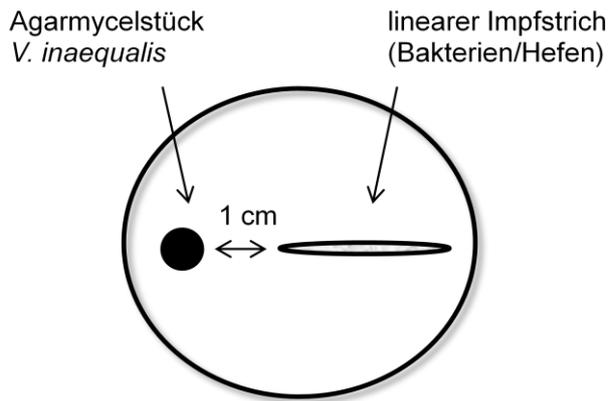
### 2.7.1. Dualkultur-Testsystem auf Agar

Das antagonistische Potenzial der 2011 und 2012 vom Falllaub isolierten Mikroorganismen wurde in einem Dualkultur-Testsystem untersucht. Zur Überprüfung der Hemmwirkung der Hefe-, Bakterien- sowie der filamentösen Pilzisolat wurde mit dem Korkbohrer ein Mycelstück einer 14 d alten Kultur von *V. inaequalis* ausgestanzt und auf eine PDA oder TSA-Platte übertragen. Im Abstand von 2 cm wurde jeweils das Mycelstück eines Pilzisolates platziert (Abb. 7) oder Zellmaterial einer 24 h alten Hefe-/Bakterienkolonie, mit einem geraden Impfstrich (Abstand: 1 cm), ausgestrichen (Abb. 8).

Die beimpften Platten wurden bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Nach 21 d wurde der Radius der Apfelschorfmycelien an der Achse der aufeinandertreffenden Pilzmycelien und/oder Hefe-/Bakterienkolonien gemessen. Die hemmende Wirkung der Mikroorganismen auf das Wachstum von *V. inaequalis* wurde durch den Vergleich mit einer Kontrollplatte prozentual berechnet.



**Abb. 7:** Dualkultur Test mit *V. inaequalis* und filamentösen Pilzen



**Abb. 8:** Dualkultur Test mit *V. inaequalis* und Bakterien/Hefen

### 2.7.2. Hemmtests mit Kulturfiltraten potenzieller Antagonisten

Für Pilzisolat, die in den Dualkultur Tests eine stark hemmende Wirkung aufwiesen, wurden Hemmtests in Flüssigkultur (s. 2.3.2.) angelegt. Die Flüssigkulturen wurden für 35 d bei 20°C im Klimaschrank inkubiert (RUMED®, Rubarth Apparate GmbH, Laatzen). Anschließend wurden die Kulturüberstände (10 ml) lyophilisiert und in 1 ml Reinstwasser aufgenommen. Die eingeeengten Überstände wurden in ein mit 9 ml PDB befülltes Falconröhrchen (15 ml) filtriert (0,2 µm) und mit dem Mycelstück (Durchmesser 0,8 cm) einer 14 d alten V1-Kolonie angeimpft.

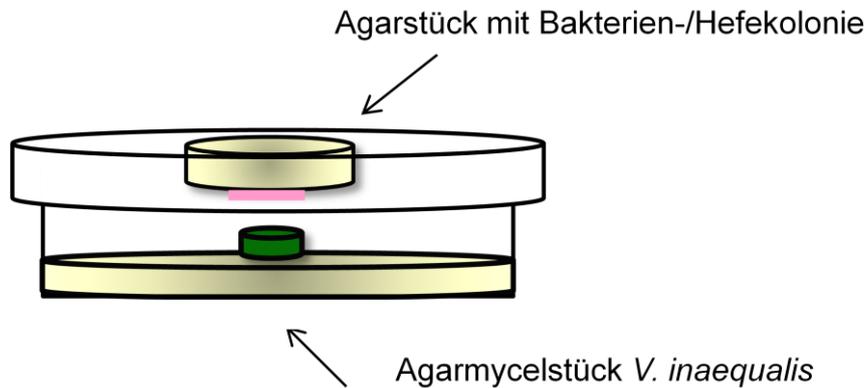
Für die Bakterien- und Hefeisolate wurden in einem 50 ml Erlenmeyerkolben 10 ml Über-Nacht-Kulturen angelegt (s. 2.3.2.). Die angeimpften Kolben wurden bei einer Temperatur von 26°C auf einem Schüttler (Rotationsfrequenz 140 U/min, Radius: 5 cm) inkubiert. Am folgenden Tag wurde am Photometer (Specord 200, Analytik Jena) die OD<sub>600</sub> bestimmt und mittels Verdünnung auf einen Wert von 1,0 eingestellt. Als Referenz wurde TSB/PDB verwendet. Das Kulturfiltrat wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und mit einem Mycelstück von *V. inaequalis* angeimpft. Als Kontrolle diente ein mit 10 ml TSB/PDB befülltes Falconröhrchen, welches ebenfalls mit *V. inaequalis* angeimpft wurde.

Alle Falconröhrchen wurden bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Nach 21 d Tagen wurde das Wachstum der Schorfmycelien im Vergleich zur Kontrolle dokumentiert. Kulturfiltrate, die das Wachstum von *V. inaequalis* vollständig inhibierten, wurden als hemmend bewertet.

### 2.7.3. Hemmtest auf volatile Substanzen

Für alle hemmenden Bakterien- und Hefeisolate wurde überprüft, ob es sich bei den freigesetzten Hemmstoffen um volatile Substanzen handelt. Mit dem Korkbohrer wurden Mycelstücke (Durchmesser: 0,8 cm) einer 14 d alten Kultur von *V. inaequalis* ausgestanzt und mittig auf eine PDA-Platten gesetzt. Auf die untere Seite des Petrischalen-Deckels wurde ein kreisrundes Agarstück (Durchmesser: 2,4 cm) einer

PDA- oder TSA-Platte übertragen. Das Agarstück wurde mit Zellmaterial einer 24 h alten Kolonie angeimpft. Die Bakterienisolate wurden auf TSA, die Hefeisolate auf PDA-Agarstücken ausgestrichen (Abb. 9). Für alle Isolate wurde der Test dreimal wiederholt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und für 21 d bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Zur Auswertung des Hemmtestes wurde der Durchmesser der Schorfmycelien herangezogen und mit dem einer Kontrollplatte verglichen.



**Abb. 9:** Hemmtest auf volatile Substanzen mit *V. inaequalis* und Bakterien/Hefeisolaten

#### 2.7.4. Pilzlicher Antagonist *Leptosphaeria* sp.

Für den von TSB 9% behandeltem Falllaub isolierten Antagonisten *Leptosphaeria* sp. wurden Hemmtests in Dual- und Flüssigkultur angelegt (s. 2.7.1.; 2.7.2.) Bei den Tests in Dualkultur wurde das antagonistische Potenzial von *Leptosphaeria* sp. gegen V1 auf PDA sowie auf Blätteragar als Minimalmedium (1 g Falllaub/100 ml Reinstwasser/15 g Agar) untersucht. Für die Hemmtests in Flüssigkultur (PDB, Blättermedium) wurden die Kulturfiltrate durch lyophilisieren 10-fach aufkonzentriert. Je 1 ml eingeeengtes Kulturfiltrat wurde mit 9 ml PDB oder Blättermedium in ein Falconröhrchen pipettiert und mit einem Mycelstück von *V. inaequalis* angeimpft. Die hemmende Wirkung der Kulturüberstände wurde wöchentlich, über einen Zeitraum von 28 d, untersucht.

Die Temperaturtoleranz für das Wachstum wurde bestimmt, indem mit *Leptosphaeria* sp. beimpfte PDA und Blätteragar-Platten bei Temperaturen von 0°C (auf Eis), 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C und 35°C (RUMED<sup>®</sup>, Rubarth Apparate GmbH, Laatzten; KBK/LS 4330, Ehret GmbH & Co KG, Tulln) sowie im Freiland (18.12.2012.-07.01.2013) bei einer durchschnittlichen Temperatur von 8°C inkubiert wurden. Der Durchmesser der Schorfmycelien wurde nach 21 d gemessen.

### 2.7.5. Fungizide Wirkung von Vitaminen

Die Vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> und B<sub>6</sub> sowie eine Kombination der vier Einzelvitamine wurden wie in Tab. 6 angegeben in Suspension gebracht. Der pH-Wert wurde durch Zusatz von NaOH- oder HCL-Lösung auf 7,0 eingestellt. Die Vitaminsuspensionen wurden unter Zusatz von Agar (1,5 g/100 ml) autoklaviert und jeweils 8 ml wurden in die Kavität einer 6er Microwell-Platte (Greiner bio-one, Cellstar®) gefüllt. Die Kavitäten wurde mit dem Mycelstück einer 14 d alten V1-Kolonie beimpft und bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Für jede Vitaminkonzentration wurden 3 Parallelen angelegt. Die Auswertung des Wachstumstests erfolgte nach 14 d.

**Tab. 6:** Vitaminkonzentrationen im Hemmtest gegen *V. inaequalis*

Vitamin	Konzentration [ppm]			
B <sub>1</sub>	5.000	500	50	5
B <sub>2</sub>	2.000	200	20	2
B <sub>3</sub>	42.000	4.200	420	42
B <sub>6</sub>	2.000	200	20	2
Vit- Mix	Aliquote w.o.	Aliquote w.o.	Aliquote w.o.	Aliquote w.o.

## 2.8. Analyse der Nährstoffpräparate

### 2.8.1. Saccharide, Zuckeralkohole und Aminosäuren

Die Identifizierung und Quantifizierung der wichtigsten Saccharide, Zuckeralkohole und Aminosäuren der Nährstoffpräparate erfolgte mit der HPLC (high performance liquid chromatography).

#### 2.8.1.1. HPLC-Analyse

Für diese Arbeit stand ein HPLC-System mit einer Hochdruckpumpe (Beckmann, 112 Solvent Delivery Module) zur Verfügung. Wässrige Eluenten wurden zum Schutz der Säule durch Whatman-Filter (0,2 µm) steril filtriert und im Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex TK 52, Berlin) unter Wasserstrahlvakuum (5 min) entgast. Die zu analysierenden Proben wurden über ein Injektionsventil (Rheodyne, 7125) in die Probenschleife (Knauer), die ein Volumen von 10 µl aufwies, eingespritzt. Daran schlossen sich die Vorsäule, die spezifische Trennsäule und ein RI Detektor (Knauer, Differential-Refraktometer) an. Die Probenschleife und die Säulen befanden sich in einem beheizbaren Säulenofen (Knauer, High temperature oven).

#### 2.8.1.2. Identifikation und quantitative Bestimmung der Analyte

Die Analyse der Chromatogramme erfolgte mit der Auswertesoftware Apex Clarity™, 3.0 (Dr. R. Forche Chromatography, Moers). Zur Identifizierung der Substanzen wurde die Retentionszeit herangezogen und mit der von käuflichen Standards verglichen. Die Konzentration der jeweiligen Substanzen wurde über die Peakfläche

mit einer Zwei-Punkt-Kalibrierung berechnet. Von den drei Probeläufen wurde jeweils der Mittelwert für die Konzentrationsberechnung verwendet, um Fehler möglichst gering zu halten.

### 2.8.1.3. Saccharide und Zuckeralkohole

Für die Analyse der Saccharide und Zuckeralkohole wurde die Säule Aminex<sup>®</sup> HPX 87C (Bio Rad, 7,8 x 300 mm) verwendet. Das Trennmateriale stellen Kationenaustauscherharzpartikel (9 µm) auf Polystyrolbasis dar. Neben den Ionenaustauschereffekten waren auch andere Trennprinzipien, wie die Gelfiltration, beteiligt. Alle Analysen wurden zum Schutz der Säule unter Verwendung einer Vorsäule (Carbo C, Bio-Rad) durchgeführt. Die Trennung der Saccharide und Zuckeralkohole erfolgt 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 Reinstwasser verwendet. Von den zu analysierenden Proben wurden je 20 ml mit 1 ml internem Standard (Sorbitol 100 µg/10 µl, Serva, Heidelberg) vermischt. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren und lyophilisiert. Das Pellet wurde in 20 ml 80% Ethanol aufgenommen. Die Probe wurde 20 min geschüttelt und 2 min bei 2.540 x g und 20°C zentrifugiert (GH 3.7., Beckman GPR Centrifuge). Der Überstand wurde abgenommen und das erhaltene Pellet erneut in 20 ml 80% Ethanol aufgenommen, geschüttelt und zentrifugiert (w.o.). Die Überstände wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer bei 40°C eingengt und in 1 ml Reinstwasser aufgenommen. Der interne Standard Sorbitol diente zur Berechnung der Verluste, die durch die Probenpräparation auftraten.

Zur Aufreinigung der Proben vor der HPLC wurde eine nicht-retentive Festphasenextraktion (solid phase extraction (SPE)) durchgeführt. Für die SPE wurden CN-Kartuschen (100 mg, Chromabond<sup>®</sup>, Machery-Nagel) mit einem Sorbens aus Cyanopropyl-Kieselgel und einer Partikelgröße von 45 µm verwendet. Die Bettmasse des Sorbens wurde mit 1 ml Reinstwasser vorkonditioniert. Anschließend wurde 1 ml Probe tropfenweise aufgetragen und mittels Schwerkraft eluiert. Das Eluat wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen und zentrifugiert. Jeweils 10 µl wurden mit einer 100 µl Spritze (Knauer) in die Probenschleife der HPLC injiziert und auf die Säule geladen. Die Nachweisgrenze für die verwendeten Kohlenhydrate lag bei 1 µg/10 µl (Kollar, 1986). Als Standard (50 µg/ 10 µl) wurde ein Gemisch aus Saccharose, Lactose, Glucose, Mannose, Fructose, Glycerin, Mannitol und Sorbitol (Serva, Heidelberg) verwendet.

### 2.8.1.4. Aminosäuren

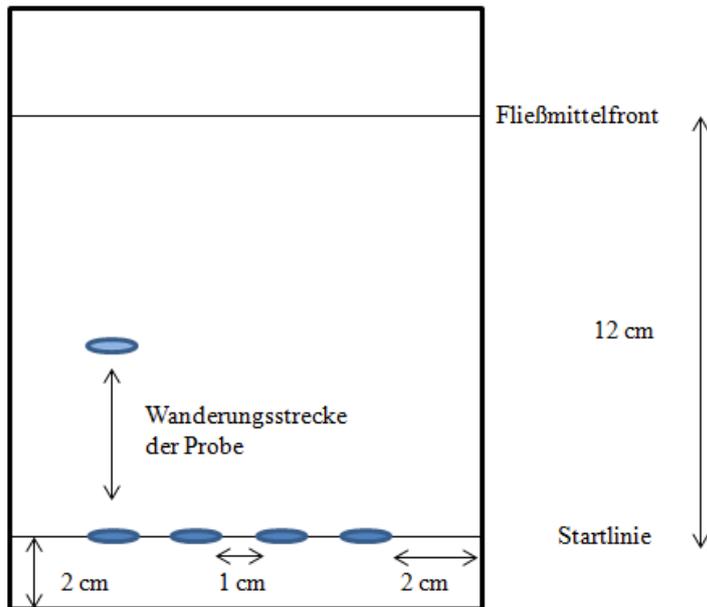
Die Auftrennung und Charakterisierung der wichtigsten Aminosäuren erfolgte mit einer Aminex<sup>®</sup> HPX-87C Säule (Bio Rad, 7,8 x 300 mm) bei einer Flussrate von 0,8 ml/min und einer Temperatur von 85°C. Als Eluent wurde eine 10 mM CaSO<sub>4</sub>-Lösung verwendet. Der Druck lag bei etwa 50 bar.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

entsprechenden Menge  $\text{CaSO}_4$ -Lösung aufgefüllt. Die Proben wurden 2 min bei  $16.060 \times g$  und  $20^\circ\text{C}$  zentrifugiert (Fresco Biofuge, PP 4/97 #3324, Heraeus Instruments). Jeweils  $10 \mu\text{l}$  Probe wurden über die Probenschleife auf die Säule aufgegeben. Die Identifizierung und Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte durch die vergleichende Analyse mit einem Aminosäure-Standard. Dieser beinhaltete eine Lösung aus Glutaminsäure, Asparaginsäure, Threonin, Serin, Alanin, Glycin, Valin, Aspartat (Serva, Heidelberg), Prolin und Leucin (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) mit jeweils  $100 \mu\text{g}/10\mu\text{l}$ .

#### **2.8.1.5. TLC-Bestimmung von Dipeptiden und Aminosäuren**

Die Charakterisierung von Dipeptiden und Aminosäuren der Nährstoffpräparate erfolgte mit der Dünnschichtchromatographie (thin layer chromatography (TLC)). Als Fließmittel wurde ein Gemisch aus 98% Ethanol und 25%iger Ammoniaklösung im Verhältnis 60:40 ml hergestellt und in die TLC-Kammer ( $20,5 \times 8,5 \times 20 \text{ mm}$ , Desaga, Heidelberg) eingefüllt. Die Innenwände der TLC-Kammer wurden mit Filterpapier (Whatmann) ausgekleidet, um eine schnelle Kammersättigung und reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten. Die Proben wurden mit Kapillarpipetten ( $10 \mu\text{l}$ , Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt) im Abstand von 1 cm, bandenförmig auf die TLC-Platten (Kieselgel 60, Adamant,  $20 \times 20\text{cm}$ ) aufgetragen (Abb. 10). Es wurden verschiedene Konzentrationen der Proben verwendet, um bei der Auswertung der Platten eine bessere Quantifizierung der Aminosäuren zu ermöglichen. Als Standardsubstanzen wurden käufliche Aminosäuren (Serva) und ein Dipeptid (Val-Tyr) verwendet. Schwer lösliche Aminosäuren, wie z.B. Tryptophan, wurden in 0,1 N Salzsäure aufgenommen. Jeweils  $10 \mu\text{l}$  der entsprechenden Aminosäure wurden mit einer Konzentration von 1 mg/ml und 0,1 mg/ml aufgetragen. Die Platte mit den getrockneten Probenflecken wurde in die mit Laufmittel gesättigte TLC-Kammer gestellt und horizontal über eine Laufstrecke von 12 cm entwickelt. Anschließend wurde die Platte aus der Kammer genommen und die Laufmittelfront markiert. Die TLC-Platte wurde unter dem Abzug luftgetrocknet und in einem Tauchbad mit Ninhydrin-Lösung gefärbt. Dazu wurden 0,4 mg Ninhydrin in einer Mischung aus 100 ml Ethanol und 3 ml Eisessig gelöst. Die Platten wurden nach dem Tauchen 10 min bei  $120^\circ\text{C}$  im Wärmeschrank (Memmert) entwickelt.

Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgte durch den Vergleich der  $R_f$ -Werte von den Aminosäure-Standards mit denen der aufgetrennten Probe. Die Farbintensität der Flecken erlaubte einen Rückschluss auf die Konzentration der enthaltenen Aminosäuren.



**Abb. 10:** Abstandsverhältnisse auf der TLC-Platte zur Auftrennung von Aminosäuren

## 2.8.2. Proteine und Peptide

### 2.8.2.1. Quantifizierung von Proteinen mit dem Bradford-Test

Die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Proben ( $> 3$  kDa) erfolgte photometrisch mit dem Bradford-Test (Bradford, 1976). Das Messprinzip beruht auf einer Komplexbildung von dem in der Bio-Rad-Reagenz (Protein Assay Kit II, Bio-Rad, München) enthaltenen Coomassie Brilliant Blau G-250 mit den unpolaren Seitenketten der Proteine. Durch die Komplexbildung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blau in den Bereich von 595 nm und ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Kalibrierung der Proteineichgeraden wurde Rinderserum Albumin (BSA) (Serva, Heidelberg) verwendet. Die Proben der Nährstoffpräparate wurden 1:2 verdünnt. Je 600  $\mu$ l Probe wurden zum Entfärben in ein Zentrifugal-Filterröhrchen (Amicon<sup>®</sup> Ultra, 0,5 ml, Millipore, MWCO 3 kDa) pipettiert. Die Röhrchen wurden bei 16.060 x g und 4°C so lange zentrifugiert (Fresco Biofuge, PP 4/97 #3324, Heraeus Instruments), bis die gesamte Probenflüssigkeit durch die Filtertasche gelaufen war (ca. 10 min bis 1 h). Diese wurde gegebenenfalls bis zu dreimal mit wenigen  $\mu$ l Reinstwasser gespült. Das erhaltene Retentat wurde auf die Probenausgangsmenge von 600  $\mu$ l aufgefüllt und anschließend 1:5 verdünnt, so dass die Proteinkonzentrationen im linearen Messbereich von BSA (0-20  $\mu$ g/ml) lag. Jeweils 800  $\mu$ l Probe bzw. Proteinstandard wurden mit 200  $\mu$ l Bio-Rad-Reagenz 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 eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die unbekannte

Proteinkonzentration der Probe konnte über die Standardreihe von BSA ermittelt werden.

### **2.8.2.2. Quantifizierung niedermolekularer Peptide nach Biuret**

Zur quantitativen Bestimmung von Polypeptiden ( $\leq 3$  kDa) bis hin zum Tripeptid wurde das Biuret-Assay verwendet. Bei dieser Methode bildet sich durch das Zufügen von Kupfersulfatlösung (Biuret-Reagenz) ein doppelt negativ geladener Protein-Kupferkomplex aus. Das Absorptionsmaximum des Farbkomplexes liegt im Bereich von 546 nm.

Zur Herstellung der Biuret Reagenz wurden nacheinander 2,35 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , 6 g Na-K-Tartrat und 30 g NaOH (Pellets) in 1 l Reinstwasser in Lösung gebracht. Als Protein-Stammlösung, zur Kalibrierung der Eichgeraden, wurde eine 1% BSA Lösung in 0,1 M NaOH angesetzt. Von den Proben und von den Standards der Eichgerade, wurden jeweils 0,5 ml in ein Reagenzglas gegeben und mit 2,5 ml Biuret-Reagenz inkubiert. Proben, die eine hohe Peptidkonzentration aufwiesen, wurden zuvor entsprechend verdünnt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit wurden die Proben und Standards 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 546 nm gemessen. Die Peptidkonzentration der Proben konnte über die Eichgerade von BSA berechnet werden.

### **2.8.2.3. Ermittlung der Größenklassenverteilung mittels Gelfiltration**

Die Größenklassenverteilung der Proteine und Peptide in den Nährstoffpräparaten wurde durch eine Fraktionierung der Proben mit der Gelchromatographie ermittelt. Es wurde eine Hiloal 16/600 Säule (Superdex 30 PG, GE Healthcare) mit einem Ausschlussvolumen von 30.000 Da verwendet. Detektiert wurde mit einem UV-Durchflussmonitor bei 260 nm. Die Aufzeichnung der chromatographischen Daten erfolgte mit einem Integrator (Shimadzu, C-R3A Chromatopac). Als Standard wurde eine Lösung aus Proteinen und Peptiden verschiedener Größe bis hin zur Aminosäure verwendet (Tab. 7) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Die Nährstoffpräparate sowie die Standards wurden in 0,15 M Ammoniumacetat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in Lösung gebracht und steril filtriert.

Die Säule wurde mit 30 ml einer 0,15 M Ammoniumacetat-Lösung, bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Nach der Äquilibration wurden die Proben in die Injektionsschleife (1 ml) (Valve IV-7, Pharmacia) gegeben und auf die Säule geladen. Als Laufpuffer diente eine 0,15 M Ammoniumacetat-Lösung. Die Flussrate wurde auf 1 ml/min, bei einem Druck von  $\leq 5$  bar (High Precision Pump P-500, Pharmacia), eingestellt. Die ersten 40 ml des Eluats wurden verworfen, die folgenden 140 ml in Fraktionen zu je 5 ml gesammelt. Nach jedem Lauf wurde das Gelbett mit einem Säulenvolumen Puffer regeneriert. Zur längerfristigen Lagerung wurde die Säule mit vier Säulenvolumina Reinstwasser gewaschen und anschließend mit vier

Säulenvolumina einer 0,2 M Natriumacetat, 20% Ethanol-Lösung äquilibriert. Über die Eichgerade des Standards konnten die gesammelten Fraktionen verschiedenen Größenklasse von > 3.000 Da, 1.000-3.000 Da, 500-1.000 Da und 500-300 Da zugeordnet werden. Der Peptidgehalt der gesammelten Fraktionen wurde mit dem Biuret-Assay bestimmt. Fraktionen mit einem Molekulargewicht < 300 Da konnten anhand des Molekulargewicht-Standards als Dipeptide/Aminosäuren identifiziert werden.

**Tab. 7:** Zusammensetzung des Größenklassen-Standards für die Gelfiltration

Standard	MW (Da)	Konzentration (%)
Blue Dextran	2.000.000	0,1
Cytochrom C, (Pferdeherz)	12.400	0,02
Aprotinin (Rinderlunge)	6.500	0,02
Angiotensin II Acetat	1.046	0,02
Val-Tyr	280	0,02
Tryptophan	186	0,002

## 2.9. Saponine

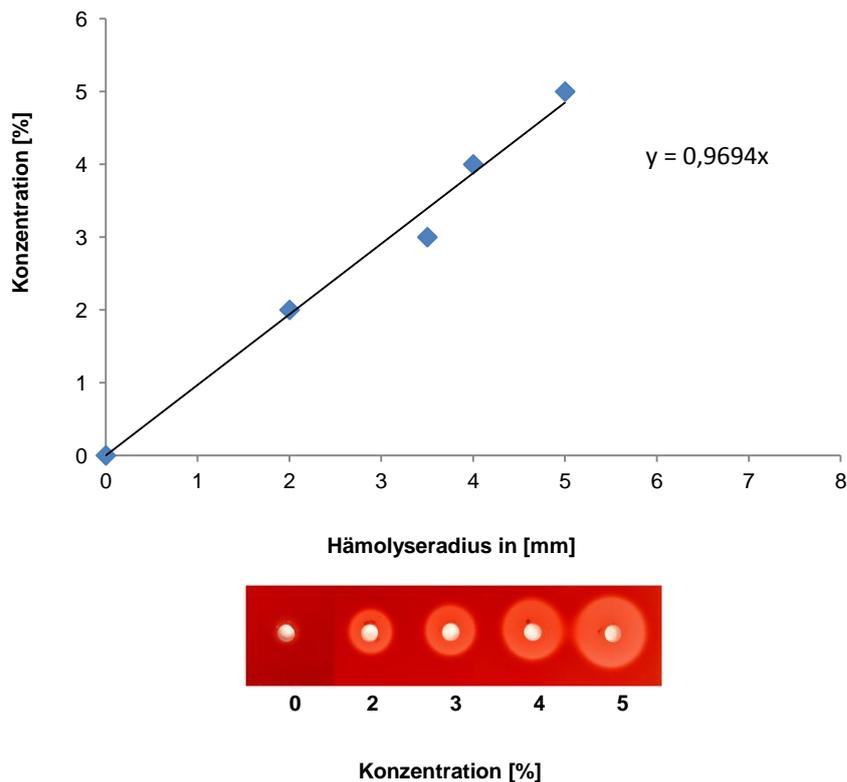
### 2.9.1. Saponinextraktion

Für die Extraktion von Saponinen aus pflanzlichen Materialien wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Es wurde das in 2.1.3.2. beschriebene Extraktionsverfahren mit Methanol und n-Butanol als Lösungsmittel verwendet bzw. ein neu entwickeltes Extraktionsverfahren auf Basis von Chloroform und Methanol. Das Extraktionsmittel wurde im Verhältnis 1 Volumenteil Chloroform zu 2 Volumenteilen Methanol angesetzt. Jeweils 3,75 ml Extraktionsmittel wurden zusammen mit 1 ml Reinstwasser in ein 15 ml Falconröhrchen pipettiert. Es wurden die in 2.1.3.2. beschriebenen Pflanzenmaterialien, Rinde vom Seifenrindenbaum, Primelwurzeln (Heinrich Klenk, Schwebheim) und ein aus Efeublättern gemahlenes Pulver (F. Schacht GmbH & Co GG, Braunschweig) für die Extraktion verwendet. Die Pflanzenmaterialien wurden wie in 2.1.3.2. beschrieben vorbereitet. Jeweils 1,7 g Pflanzenpulver wurden dem Extraktionsmittel-Wasser-Gemisch in den Falconröhrchen zugefügt und mittels vortexen suspendiert. Für die Extraktion von Saponinen aus dem Yuccasaponinpräparat wurden 3,75 ml Extraktionsmittel mit 1 ml des Präparates durch vortexen in Lösung gebracht. Die Falconröhrchen wurden auf einem Horizontalschüttler fixiert und 30 min geschüttelt (Rotationsfrequenz: 100 min, Radius: 4,5 cm). Um fettige Bestandteile von den Saponinen abzutrennen, wurden 1,25 ml Chloroform und 1,25 ml Reinstwasser hinzugefügt. Die Proben wurden gevortext und 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Die Phasentrennung von Chloroform und Methanol/Wasser erfolgte durch einen 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 2.540 x g (GH 3.7., Beckman GPR Centrifuge). Die Epiphase (Methanolphase) wurde abgenommen und in ein vorgewogenes

Falconröhrchen pipettiert. Es wurde der gleiche Volumenanteil Reinstwasser hinzugegeben. Die Proben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und für etwa 3 Tage lyophilisiert. Die Röhrchen mit dem getrockneten Saponinextrakt wurden an der Feinwaage gewogen und der Rückstand (mg) der Extraktion berechnet. Die getrockneten Saponinextrakte wurden im Mörser homogenisiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der Extraktionserfolg mit den beiden unterschiedlichen Saponinextraktionsverfahren wurde mit Hilfe des Hämolyse-Cuptests (s. 2.9.2.) und der daraus ermittelten spezifischen (U/g) und absoluten Aktivität (g) bestimmt.

### **2.9.2. Nachweis membranolytischer Aktivität mit dem Hämolyse-Cuptest**

Die hämolytische Aktivität der Saponinextrakte wurde mit einem selbstentwickelten Blutagar-Test nachgewiesen. Zunächst wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) hergestellt. Eine Schottflasche wurde mit 800 ml Reinstwasser befüllt. Nacheinander wurden 8,0 g Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ); 0,2 g Kaliumchlorid ( $\text{KCl}$ ); 1,78 g Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) und 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) unter Rühren in Lösung gebracht. Die Lösung wurde mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt. Von der PBS-Lösung wurden 95 ml in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit 1 g Agarose (LMP Agarose, Gibco BRL) auf einer Heizplatte unter ständigem Rühren aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Lösung auf  $42^{\circ}\text{C}$  wurden 5 ml heparinisiertes Schafblut (Acila) dazu pipettiert. Die Blutagarose-Lösung wurde in eine quadratische Petrischale (120 x 120 x 17 mm, Greiner Bio-One) gegossen. Es wurde ein Cup-Former aus Polyethylen auf die noch flüssige Blutagarose-Lösung gesetzt. Dadurch entstanden Vertiefungen (Cups) mit einem Volumen von ca. 80  $\mu\text{l}$ . Nach dem Erkalten des Agars wurde der Cup-Former abgenommen. In die Vertiefungen wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  Saponinlösung pipettiert. Es wurden alle Saponinextrakte in verschiedenen Konzentrationen getestet sowie Reinstwasser als Kontrolle. Die Blutagarplatten wurden für 72 h bei  $20^{\circ}\text{C}$  im Klimaschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Radius der hämolytischen Höfe unter Durchlicht gemessen und fotografisch dokumentiert (Abb. 11). Der Radius der Hämolysehöfe wurde gegen die jeweilige Extraktkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe einer linearen Regression wurde eine Geradengleichung aufgestellt. Die spezifische hämolytische Aktivität des Extraktes für eine 1% Saponinlösung wurde berechnet. Hämolysehöfe mit einem Radius  $< 2 \text{ mm}$  wurden nicht in die Berechnung einbezogen. Die absolute Aktivität des Extraktes ergab sich aus der Multiplikation von spezifischer Aktivität und dem Rückstand der Methanolphase (g). Der tatsächliche Saponingehalt des Extraktes (Saponinausbeute) wurde durch den Vergleich der absoluten Aktivität des Ausgangsmaterials mit der des Extraktes errechnet.



**Abb. 11:** Hämolytische Saponinaktivität von Waschnussextrakt (Chloroform-Methanol-Extrakt) im Hämolyse-Cuptest (Inkubationsdauer: 72 h)

### 2.9.3. Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln

Die Löslichkeit von Saponinen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln (Tab. 8) wurde untersucht. Getestet wurden die Löslichkeit von Waschnuss- und Kastanienextrakt (Methanol-Chloroform-Extrakt), Quillajasaponin (10-11%) und Aescin ( $\geq 97,9\%$ ) in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität und Konzentration.

**Tab. 8:** Reihenfolge der verwendeten Lösungsmittel nach absteigender Polarität

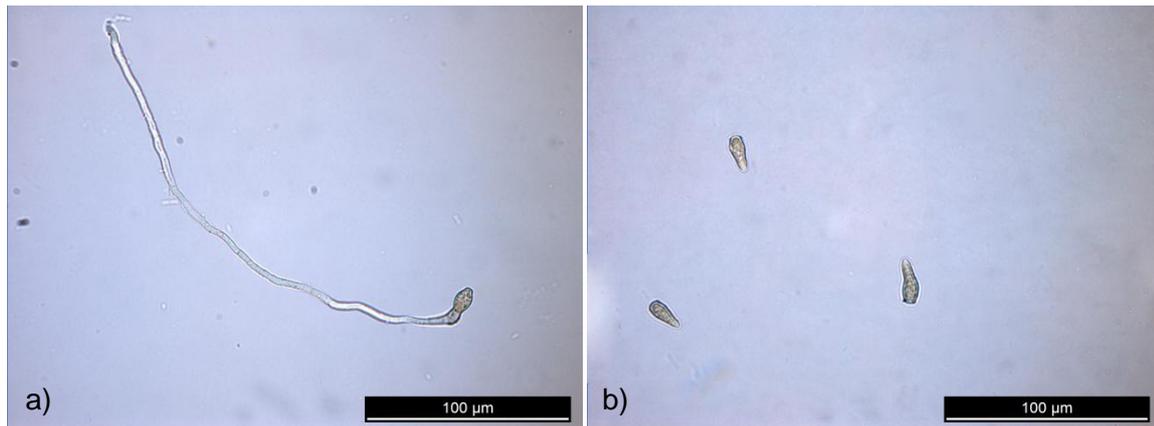
Lösungsmittel	Konzentration [%]
Reinstwasser	
Methanol	60
Methanol	80
Methanol	100
Ethanol	60
Ethanol	80
Ethanol	100
Aceton	50
Aceton	80
Isopropanol	60
Isopropanol	80
Isopropanol	100

Jeweils 50 mg Saponin oder Saponinextrakt wurden in ein vorgewogenes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 1 ml des entsprechenden Lösungsmittels aufgefüllt. Die Eppendorfgefäße wurden gevortext, um das Saponinextrakt in Lösung zu bringen. Im Anschluss wurden die Proben 1 h bei RT inkubiert, wobei die Eppendorfgefäße alle 5 min gevortext wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben für 30 min mit 16.060 x g zentrifugiert (Fresco Biofuge, PP 4/97 #3324, Heraeus Instruments). Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues vorgewogenes 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert. Die Pellets und Überstände der Proben wurden eingefroren (-80°C) und über Nacht lyophilisiert. Am folgenden Tag wurden alle Eppendorfgefäße erneut an der Feinwaage gewogen. Aus der Differenz vom Gewicht der Eppendorfgefäße mit getrocknetem Überstand/Pellet und dem Leergewicht konnte der Anteil des in Lösung gegangenen Saponinextraktes berechnet werden. Als zweites Kriterium für die Löslichkeit der Saponine wurde die hämolytische Aktivität der Pellets und Überstände herangezogen. Diese wurden mit 1 ml Reinstwasser aufgefüllt und jeweils 50 µl wurden in Cups einer Blutagarplatte (s. 2.9.2) pipettiert. Nach 24 h wurde der Hämolyseradius gemessen und mit dem einer Kontrolle verglichen.

#### **2.9.4. Bestimmung der fungiziden Wirkung von Saponinextrakten**

##### **2.9.4.1. Konidienkeimtest**

In Konidienkeimtests wurde die keimhemmende Wirkung der Saponinextrakte gegenüber Konidien von *V. inaequalis* geprüft. Für den Test wurden je 4-5 stark schorfbefallene Blätter in eine Schottflasche (1 l) mit 50 ml Reinstwasser gegeben. Durch 10-minütiges, kräftiges Schütteln wurde eine frische Konidiensuspension ( $10^5$ /ml) hergestellt. Jeweils 0,5 ml Konidiensuspension wurden zusammen mit 0,5 ml einer Saponinlösung in die Kavität einer 6er-Microwellplatte (Greiner bio-one, Cellstar®) pipettiert. Die Endkonzentration der Saponinextrakte in den Kavitäten lag zwischen 10.000 und 1 ppm. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 20°C wurden jeweils 100 Konidien mikroskopisch (Leica, DM 400B, Solms) untersucht. Konidien, deren Keimschlauch mindestens halb so lang war wie die Konidie, wurden als gekeimt betrachtet (Abb. 12). Der Konidienkeimtest wurde für alle Pflanzenextrakte dreimal wiederholt. Der Anteil nicht gekeimter Konidien in den Saponinvarianten und in der Kontrolle wurde dokumentiert und der Wirkungsgrad der Saponine sowie die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) berechnet.



**Abb. 12:** Konidie mit Keimschlauch (a) und nicht gekeimte Konidien (b) von *V. inaequalis*

#### 2.9.4.2. Wachstumshemmtest

Die fungizide Wirkung der Saponinextrakte auf das Mycelwachstum von *V. inaequalis* wurde in Wachstumshemmtests auf Agarplatten untersucht. Die Saponinextrakte und die gekauften Saponinpräparate wurden in Reinstwasser eingewogen und durch vortexen in Lösung gebracht. Die gewählten Saponinkonzentrationen lagen im Bereich von 10.000 bis 1 ppm. Die Lösungen wurden 20-fach höher angesetzt, als die Endkonzentration im Agar sein sollte und steril filtriert (0,2 µm). 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 d alten *V. inaequalis* Kultur mittig auf die Agarplatte gesetzt. Die angeimpften Platten wurden für 21 d bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Der Durchmesser der Schorfmycelien wurde wöchentlich gemessen, um die Hemmung des Mycelwachstums und die IC<sub>50</sub> zu berechnen.

#### 2.9.4.3. Revival-Test

Das fungizide bzw. fungistatische Potenzial der Saponinextrakte wurde mit Hilfe von Revival-Tests untersucht. Für die Versuche wurden ausschließlich Schorfmycelien verwendet, die in den Hemmtests auf Agar (s. 2.9.4.2.) nach 21 d kein Wachstum zeigten. Die Mycelstücke wurden mit einer Impföse abgenommen und auf frische PDA-Platten überführt. Die Platten wurden bei 20°C im Klimaschrank inkubiert und der Durchmesser der Schorfmycelien nach 21 d gemessen.

#### 2.9.4.4 Hemmtest in Flüssigkultur

Die fungizide Wirkung der Saponinextrakte in Flüssigkultur wurde am Beispiel der Waschnuss untersucht. Waschnussextrakt (Butanol-Extrakt) wurde in 10 ml Reinstwasser in Lösung gebracht. Die Saponinextrakte wurden dreifach höher angesetzt als die gewünschte Endkonzentration im Medium sein sollte (1.000, 500,

100, 50, 10 ppm). Für jede Konzentration wurden 10 Erlenmeyerkolben á 100 ml mit 20 ml PDB (54 g/l) befüllt und autoklaviert. Die Saponinlösungen wurden steril dazu filtriert. Die Kolben wurden mit dem Mycelstück (Durchmesser: 0,8 mm) einer 14 d alten V1 Kultur angeimpft und bei 20°C im Klimaschrank inkubiert. Im Abstand von 7 Tagen, bis zum 35 d, wurden jeweils 2 Kolben einer Konzentration geerntet. Der Kulturüberstand wurde durch Miracloth (Calbiochem) abfiltriert und die Mycelien mit Hilfe einer Lanzettnadel in vorgewogene Eppendorfgefäße überführt. Die Mycelien wurden eingefroren (-80°C) und lyophilisiert. Anschließend wurde an der Feinwaage das Trockengewicht bestimmt. Die Hemmung des Mycelwachstums von *V. inaequalis* und die IC<sub>50</sub>, konnten durch den Vergleich mit dem Mycelgewicht einer unbehandelten Kontrolle ermittelt werden.

#### 2.9.4.5. Bekämpfungsversuche im Gewächshaus

Die fungizide Wirkung der Saponinextrakte (Waschnuss, Kastanie, Aescin) auf *V. inaequalis* wurde in Bekämpfungsversuchen im Gewächshaus untersucht. Für die Versuche wurden Apfelsämlinge aus Apfelkernen der Sorte 'Golden Delicious' angezogen (Abb. 13 a). Es wurden nur gleich alte Sämlinge, die min. 3 junge, noch nicht vollständig ausgewachsene Blätter aufwiesen (keine Altersresistenz) und sich gut infizieren ließen, verwendet. An jedem Sämling wurde das Blatt angeschnitten, welches weitgehend altersresistent geworden war. Jeweils 10 Sämlinge wurden vorbeugend mit einer 1% oder einer 0,1% Lösung der Saponine, die mit 1 ml/l NuFilm als Netzmittel versetzt waren, behandelt. Es wurde eine Handsprühflasche verwendet und bis zum ersten Abfließen der Saponinlösung an der Blattoberfläche gesprüht. Nach dem Antrocknen des Spritzbelages (24 h) wurden die Apfelsämlinge in Plastiktüten gestellt und mit Wasser angegossen, um eine ausreichend hohe Luftfeuchtigkeit für die Infektion zu gewährleisten. Die Sämlinge wurden mit einer frischen Konidienlösung (10<sup>6</sup>/ml), die aus Schorfbläsionen gewonnen wurde (s. 2.9.4.1.), tropfnass besprüht. Unmittelbar danach wurden die Sämlinge luftdicht in Plastiktüten verpackt, um eine Blattnässezeit von 48 h zu gewährleisten (Abb. 13 b). Kleine Holzstäbe fungierten als Abstandshalter, um den Kontakt zwischen Blättern und Plastiktüte zu vermeiden (Abb.13 c). Nach 6 h und nach 24 h wurden jeweils 10 Sämlingstüten geöffnet und mit einer 1% Saponinlösung behandelt. Die Tüten wurden sofort wieder luftdicht verschlossen. Zwei Tage nach der Inokulation wurden alle Tüten geöffnet, um die Sämlinge abtrocknen zu lassen. Am darauf folgenden Tag wurden die Sämlinge ausgetütet. Im Abstand von 2-3 d wurde der Infektionsverlauf fotografisch mit einer Digital- und einer Thermokamera (Testo 875-1) dokumentiert. Während der gesamten Versuchsdauer wurde die Klimakammer im Gewächshaus auf einer Temperatur von 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von 80% gehalten.

Die Abschlussbonitur der Sämlinge erfolgte nach 28 d. Die aufgetretenen Schorfsymptome wurden makroskopisch bewertet, wobei die Kategorien kein Schorfbefall, chlorotische Symptome, sporulierende Infektion und nekrotische Infektion verwendet wurden. Der prozentuale Anteil der infizierten Sämlinge im

Vergleich zur Kontrolle wurde berechnet. Nach der Bonitur auf Blattschorfinfektionen wurden alle Blätter einer Pflanze, die zu Infektionsbeginn keine Altersresistenz aufwies, abgepflückt und in einer definierten Menge Wasser aufgenommen. Die Konidien wurden durch 10-minütiges, kräftiges Schütteln von den Blättern abgewaschen und in Kolkwitz Zählkammern (0,5 ml, Hydro-Bios) unter dem Mikroskop ausgezählt.



**Abb. 13:** Sämlinge vor der Inokulation mit Konidien (a) und danach tropfnass besprüht und in Plastiktüten verpackt (b) mit Holzstäben als Abstandshalter (c)

#### 2.9.4.6. Bekämpfungsversuche mit Fangpflanzen im Freiland

Die natürlichen Infektionsbedingungen im Freiland wurden genutzt, um die hemmende Wirkung der Saponine *in situ* zu bestimmen. Im Frühjahr 2013 wurden zwei Freilandversuche mit dem Saponinextrakt der Kastanie durchgeführt. Für die Dauer einer natürlichen Ascosporeneninfektionsperiode wurden 8 vorbeugend behandelte Sämlinge (0,1% Kastanienextrakt + NuFilm (1 ml/l)), die aus Apfeln der Sorte 'Golden Delicious' angezogen wurden, und 8 unbehandelte Sämlinge (Kontrolle) im Freiland neben mehreren Schalen mit stark schorbefallenem Falllaub exponiert (Abb. 14). Das Falllaub wies eine hohe Anzahl ausschleuderbereiter Ascosporen auf, die während des Versuches mit der Wasserbad-Methode (s. 2.2.) bestimmt wurden. Je nach Länge der Infektionsperiode (Witterung) wurden die Sämlinge nach 3-7 d zurück ins Gewächshaus gestellt. Nach 28 d wurden die Sämlinge auf das Erscheinen von Blattschorfsymptomen bonitiert.



**Abb. 14:** Versuchsaufbau der Bekämpfungsversuche mit unbehandelten und saponinbehandelten Sämlingen neben schorfbefallenen Blattdepots im Freiland

## 2.9.5. Aufreinigung und Anreicherung von Saponinen

### 2.9.5.1. Festphasenextraktion

Zur Reinigung der Saponinextrakte (Chloroform-Methanol-Extrakte) wurde die Festphasenextraktion (SPE) verwendet. Mit verschiedenen handelsüblichen SPE-Kartuschen (Chromabond, Machery & Nagel) (Tab. 9) wurden Vorversuche durchgeführt, um das effektivste Sorbensmaterial für die Aufreinigung der Extrakte zu finden. Für weiterführende Aufreinigungsschritte wurden verschiedene Retentionsmechanismen miteinander kombiniert.

**Tab. 9:** Übersicht der verwendeten SPE-Säulenmaterialien

Säule	Bettmasse (mg)	Material	Polarität
PA	500	Polyamid	mittelpolar
	200		
CN	500	Cyanopropyl-modifizierte Kieselgelphase	polar-mittelpolar
	100		
C18ec	100	Octadecyl-endcapped Kieselgelphase	sehr unpolar
C18	200	Octadecyl-modifizierte Kieselgelphase	unpolar
C8	100	Octyl-modifizierte Kieselgelphase	unpolar
C4	100	Butyl-modifizierte Kieselgelphase	unpolar
HR-P	100	hochporöses Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer	unpolar
HR-X	100	sphärisches Polystyrol-Divinylbenzol-Harz	unpolar

Die SPE-Kartuschen wurden mit 5 ml Methanol und 5 ml Reinstwasser vorkonditioniert. Die Saponinextrakte von Waschnuss, Kastanie und Seifenkraut wurden in Konzentrationen von 100 mg/ml oder 50 mg/ml in Reinstwasser gelöst. Jeweils 1 ml Probe wurde tropfenweise auf die Säule aufgetragen und mittels Schwerkraft eluiert. Die Festphase wurde anschließend mit 10 ml Reinstwasser gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde in einem vorgewogenen 15 ml Falconröhrchen aufgefangen. Die Elution der Saponine erfolgte zu Beginn der Versuche mit 2 ml 30, 70 und 100% Methanol. Die vollständige Elution der hämolytischen Saponine wurde mit 100% Methanol erreicht, so dass dieses für die weiteren Versuche als Standardeluent verwendet wurde. Das Säuleneluat wurde in einem vorgewogenen Falconröhrchen aufgefangen. Bei der Kombination von zwei verschiedenen Adsorbentien wurde das Methanol-Eluat der ersten Säule am Rotationsverdampfer eingeengt und in 1 ml Reinstwasser rückverdünnt. Diese Probe wurde auf die zweite, vorkonditionierte, SPE-Säule aufgetragen und mit 100% Methanol eluiert. Das wässrige und das Methanol-Eluat wurden in 15 ml Falconröhrchen aufgefangen. Die gesammelten Proben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und im Anschluss lyophilisiert. Das Gewicht der getrockneten Pellets wurde an der Feinwaage bestimmt. Aus der Differenz von eingewogenem Pulver und dem Gewicht der getrockneten Pellets konnte der Aufreinigungsgrad der Saponinextrakte berechnet werden. Die Pellets wurden in 1 ml Reinstwasser rückverdünnt und das Absorptionsspektrum im Bereich von 200-700 nm (Specord 200, Analytik Jena) gemessen. Die spektralphotometrische Analyse erfolgte mit der Software Win Aspect 1.6.0.0. (Analytik Jena). Als Vergleich dienten die Spektren eines Aescinstandards ( $\geq 97,9\%$ ) mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml. Mit den rückverdünnten SPE-Proben wurde ein Hämolyse-Cuptest durchgeführt (s. 2.9.2.).

### 2.9.5.2. Säulenchromatographie

Für die Aufreinigung und Anreicherung der Saponinextrakte wurden zwei verschiedene Verfahren der Säulenchromatographie angewandt.

#### 2.9.5.2.1. Affinitätschromatographie

Als Säulenmaterial für die Affinitätschromatographie wurde Concanavalin A Sepharose 4B (Pharmacia Biotech) verwendet. Concanavalin A ist ein Lectin aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*), welches in Anwesenheit der Co-Faktoren  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$   $\alpha$ -D Glucose und  $\alpha$ -D Mannose haltige Saccharide reversibel binden kann. Diese Eigenschaft wird in der Affinitätschromatographie genutzt um kohlenhydratreiche Verbindungen zu separieren.

Eine leere Plastiksäule (Durchmesser 1,5 cm; 20 ml) wurde mit einigen Millilitern einer 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-Pufferlösung (pH 7,4) und aufgeschwemmter Concanavalin A Sepharose befüllt. Während des Absetzens wurde die Säule fortwährend mit der Tris-Pufferlösung gespült und die oberste Schicht Concanavalin A resuspendiert, um eine gleichmäßig gepackte Säule zu erhalten. Nachdem ein

Säulenvolumen von 18 ml erreicht war, wurde zur Stabilisierung eine Fritte auf das Gelbett gesetzt. Die Säule wurde mit einem Deckel verschlossen, der über einen Silikonschlauch mit einem Vorratsgefäß (250 ml) verbunden war. Vor dem Auftragen der Probe wurde die Concanavalin A Sepharose mit drei Säulenvolumina einer Waschlösung gereinigt (1 M NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH-6). Anschließend wurde das Säulenmaterial mit der Tris-Pufferlösung äquilibriert. Jeweils 100 mg Saponinextrakt wurden in 1 ml Tris-Puffer aufgenommen, 2 min bei 16.060 x g und 20°C zentrifugiert (Fresco Biofuge, PP 4/97 #3324, Heraeus Instruments) und auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Probe vollständig in das Säulenbett eingedrungen war, wurde Tris-Pufferlösung aus dem Vorratsgefäß auf die Säule geleitet. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler (Redi Frac, GE) in Fraktionen von je 50 Tropfen (ca. 2 ml) gesammelt. Nach 36 Fraktionen (ca. 2 Säulenvolumina) erfolgte die Elution der Saponine mit einer 1 M Glucose-Lösung. Es wurden 12 weitere Fraktionen gesammelt. Jeweils 50 µl einer Fraktion wurden im Hämolyse-Cuptest (s. 2.9.2.) auf das Vorhandensein von membranolytischen Saponinen untersucht. Das Säulenmaterial wurde nach jedem Probanddurchlauf mit 5-10 Säulenvolumina einer basischen 0,1 M Tris-Pufferlösung (pH 8,5), die 0,5 M NaCl enthielt, und anschließend einer sauren 0,1 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,5), die 1 M NaCl enthielt, regeneriert.

#### **2.9.5.2.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC)**

Phenyl Sepharose High Performance (Pharmacia biotech), bestehend aus vernetzter Agarose mit einer durchschnittlichen Partikelgröße von 34 µm, wurde aufgeschwemmt und in eine Glassäule (15 x 150 mm) gepackt. Die Suspension wurde bis zu einem endgültigen Gelbettvolumen von 18 ml eingefüllt und während des Absetzens mit 20 mM Tris-Puffer gespült. Um eine gerade Oberfläche für die Probenaufnahme zu erhalten, wurde eine Fritte auf die oberste Gelschicht aufgelegt. Das Säulenmaterial wurde mit zwei Säulenvolumina (ca. 20 ml) einer 20 mM Tris-Lösung gewaschen und anschließend mit einer Puffer-Lösung (Tab. 10) äquilibriert (2 Säulenvolumina). Die Saponinextrakte (10-500 mg/ml) wurden in selbigem Puffer aufgenommen und 2 min bei 16.060 x g und 20°C zentrifugiert (Fresco Biofuge, Heraeus Instruments). Jeweils 1 ml Probe wurde auf das Gelbett aufgetragen (Tab. 11). Nach dem Eindringen der Probe wurde die Innenwand der Glassäule zweimal mit 1 ml der Pufferlösung gewaschen. Die weitere Zugabe der Pufferlösung erfolgte über ein Vorratsgefäß. Mit einem Fraktionssammler wurden Fraktionen á 60 Tropfen (ca. 2 ml) gesammelt. Nachdem etwa 3 Säulenvolumina Puffer eluiert waren, wurden die Saponine mit einem Eluenten (Tab. 10) von der Säule gewaschen. Um stark gebundene Saponine vom Säulenmaterial zu lösen, wurde die Elution nach zwei Säulenvolumina, mit einer 20 mM Tris-Lösung, die 70 bzw. 50% Ethanol enthielt, fortgesetzt. Für die gesammelten Fraktionen wurde mit einem Refraktometer (Krüss, Hamburg) der Brechungsindex gemessen, zudem wurde die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Jeweils 1 ml einer Fraktion wurde in eine UV-Quarzglaszelle (Schichttiefe: 10 mm, Hellma, Optic GmbH Jena) pipettiert und am Photometer (Specord 200, Analytik Jena) gemessen. Anhand dieser beiden Parameter konnte

die Bindung der Saponine an das Säulenmaterial in Abhängigkeit vom NaCl-Gehalt und der Reinigungserfolg aufgezeigt werden. Die Fraktionen wurden im Hämolyse-Cuptest (s. 2.9.2.) auf das Vorhandensein von membranolytischen Saponinen untersucht. Die membranolytischen Fraktionen wurden vereinigt, eingefroren (-20°C) und lyophilisiert. Die Probe wurde in 1 ml Reinstwasser rückverdünnt und für die Analyse mit der TLC und HPLC verwendet. Die Phenyl Sepharose Säule wurde in 20% Ethanol mit 0,05% Na-Azid gelagert.

**Tab. 10:** Puffer und Eluenten für die HIC

Puffer	Eluent I	Eluent II
Tris 20 mM + 1 M NaCl	30% EtOH	70% Ethanol
Tris 20 mM + 3 M NaCl	70% EtOH	
Tris 20 mM + 3 M NaCl	Reinstwasser	
Tris 20 mM + 3 M NaCl, pH 8	Tris 20 mM, pH 8	
Tris 20 mM + 3 M NaCl, pH 10 *	Tris 20 mM, pH 10	50% Ethanol

\*untitriert

**Tab. 11:** Konzentration der Saponinextrakte für die HIC

Saponinextrakt	Konzentration (mg/ml)
Waschnuss	100
Seifenkraut	200
Kastanie	500
Aescin	10
Primel	300
Yuccasaponin	500
Seifenrindenbaum	200
Efeu	500

## 2.9.6. Analyse und Charakterisierung von Saponinextrakten

### 2.9.6.1. TLC

Für die Auftrennung der Saponine wurden in Anlehnung an Literaturangaben (Oleszek, 2002) mit Kieselgel 60 (Adamant) beschichtete 20 x 20 cm Glasplatten verwendet. Die Entwicklung der Platten erfolgte in Horizontalkammern (20,5 x 8,5 x 20 mm, Desaga, Heidelberg) mit Kammersättigung. Als Fließmittel wurde nach dem Protokoll von Kerem et al. (2005) und Sharma et al. (2012) ein Gemisch aus n-Butanol-Essigsäure-Wasser, im Verhältnis 12:2:1 verwendet. Analysiert wurden die hämolytischen Fraktionen aus der HIC und verschiedene Konzentrationen der Saponinextrakte, die zuvor in Reinstwasser in Lösung gebracht wurden. Von den Proben wurden jeweils 10 µl bandenförmig (1cm) mit einer Einmal-Kapillarpipette auf die TLC-Platte aufgetragen. Die Abstandsverhältnisse wurden entsprechend der Versuche der Aminosäureanalysen (s. 2.8.1.5.) gewählt. Die Platten wurden über

eine Laufstrecke von 15 cm entwickelt und unter dem Abzug luftgetrocknet (Stahl, 1967). Die Färbung der Platten erfolgte im Tauchverfahren mit:

- a) Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz
- b) Ehrlich´s Reagenz
- c) heparinisiertem Schafblut

Die Reagenzien für die Färbung wurden wie folgt hergestellt:

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz:

85 ml Ethanol wurden mit 10 ml Eisessig, 5 ml konzentrierter Schwefelsäure und 0,8 ml Methylbenzaldehyd (Merck) versetzt (Schwarzbach, 2004).

Ehrlich´s Reagenz:

0,2 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd (Merck) wurden in 5 ml Salzsäure und 15 ml Methanol gelöst (Pachaly, 1995).

Heparinisiertes Schafblut:

Nach einem Protokoll von Sharma et al. (2012) wurden 5 ml heparinisiertes Schafblut mit 2.300 x g für 5 min zentrifugiert (GH 3.7., Beckman GPR Centrifuge). Der Überstand wurde abpipettiert und das erythrocytenreiche Pellet in phosphatgepufferter Salzlösung (s. 2.9.2.) suspendiert (3% v/v). Die Suspension wurde mikroskopisch untersucht und die Erythrocytenkonzentration auf einen Wert von  $0,8 \times 10^6/\text{mm}^3$  eingestellt. Die Suspension wurde in ein Tauchbad (20,5 x 0,5 x 16 mm) gefüllt und die getrocknete TLC-Platte für 20 s hineingestellt. Die Platte wurde herausgezogen und 30 s vertikal getrocknet. Um die Erythrozyten zu entfernen, wurde die TLC-Platte im Anschluss für 30 s in eine PBS-Lösung getaucht.

Die Entwicklung der Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und Ehrlich´s Reagenz gefärbten Platten erfolgte durch 10-minütiges Erhitzen im Wärmeschrank (110°C). Auf den mit heparinisiertem Schafblut gefärbten Platten entwickelten sich während des Trocknens weiße Flecken vor einem rosa Hintergrund. Die Ergebnisse wurden photographisch dokumentiert und die  $R_f$ -Werte der einzelnen Saponinbanden ermittelt.

Die Charakterisierung der nachgewiesenen Saponine aus der TLC erfolgte, indem die Saponinextrakte erneut bandenförmig über die gesamte Plattenbreite (18 cm) aufgetragen und entwickelt wurden. An jeder Platte wurden links und rechts mit einem Glasschneider ca. 3 cm breite Randstreifen abgeschnitten. Von diesen wurde einer mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und der andere mit der Erythrocytenlösung gefärbt. Die Randstücke wurden an die TLC-Platte angelegt und die Saponinzonen mit einem Spatel von der TLC-Platte abgekratzt. Das so gesammelte Kieselgelmateriale wurde mit 5 ml 80% Ethanol extrahiert und über eine Glasfritte partikelfrei filtriert (0,45 µm). Die Proben der einzelnen Saponinzonen wurden eingefroren (-80°C), lyophilisiert und in 100 µl Reinstwasser aufgenommen. Von dieser Probe wurden 50 µl im Hämolyse-Cuptest (s. 2.9.2.) auf ihre

membranolytische Wirkung untersucht. Jeweils 10 µl wurden mit der HPLC analysiert (s. 2.9.6.2.). Die beschriebene Methode wurde erneut durchgeführt und die abgekratzten, extrahierten und lyophilisierten Banden in 100 µl Reinstwasser aufgenommen. Die Proben wurden im Agardiffusions-Test auf ihre fungizide Wirkung gegenüber *V. inaequalis* untersucht (s. 2.9.7.3.).

### 2.9.6.2. HPLC

Die Analyse der Saponinrohextrakte von Waschnuss, Kastanie, Seifenkraut und Aescin, der abgekratzten TLC-Banden (s. 2.9.6.1.) und der hämolysierten HIC-Fractionen (s. 2.9.5.2.2.) erfolgte mit dem beschriebenen HPLC-System (s. 2.8.1.1.). Zur Auftrennung der Saponine wurde eine reversed-phase Kieselgelsäule (C18 Gemini 5u 110A, 250 x 4,6 mm; Phenomenex), der eine Vorsäule (Security Guard Cartridge, Gemini C18, 4 x 3,0 mm, Phenomenex) vorgeschaltet war, verwendet. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min, bei einer Temperatur von 35°C betrieben. Als Eluenten wurden Reinstwasser mit 0,1% TFA (Trifluoressigsäure) und Acetonitril (HPLC grade, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet. Der wässrige Eluent wurde zum Schutz der Säule durch Whatman-Filter (0,2 µm) steril filtriert und im Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex TK 52, Berlin) unter Wasserstrahlvakuum (5 min) entgast. Bei Acetonitril wurde das Vakuum beim Entgasen nur mehrmals kurz angelegt, um den Verlust flüchtiger Anteile zu vermeiden. Die beiden Hochdruckpumpen (Beckmann, 112 Solvent Delivery Module) des HPLC-Systems wurden mit einem Gradienten-Programmiersystem (Beckman, 420 Controller) angesteuert. Die Eluenten wurden in der darauffolgenden Mischkammer (Beckmann, 340 Organizer) miteinander vermischt. Die Säule wurde mit 20% Acetonitril äquilibriert. Alle Proben wurden steril filtriert und jeweils 10 µl mit einer Injektionsspritze in die Probenschleife der HPLC initiiert. Ab dem Probenauftrag wurde mit dem Gradienten-Programmiersystem ein linearer Acetonitrilgradient von 20 auf 80% Acetonitril innerhalb von 25 min gefahren. Die gesamte Probenlaufzeit lag bei 30 min. Die Chromatogramme wurden mit einem UV-Detektor (Shimadzu, SPD 2A) bei 203 nm und einer Empfindlichkeit von 2,56 AUFS (Absorbance Units Full Scale) aufgenommen. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit dem Programm Apex Clarity™, 3.0. Die TLC und HIC Chromatogramme der aufgereinigten und getrennten Fraktionen wurden mit denen der Rohextrakten (50 mg/ml) verglichen.

### 2.9.7. Analyse und Charakterisierung der HPLC-Fractionen

Die Saponinextrakte von Waschnuss, Kastanie und Seifenkraut (50 mg/ml) wurden mit der HPLC fraktioniert. Die Probenschleife wurde etwa 10-fach kurz hintereinander befüllt, um ca. 100 µl Probenvolumen in einem Lauf fraktionieren zu können, der dreimal wiederholt wurde. Es wurden gezielt sowohl einzelne Peaks, als auch Peakgruppen gesammelt. Die Rechromatographie wurde verwendet, um die Charakteristik der Fraktionierung zu erhalten. Die drei Fraktionen der gesammelten

Peaks wurden vereinigt, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren, lyophilisiert und in  $300\ \mu\text{l}$  Reinstwasser aufgenommen.

### 2.9.7.1. Test auf Schaumbildung und Hämolyse-Cuptest

Alle vereinigten Fraktionen wurden für 1 min stark geschüttelt. Die Schaumbildung und die Schaumstabilität wurden vergleichend bewertet. Zudem wurde mit  $50\ \mu\text{l}$  der Fraktionen der Hämolyse-Cuptest (s. 2.9.2.) durchgeführt.

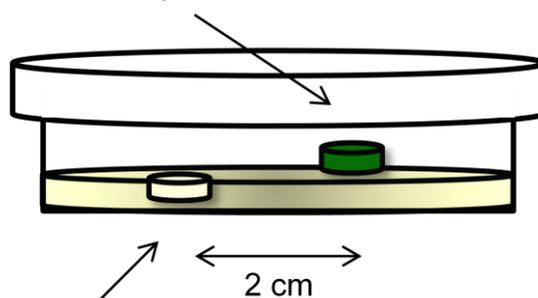
### 2.9.7.2. Konidienkeimtest

Mit den fraktionierten HPLC-Peaks wurde ein Konidienkeimtest (s. 2.9.4.1.) durchgeführt.  $25\ \mu\text{l}$  einer frischen Konidien suspension ( $10^6$  /ml) wurde mit  $75\ \mu\text{l}$  einer Saponinfraktion in die Kavität einer 96er Microwellplatte (Greiner bio-one, Cellstar<sup>®</sup>) pipettiert. Die Platten wurden über Nacht bei  $20^{\circ}\text{C}$  im Klimaschrank inkubiert. Am folgenden Tag konnte der Anteil gekeimter und nicht gekeimter Konidien einer Saponinfraktion am Mikroskop ausgezählt werden.

### 2.9.7.3. Agar-Diffusionstest

Für den Agardiffusionstest wurde aus einer PDA-Platte mit dem Korkbohrer ein  $0,8\ \text{cm}$  großes Agarstück ausgestanzt. Der Boden des entstandenen Cups wurde mit einem Tropfen PDA-Lösung versiegelt. Das entstandene Cup hatte ein Füllvolumen von ca.  $150\ \mu\text{l}$ . Jeweils  $100\ \mu\text{l}$  einer Saponinfraktion wurden unter sterilen Bedingungen in ein Cup pipettiert. Im Abstand von  $2\ \text{cm}$  wurde ein Mycelstück einer 14 d alten V1 Kolonie auf die Agarplatte gesetzt (Abb. 15). Analog wurde auch die nicht über die Säule fraktionierten Saponinproben und die abgekratzten Banden aus der TLC im Hemmtest eingesetzt. Die beimpften PDA-Platten wurden bei  $20^{\circ}\text{C}$  im Klimaschrank inkubiert. Nach 21 d wurde der Durchmesser der gewachsenen Schorfmycelien im Vergleich zu einer Kontrolle gemessen.

Agarmycelstück *V. inaequalis*



Cup für Saponinprobe

**Abb. 15:** Agardiffusionstest mit V1 und Saponinfraktionen aus der HPLC/ TLC

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ascosporenpotenzial der Falllaubdepots 2011-2014

Der zeitliche Verlauf der Ascosporenenreife in den vier Versuchsjahren sowie das kumulative Ascosporenpotenzial/g Blatt TG und der Zeitpunkt des maximalen Sporenpotenzials sind in Tab.12 dargestellt.

**Tab.12.:** Zeitlicher Verlauf der Ascosporenenreife in den Versuchsjahren 2011-2014

Versuchsjahr	Beginn Ascosporenenreife	Ende Ascosporenenreife	Ascosporen/g Blatt TG, kumulativ	max. Ascosporenpotenzial
2011	23.03.11	05.06.11	3.901.900	1.056.400 (04.05.11)
2012	10.04.12	12.06.12	454.500	137.800 (08.05.12)
2013	15.04.13	27.05.13	1.360.650	783.150 (29.04.13)
2014	20.03.14	08.05.14	1.319.300	473.100 (16.04.14)

Die Behandlungen der Falllaubdepots 2010-2013 mit Abbauprodukten von Casein hatten einen deutlichen Effekt auf die Ascosporenenproduktion (Abb. 16, 17, 18). Die wirkungsvollsten Präparate waren Pepton Casein 6% und hitzebehandeltes TSB 9%, die beide zu einer Reduktion des Ascosporenpotenzials um bis zu 98% führten. Das Ethanolextrakt und -präzipitat von TSB 9% wiesen einen niedrigeren Wirkungsgrad auf. Höhere TSB-Konzentrationen führten zu einer stärkeren Reduktion des Ascosporenpotenzials als niedrige. Von den TSB-Kombinationen zeigte die Variante mit Saccharose 6% die beste Wirkung mit einem verbleibenden Ascosporenpotenzial von 7%. Die Casaminoacids reduzierten das Sporenpotenzial um 81-95%.

Bei den Hefepräparaten führte die hitzebehandelte Variante im Jahr 2011 zu einer geringfügigen Reduktion des Ascosporenpotenzials um 19% (Abb. 16). Das Ethanolpräzipitat und -extrakt der Hefe förderten das Sporenpotenzial des Erregers. Der in den Jahren 2011-2013 verwendete Hefeextrakt LEIBER 6% ergab eine deutliche Wirkungssteigerung und reduzierte die Ascosporenmenge um 39-78% (Abb. 17, 18). Die Behandlungen der Falllaubdepots mit konzentriertem und 30% LEIBER Hefeextrakt führten zu einer nahezu vollständigen Inhibierung des Ascosporenpotenzials (Abb. 18, 19). Die zweimalige Applikation dieser Extrakte zu Beginn oder gegen Ende des Winters reduzierte die Ascosporenmenge um mehr als 90%. Eine einmalige Behandlung mit konzentriertem LEIBER Hefeextrakt bewirkte eine Reduktion des Sporenpotenzials um 74%, eine einmalige Behandlung mit 30% LEIBER Hefeextrakt um 46%. Das Hefepellet der konzentrierten LEIBER Hefe reduzierte das Ascosporenpotenzial um etwa 90%.

Heißwasserauszüge aus Pflanzenmaterialien hatten einen geringen Wirkungsgrad von 4-34%, wobei der Seifenkrautwurzelttee die beste Wirkung zeigte (Abb. 16). Für die mit den Saponinextrakten behandelten Falllaubdepots konnte 2012 eine starke

Förderung nachgewiesen werden (Abb. 17). Einzige Ausnahme war die Behandlung mit der Saponinkombination aus Kastanien- und Waschnussextrakt, bei der das Ascosporenpotenzial etwa zur Hälfte reduziert war. Im Jahr 2013 konnte die Ascosporenmenge durch eine Aescin 1% Behandlung um 90% vermindert werden (Abb. 18), 2014 mit einer höheren Aescinkonzentration von 3% nur um 74%. Die einmalige Applikation von Waschnuss- oder Kastanienextrakt 3% führte zu einer Reduktion der Ascosporenmenge um etwa 40%. Die viermalige Behandlung der Falllaubdepots mit diesen beiden Extrakten hatte keine Reduktion zur Folge.

Die Harnstoffkontrolle bewirkte in allen Versuchsjahren eine fast vollständige Reduktion der Ascosporenpotenzial (Abb. 17, 18, 19). Der Vitamin-Mix verminderte die Ascosporenmenge um 97% (Abb. 17, 18), eine Vitamin B<sub>3</sub> Behandlung um 98% (Abb. 19). Die Kombination aus Vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>6</sub> sowie die 1/1000 Verdünnung des Vitamin-Mix zeigten einen geringeren Effekt. Die verdünnten Vitamin B<sub>3</sub> Behandlungen führten nicht zu einer Reduktion. Die Netzschwefelbehandlung verminderte das Sporenpotenzial um 60% (Abb. 18). Die Behandlung des Falllaubdepots mit dem potenziellen Antagonisten *Leptosphaeria* sp. bewirkte eine Förderung um mehr als das Dreifache gegenüber der Kontrolle. Die pilzlichen Antagonisten *A. pullulans* und *E. nigrum* förderten das Sporenpotenzial in geringem Umfang. *P. synxantha*, *S. pararoseus* und *C. capitatum* reduzierten die Ascosporenmenge um 19-25% (Abb. 19).

Der pH-Wert der applizierten Nährmedien 2010-2014 lag mit 5,0-7,3 im schwach sauren bis neutralen Bereich. Die Vitaminpräparate und die Saponinextrakte wiesen einen sauren pH-Wert von 3,7 und die Tees von 6,0-7,0 auf. Der pH-Wert aller vom Falllaub abgewaschenen wässrigen Suspensionen lag zu Beginn der Ascosporenerife zwischen 5,6 und 7,4.

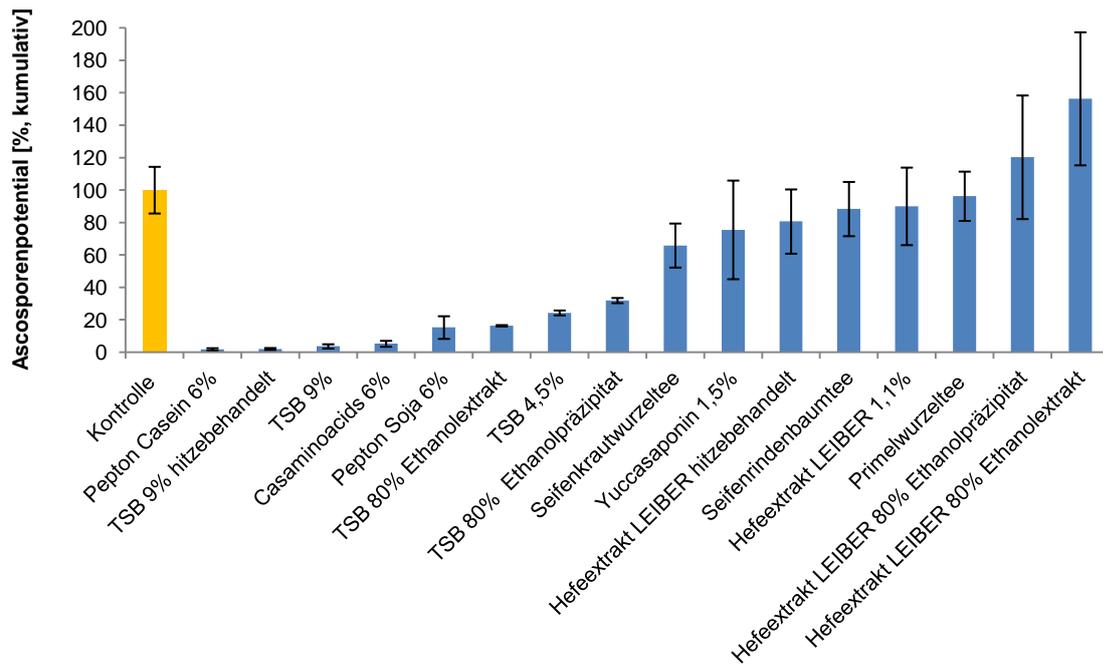


Abb. 16: Kumulatives Ascosporenpotenzial der behandelten Falllaubdepots 2011

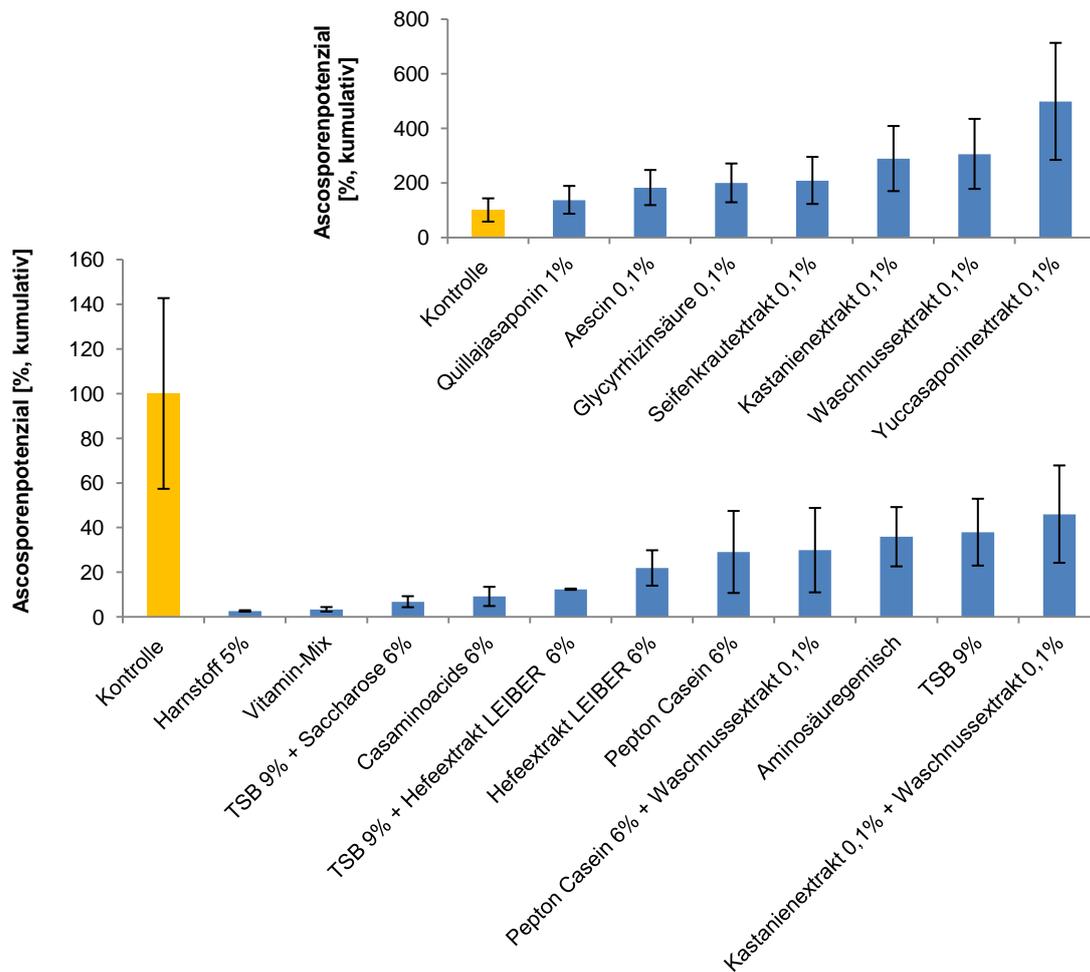
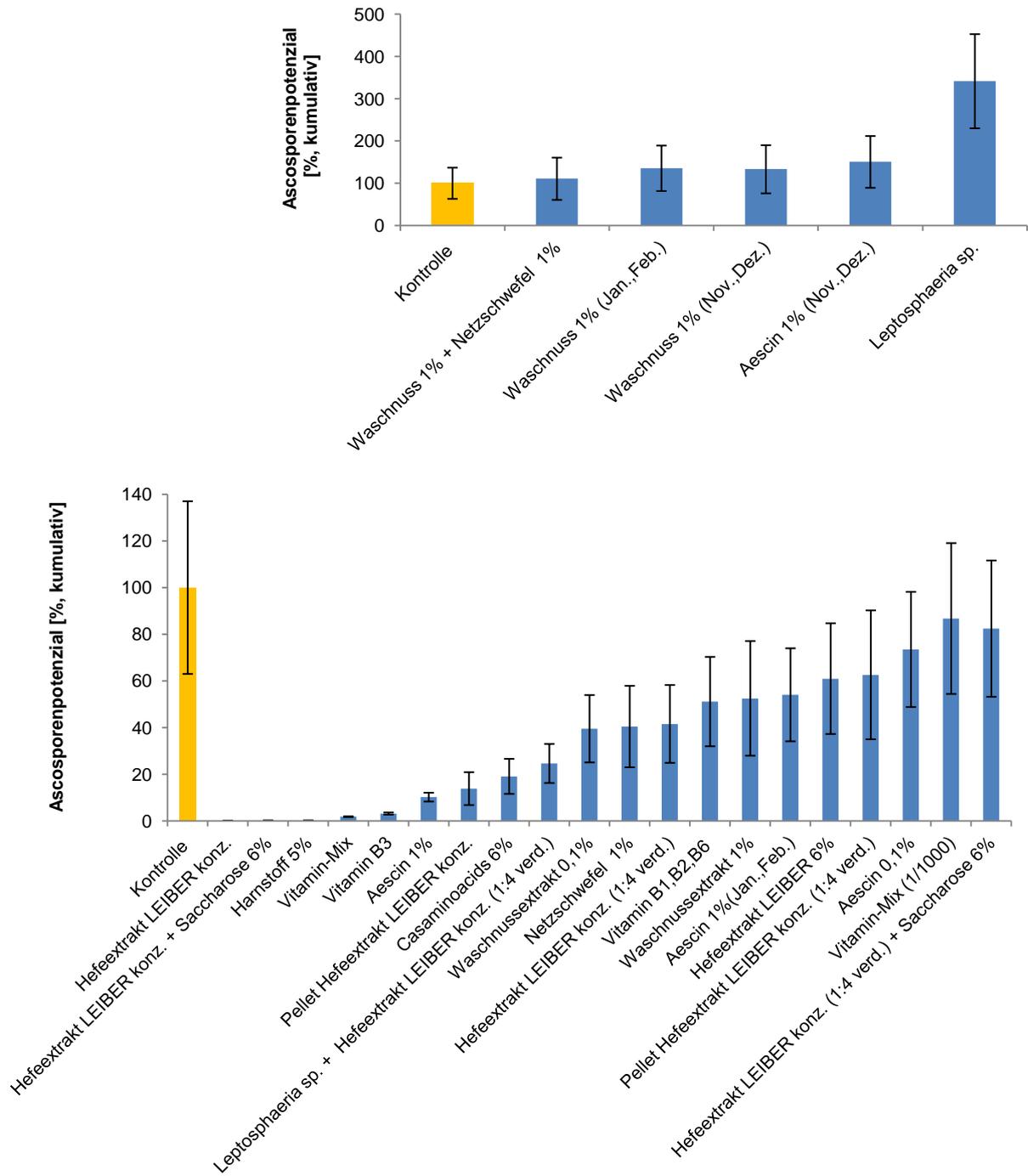
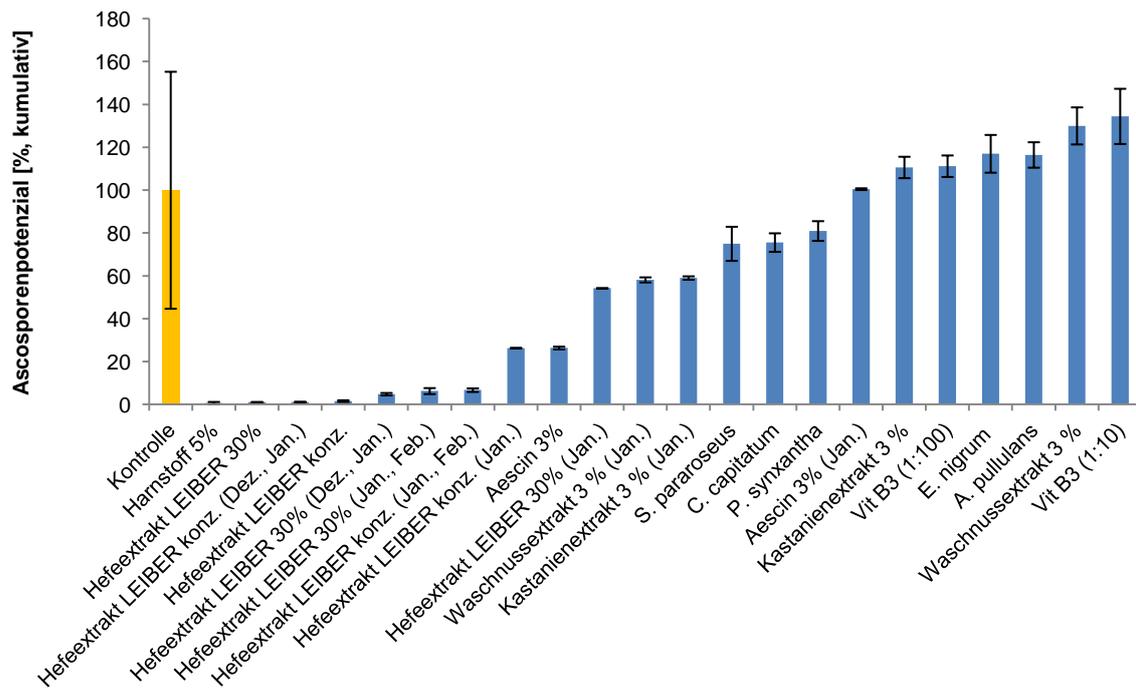


Abb. 17: Kumulatives Ascosporenpotenzial der behandelten Falllaubdepots 2012



**Abb. 18:** Kumulatives Ascosporenpotenzial der behandelten Falllaubdepots 2013



**Abb. 19:** Kumulatives Ascosporenpotenzial der behandelten Falllaubdepots 2014

### 3.2. Makroskopischer Zustand der Falllaubdepots 2011-2014

Im Jahr 2011 konnte eine Korrelation zwischen dem Zeretzungsgrad der Blätter und einem verminderten Ascosporenpotenzial beobachtet werden. Alle Medien auf Basis von Casein sowie die Hefebehandlungen führten zu einem schnelleren Blattabbau. Erste Anzeichen eines verstärkten Falllaubabbaus waren bereits Ende Januar/Anfang Februar erkennbar. Die behandelten 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 6% behandelten Variante am stärksten fortgeschritten. Für die Saponin behandelten Falllaubdepots konnte im Vergleich zur Kontrolle kein schnellerer Blattabbau beobachtet werden.

2012 waren wie im Vorjahr Ende Januar die erste Anzeichen eines verstärkten Blattabbaus zu erkennen, der sich bis zum Beginn der Ascosporenreife steigerte. Der schnellste Abbau konnte bei dem mit Casaminoacids 6% (Abb. 20) und dem mit Pepton Casein 6% behandelten Laub beobachtet werden. Für die Hefe- und TSB-Varianten sowie den Harnstoff und das Aminosäuregemisch konnten leichte Strukturveränderungen gegenüber der Kontrolle dokumentiert werden. In dem Falllaubdepot, das mit dem Vitamin-Mix behandelt wurde, kam es nur zu einem geringfügigen Blattabbau. An einzelnen Blättern waren Ablösungen der Epidermis sichtbar. In den Saponin behandelten Falllaubdepots hatte kein verstärkter Blattabbau stattgefunden.



**Abb. 20:** Bonitur des Blattabbaus der unbehandelten Kontrolle (A) im Vergleich zu den mit Hefeextrakt LEIBER 6% (B), Harnstoff 5% (C), Vitamin-Mix (D), Waschnussextrakt 0,1% (E) und Casaminoacids 6% (F) behandelten Falllaubdepos am 18.04.2012

Im Jahr 2013 konnten bei den mit konzentriertem LEIBER Hefeextrakt und den anderen Hefeextraktvarianten behandelten Blättern, ab Mitte Februar, starke Strukturveränderungen und ein deutlicher Abbau verzeichnet werden. Die mit den Hefepellets behandelten Falllaubdepos wiesen keine Strukturveränderungen auf. Beim Vitamin-Mix konnten Anzeichen eines schnelleren Blattabbaus nachgewiesen werden. Die Behandlungen mit Vitamin B<sub>3</sub> und der Vitamin-Kombination B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> zeigte dagegen keinen Effekt. Casaminoacids 6% und Hefeextrakt LEIBER 6% bewirkten Abbauprozesse wie beim Harnstoff (Abb. 21). Die Saponin-, Netzschwefel- und Vitamin-Mix-Varianten konnten den natürlichen Blattabbau nicht verstärken.



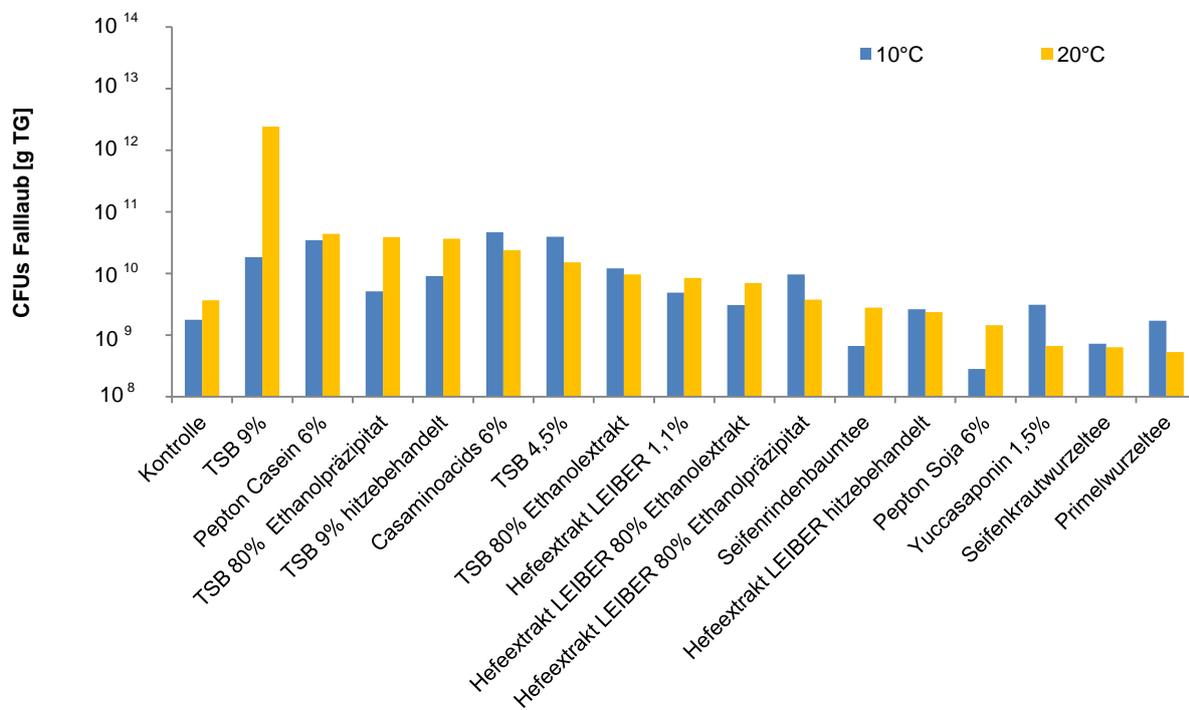
**Abb. 21:** Bonitur des Blattabbaus der unbehandelten Kontrolle (A) im Vergleich zu den mit Hefeextrakt LEIBER konzentriert (B), Harnstoff 5% (C), Vitamin-Mix (D), Aescin 1% (E) und Casaminoacids 6% (F) behandelten Falllaubdepots am 27.03.2013

Im Jahr 2014 konnten nur bei den mit LEIBER Hefeextrakt behandelten Varianten Strukturveränderungen der Blätter nachgewiesen werden. Die ersten Anzeichen eines verstärkten Abbaus waren Ende Februar bei den Varianten Hefeextrakt LEIBER konz. und Hefeextrakt LEIBER 30% zu erkennen. Ende März war der Abbau des behandelten Falllaubs weiter vorangeschritten. Die viermal behandelten Blätter wiesen die stärksten, die einmal behandelten die schwächsten Zersetzungserscheinungen auf. Die Behandlungen des Falllaubs mit Antagonisten und Saponinextrakten konnte die Zersetzungsprozesse nicht fördern.

### 3.3. Einfluss der Falllaubbehandlung auf die Mikroorganismen

#### 3.3.1. Koloniebildende Einheiten

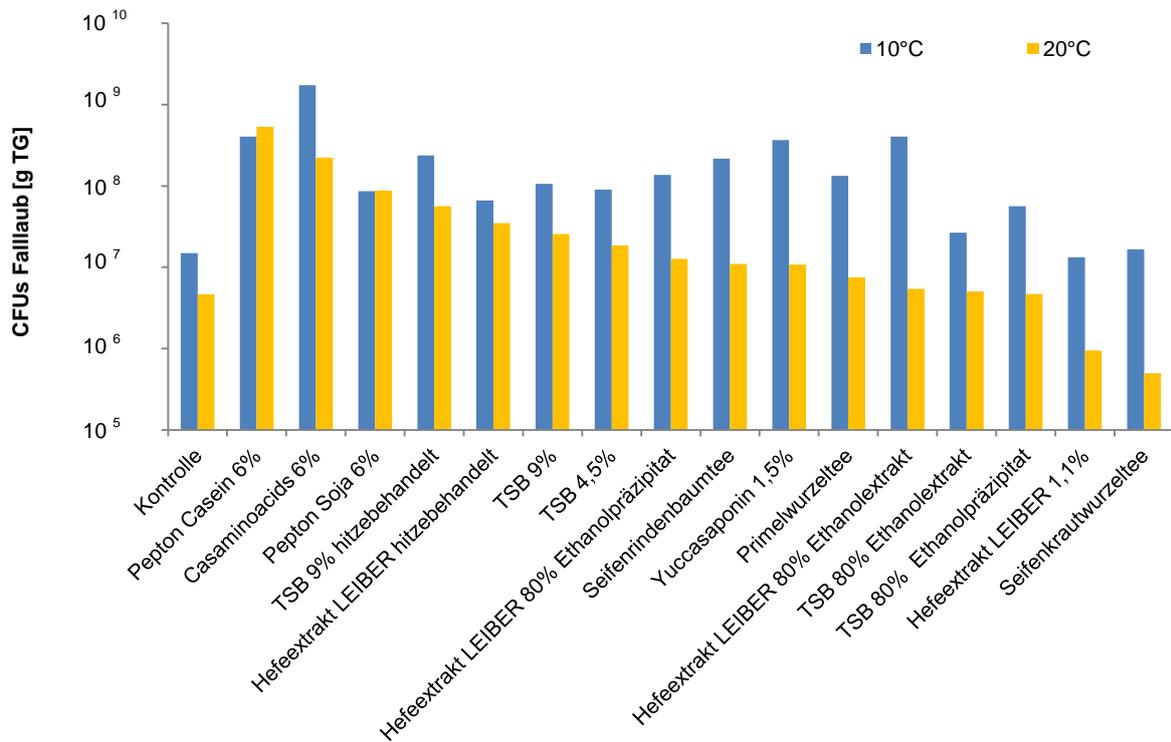
Auf den unbehandelten Blättern der Kontrolle konnten am 08.03.2011, bei einer Kultivierungstemperatur von 10°C,  $1,8 \cdot 10^9$  CFUs der Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 22). Bei einer Temperatur von 20°C war die Anzahl der Kolonien mit  $3,7 \cdot 10^9$  CFUs etwa doppelt so hoch. Die Behandlung des Falllaubs mit Caseinpräparaten führte zu einem Anstieg der CFUs. Bei einer Temperatur von 10°C wiesen die mit den Casaminoacids 6% behandelten Blätter, bei 20°C die mit TSB 9% behandelten, die meisten CFUs auf. Die Hefepräparate bewirkten unabhängig von der Inkubationstemperatur eine leichte Förderung der bakteriellen Gemeinschaft. Saponine konnten das Wachstum der Bakterien nicht fördern.



**Abb. 22:** Koloniebildende Bakterien auf TSA bei 10/20°C am 08.03.2011

Die Anzahl der CFUs bei den Pilzen war niedriger als bei den Bakterien. Bei einer Inkubationstemperatur von 10°C konnten  $1,5 \cdot 10^7$  CFUs/g Falllaub, bei einer Temperatur von 20°C  $4,65 \cdot 10^6$  CFUs/g Falllaub gezählt werden (Abb. 23). In den behandelten Blattdepots war die Anzahl der koloniebildenden Pilze, mit Ausnahme des Hefeextrakt LEIBER 1,1% und Seifenkrautwurzeltree behandelten, höher. Auf den mit Casaminoacids 6% behandelten Blättern konnten bei einer Temperatur von 10°C mit  $1,73 \cdot 10^9$  die meisten CFUs gezählt werden. In den mit anderen Caseinpräparaten sowie dem Ethanolextrakt und -präzipitat des LEIBER Hefeextraktes behandelten Blattdepots konnten etwa zehnmal mehr CFUs als in der Kontrolle nachgewiesen werden. Bei einer Inkubationstemperatur von 20°C wurden weniger Pilzkolonien

quantifiziert. Die meisten konnten im Pepton Casein 6% behandelten Falllaubdepot mit  $5,37 \cdot 10^9$  CFUs nachgewiesen werden.



**Abb. 23:** Koloniebildende Pilze auf PDA bei 10/20°C am 08.03.2011

Die Verwendung eines Actinomycetenagars führte nicht zur Isolierung dieser Mikroorganismen. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wuchsen nur sehr kleine, makroskopisch nicht unterscheidbare Bakterienkolonien, die mit MALDI-TOF (s. 2.6.1.) als Pseudomonaden identifiziert wurden.

Im Versuchsjahr 2011/2012 konnten Ende Februar auf den Blättern der Kontrolle mit  $1,5 \cdot 10^9$  CFUs/g Falllaub deutlich weniger Bakterien als Ende April mit  $4,2 \cdot 10^9$  CFUs/g Falllaub bestimmt werden (Abb. 24). In der Tendenz wiesen auch die behandelten Falllaubdepots eine größere Anzahl CFUs zu Beginn der Ascosporenreife als Ende Februar auf. In der Variante TSB 9% konnten etwa zehnmal mehr CFUs im April, als im Februar nachgewiesen werden. An beiden Terminen war die Anzahl der Falllaubbewohner in den LEIBER Hefeextrakt 6% behandelten Blättern gegenüber der Kontrolle stark gefördert. TSB 9% + Saccharose 6%, die Casaminoacids 6% und Pepton Casein 6% führten ebenfalls zu einer Erhöhung der CFUs. Der Vitamin-Mix zeigte einen geringen Effekt. Im Februar war die Anzahl der CFUs niedriger, im April gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Bei den mit Saponinen behandelten Blättern lagen die CFUs im Bereich der Kontrolle oder darunter. Einzige Ausnahme war die Behandlung mit Kastanienextrakt 0,1%, bei der im Februar etwa so viele Falllaubbewohner wie in der Kontrolle nachgewiesen werden konnten. Im April war Zahl der CFUs mit  $5,5 \cdot 10^{10}$  auf das Zehnfache gegenüber der Kontrolle angewachsen.

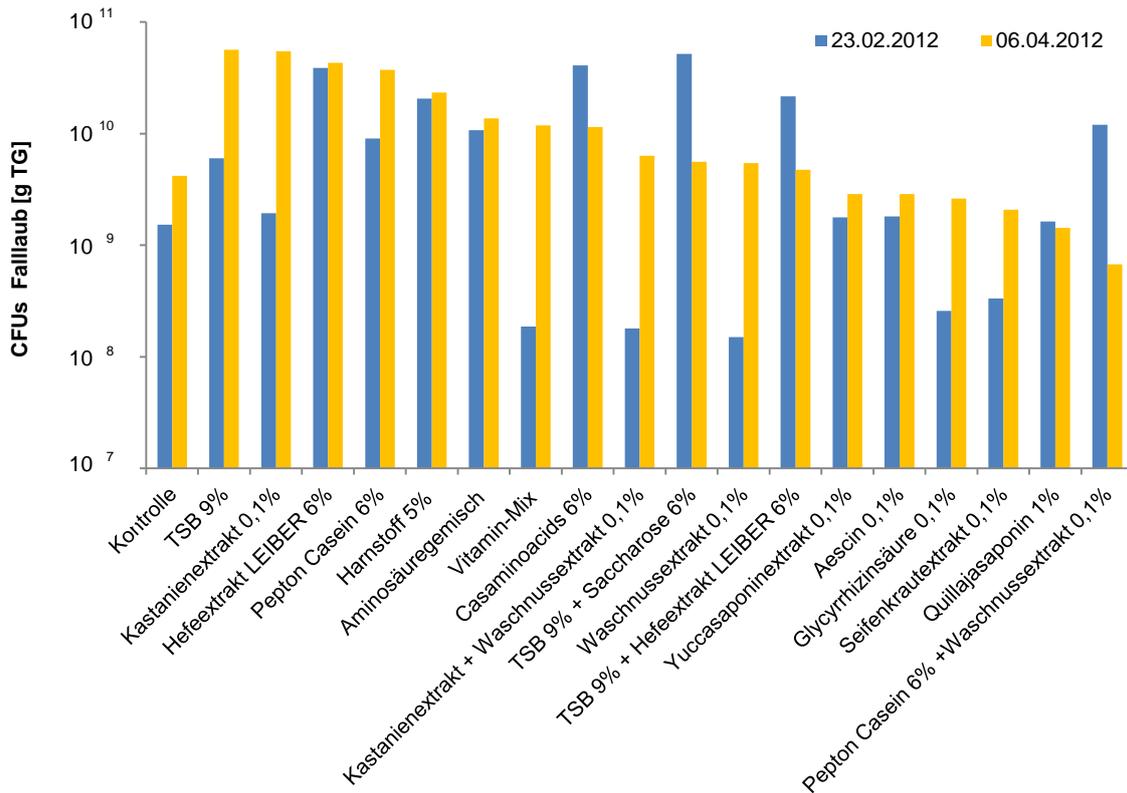


Abb. 24: Koloniebildende Bakterien am 23.02.2012 und 06.04.2012

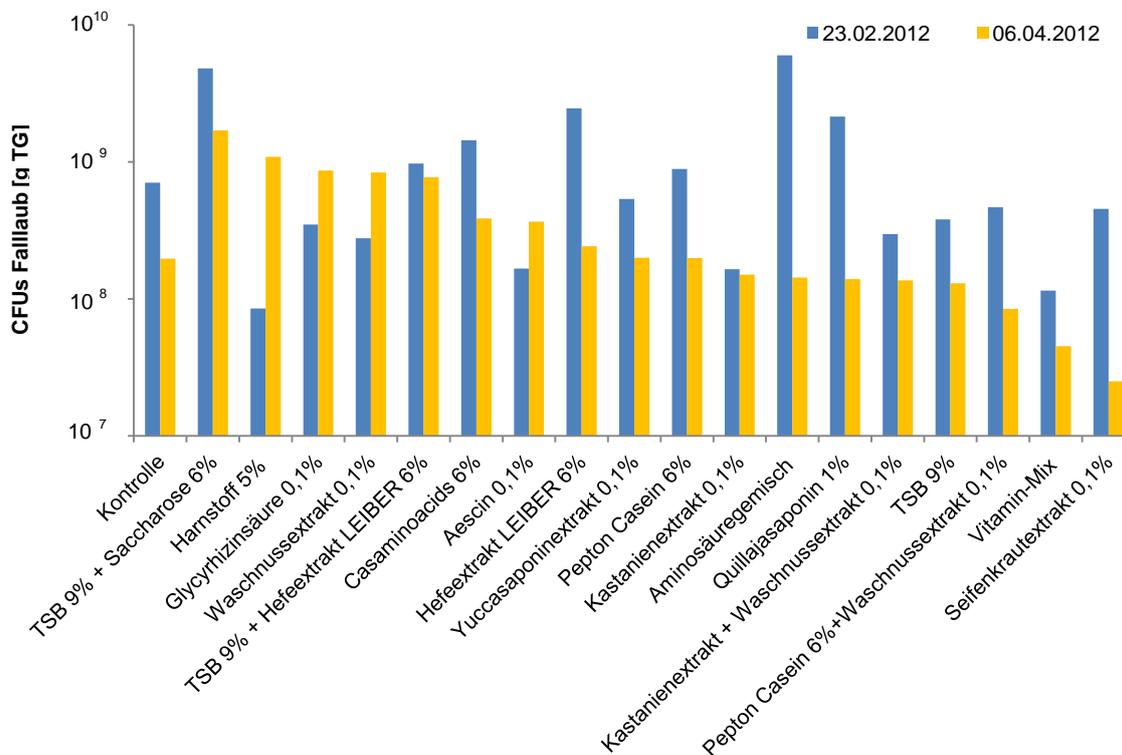
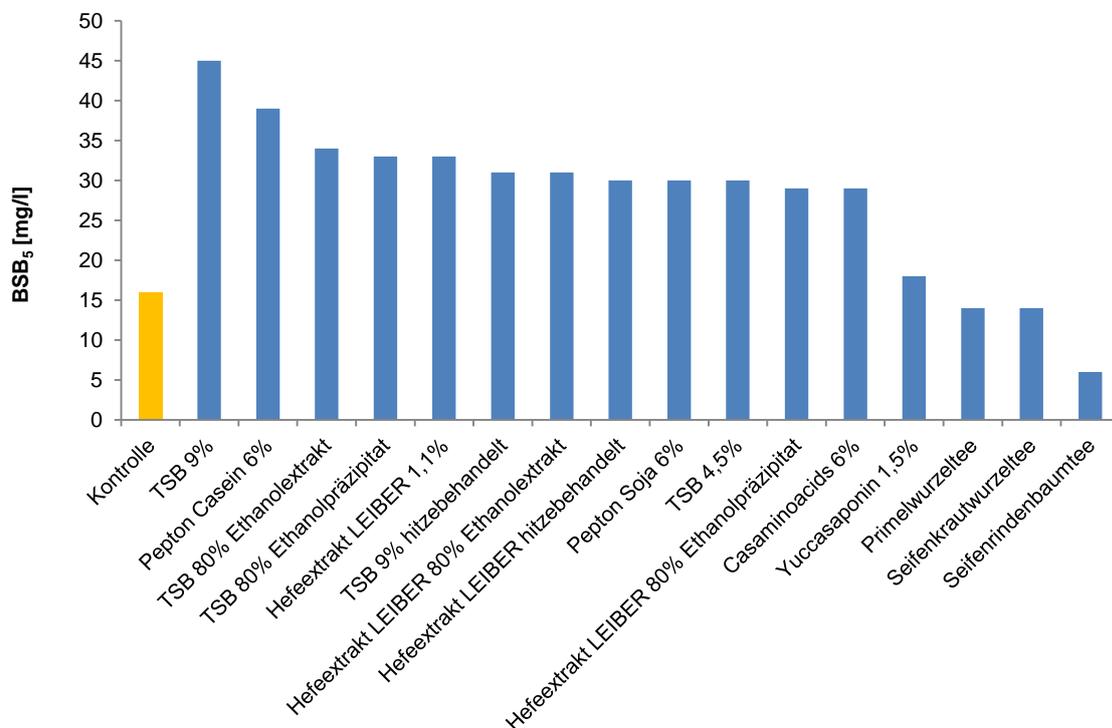


Abb. 25: Koloniebildende Pilze am 23.02.2012 und 06.04.2012

Die Anzahl der Pilzkolonien im Falllaub nahm zum Beginn der Ascosporenreife ab. Im Februar konnten  $7 \cdot 10^8$  CFUs, im April  $2 \cdot 10^8$  CFUs nachgewiesen werden (Abb. 25). Dieser Trend konnte auch in den Falllaubproben, bei denen die pilzlichen Kolonien deutlich über denen der Kontrolle lagen, wie dem Aminosäuregemisch, den Casaminoacids, den TSB-Varianten und dem LEIBER Hefeextrakt beobachtet werden. Die Saponin- und Vitaminbehandlungen konnten im Februar nicht zu einer Förderung der CFUs beitragen. Im April wurde bei den 0,1%igen Varianten des Waschnussextraktes, der Glycyrrhizinsäure und des Yuccasaponinextraktes eine Förderung der pilzlichen Blattbewohner beobachtet. Die mit Seifenkrautextrakt 0,1% und dem Vitamin-Mix behandelten Falllaubdepots wiesen etwa zehnfach weniger CFUs als die unbehandelten Blätter auf.

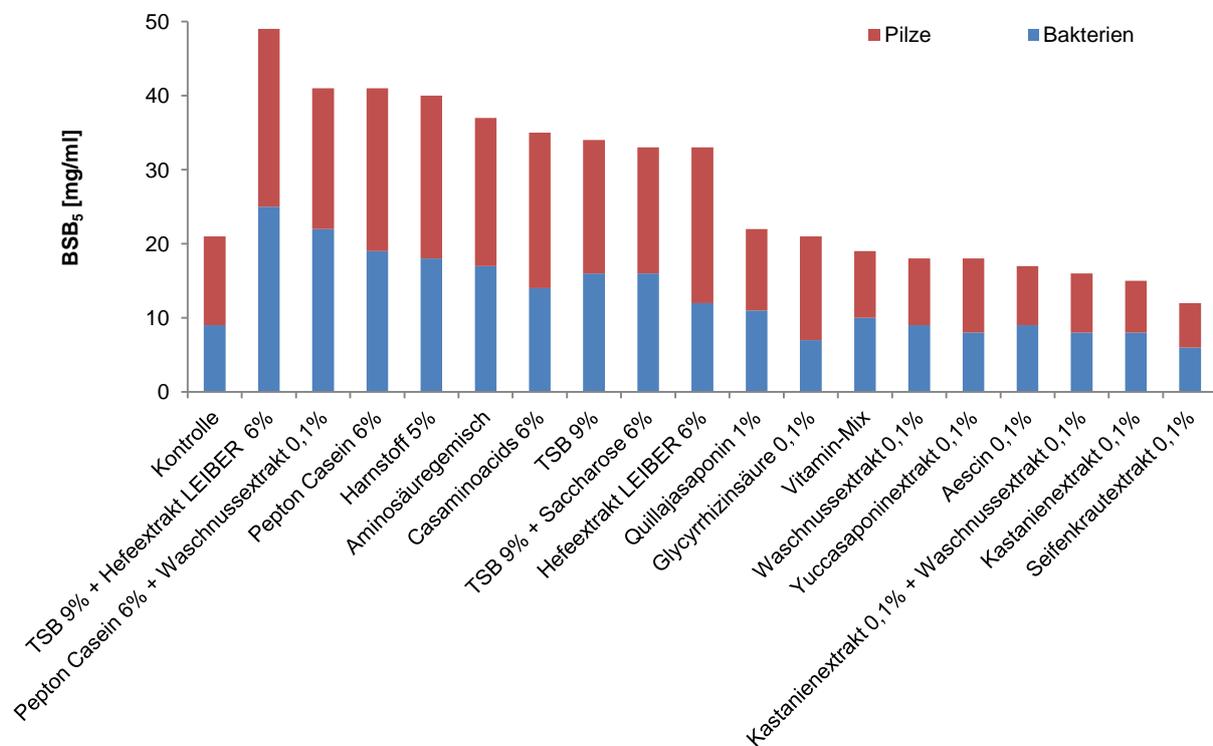
### 3.3.2. Biologischer Sauerstoffbedarf

Der biologische Sauerstoffbedarf der Falllaubbesiedler lag zu Beginn der Ascosporenreife im Jahr 2011 bei 16 mg/ml (Abb. 26). Die mit TSB 9% und Pepton Casein 6% behandelten Blätter wiesen mit 45 und 39 mg/ml eine höhere mikrobielle Aktivität auf. Für alle anderen Casein- und Hefevarianten war der  $BSB_5$  gegenüber der Kontrolle ebenfalls erhöht und lag im Bereich von 29 bis 34 mg/ml. Auf den mit Saponinen behandelten Blättern konnte keine Förderung der mikrobiellen Aktivität nachgewiesen werden.

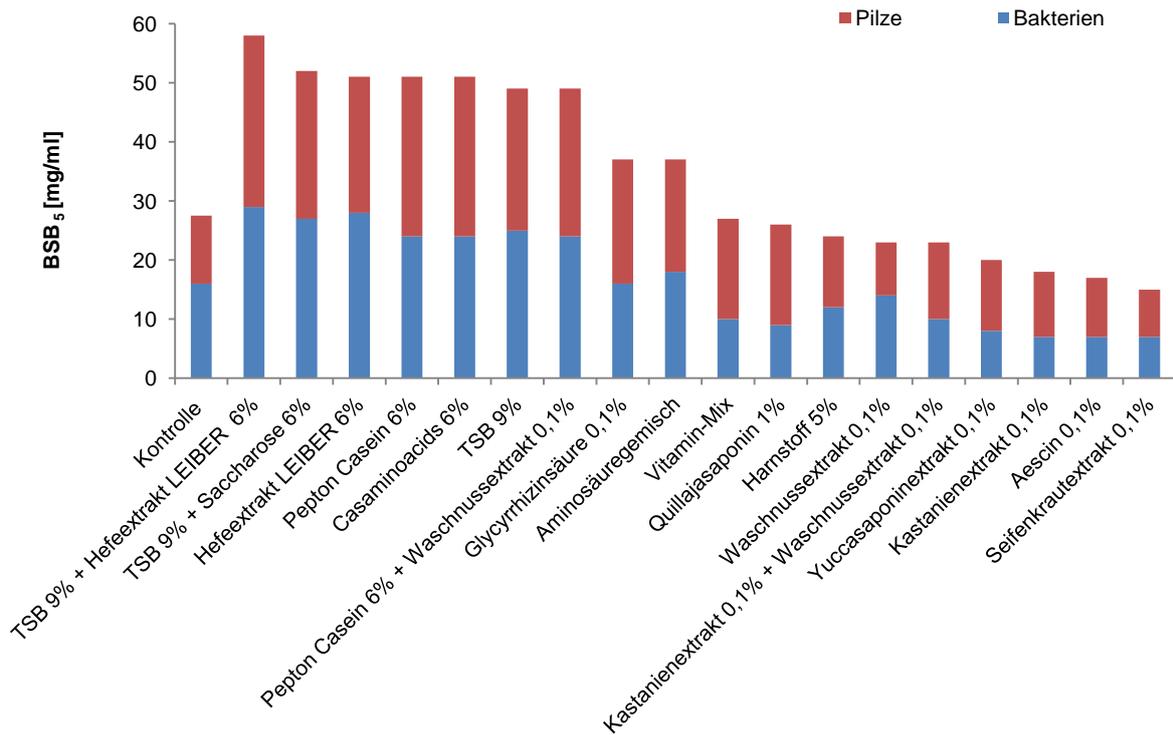


**Abb. 26:** Sauerstoffbedarf [mg/ml] der behandelten Falllaubdepots am 24.03.2011

Im Winter (19.12.11) lag der biologische Sauerstoffbedarf der Bakterien und Pilze auf den unbehandelten Blättern der Kontrolle bei 9 bzw. 12 mg/ml (Abb. 27). Die stärkste Förderung der mikrobiellen Aktivität konnte für die mit TSB 9% + Hefeextrakt LEIBER 6% behandelten Blätter nachgewiesen werden. Der BSB<sub>5</sub> der Bakterien betrug 25 mg/ml, der der Pilze 24 mg/ml. Die anderen Casein- und Hefemedien sowie Harnstoff führten ebenfalls zu einem Anstieg des biologischen Sauerstoffbedarfes. Für die mit dem Vitamin-Mix und den Saponinen behandelten Blätter lag der BSB<sub>5</sub> der Pilze und Bakterien im Bereich der Kontrolle oder darunter. Kurz vor Beginn der Ascosporenreife (30.03.2012) war die mikrobielle Aktivität in den behandelten Falllaubdepots, mit Ausnahme vom Harnstoffdepot, weiter angestiegen (Abb. 28). Der biologische Sauerstoffbedarf der unbehandelten Blätter betrug für die Bakterien 16 mg/ml und für die Pilze 12 mg/ml. Die höchste mikrobielle Aktivität konnte, wie am 19.12.2011, 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 BSB<sub>5</sub> der Bakterien zwischen 18-28 mg/ml, der der Pilze zwischen 19-25 mg/ml. Die beiden saponinbehandelten Varianten Glycyrrhizinsäure und Quillajasaponin wiesen im Vergleich zur Kontrolle einen höheren biologischen Sauerstoffbedarf bei den Pilzen auf. Alle anderen Saponinvarianten und der Vitamin-Mix zeigten sowohl bei den Bakterien als auch bei den Pilzen eine niedrigere oder mit der Kontrolle vergleichbare mikrobielle Aktivität.



**Abb. 27:** Sauerstoffbedarf [mg/ml] der Pilze und Bakterien im Falllaub unter Einfluss von Cyloheximid bzw. Chloramphenicol am 19.12.2011



**Abb. 28:** Sauerstoffbedarf [mg/ml] der Pilze und Bakterien im Falllaub unter Einfluss von Cyloheximid bzw. Chloramphenicol am 30.03.2012

Für die LEIBER Hefeextraktvarianten 2012/2013 und die Casaminoacids 6% war der biologische Sauerstoffbedarf der Mikroorganismen drei Wochen nach der ersten Falllaubbehandlung (12.12.2012) deutlich erhöht (Abb. 29). Alle anderen Behandlungsvarianten konnten nicht zu einer Förderung der mikrobiellen Aktivität beitragen. Im Saisonverlauf (02.04.2013) stieg der Sauerstoffbedarf in den Falllaubdepots an oder lag im Bereich der BSB<sub>5</sub>-Werte vom 12.12.2012 (Abb. 30). Die Hefebehandlungen bewirkten eine mehrfache Zunahme des Sauerstoffbedarfes. Die mit den Saponinextrakten behandelten Blätter wiesen eine höhere mikrobielle Aktivität als im Winter auf. Der Sauerstoffbedarf in den mit Vitamin und dem mit *Leptosphaeria* sp. behandelten Blattdepots lag im Bereich der Kontrolle oder darunter.

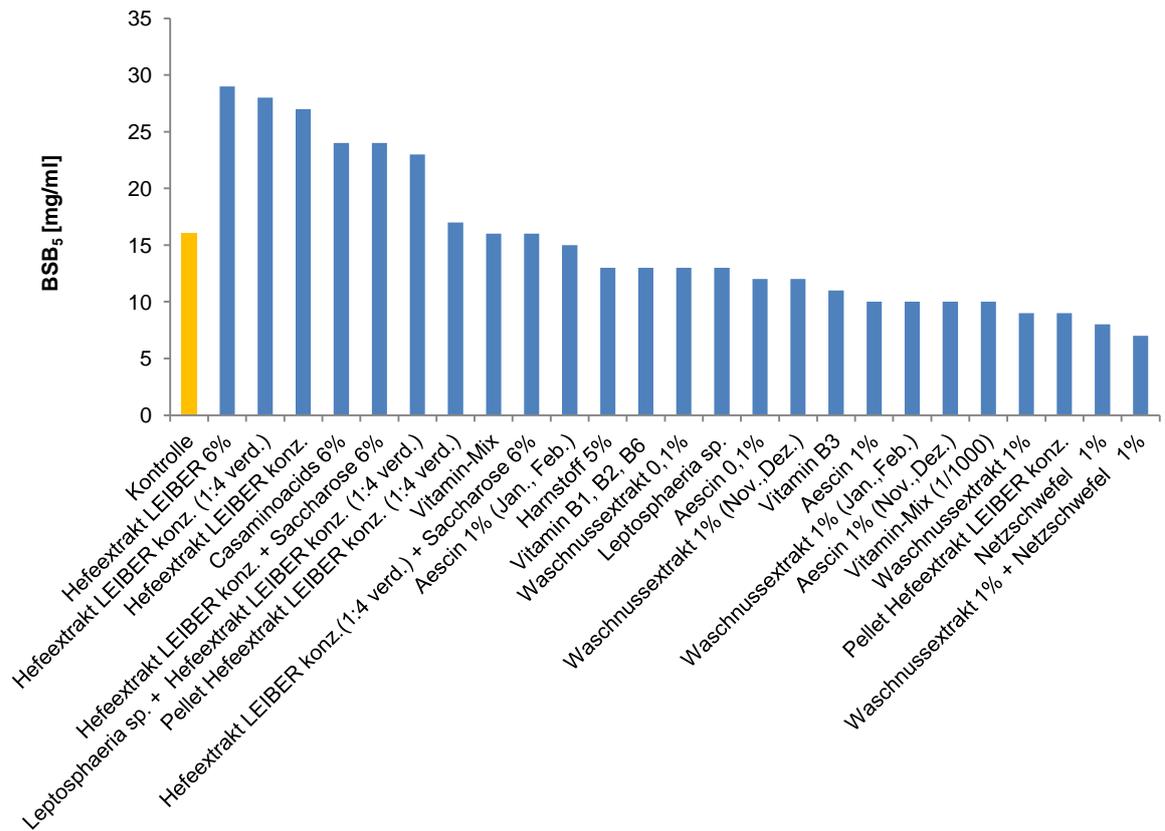


Abb. 29: Sauerstoffbedarf [mg/ml] der behandelten Falllaubdepots am 12.12.2012

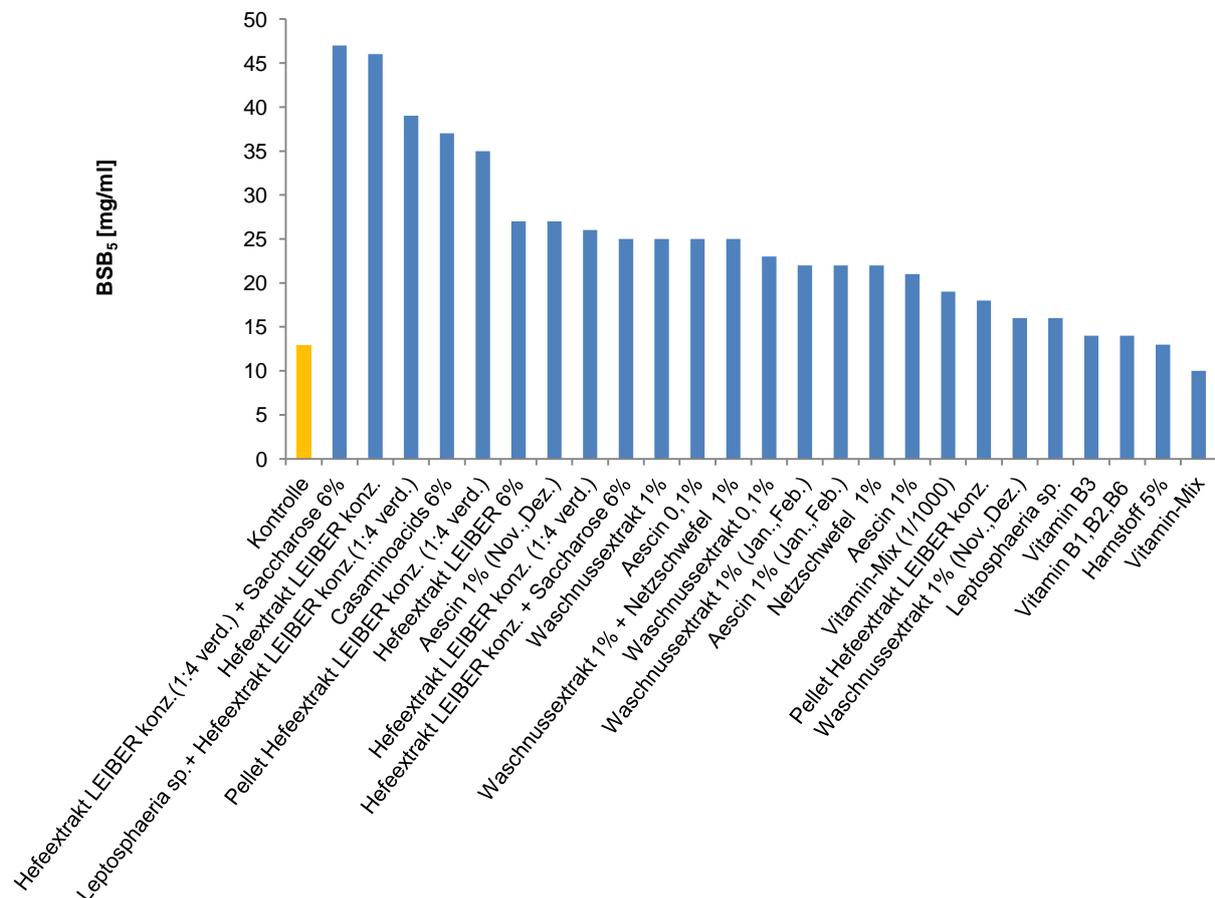
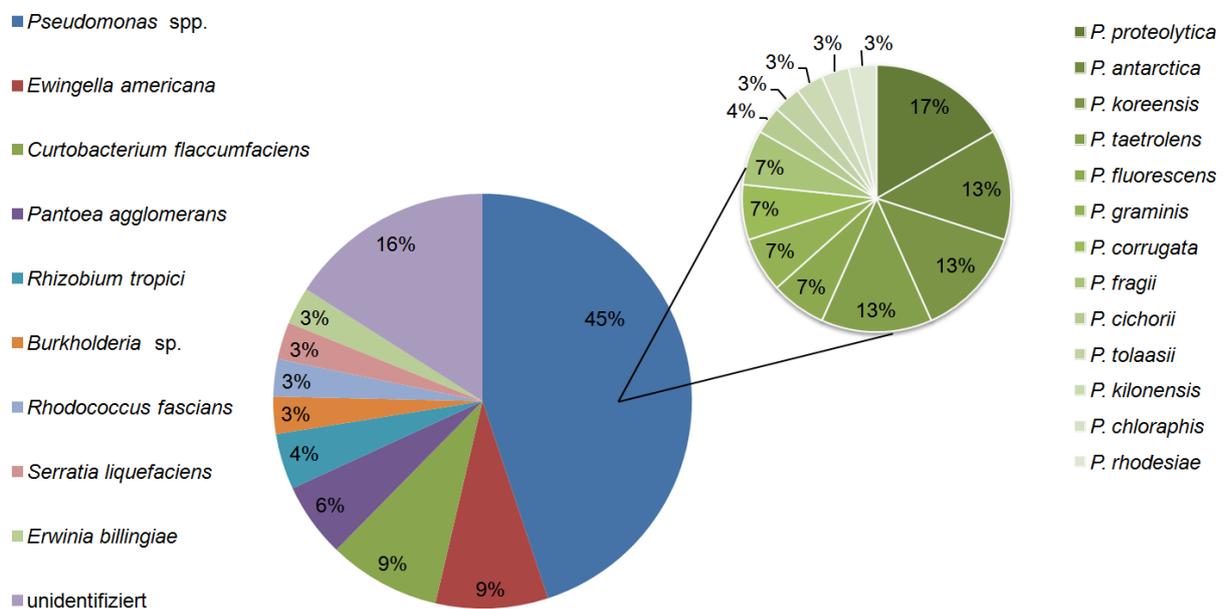


Abb. 30: Sauerstoffbedarf [mg/ml] der behandelten Falllaubdepots am 02.04.2013

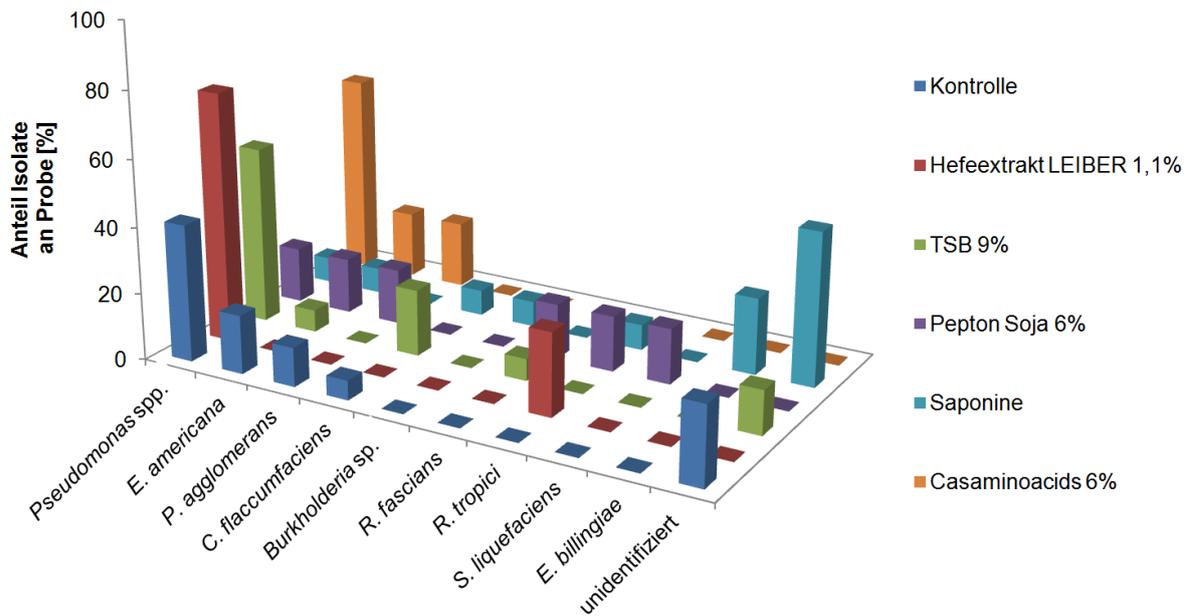
### 3.4. Charakterisierung der mikrobiellen Falllaubbesiedler

Von den unbehandelten und behandelten Falllaubdepots wurden im Jahr 2010/2011 69 Bakterien isoliert. Mit MALDI-TOF konnten 45% der Isolate der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet werden (Abb. 31). Es wurden 13 verschiedene Pseudomonaden identifiziert, wobei *P. proteolytica*, *P. antarctica*, *P. koreensis* und *P. taetrolens* die dominanten Vertreter darstellten. Die Arten *Ewingella americana* und *Curtobacterium flaccumfaciens* hatten einen Anteil von 9% an der bakteriellen Gemeinschaft des Falllaubs. *Pantoea agglomerans* und *Rhizobium tropici* stellten jeweils 6 bzw. 4% der Bakterienisolate dar. Alle anderen identifizierten Gattungen und Arten kamen nur vereinzelt in den Proben vor.



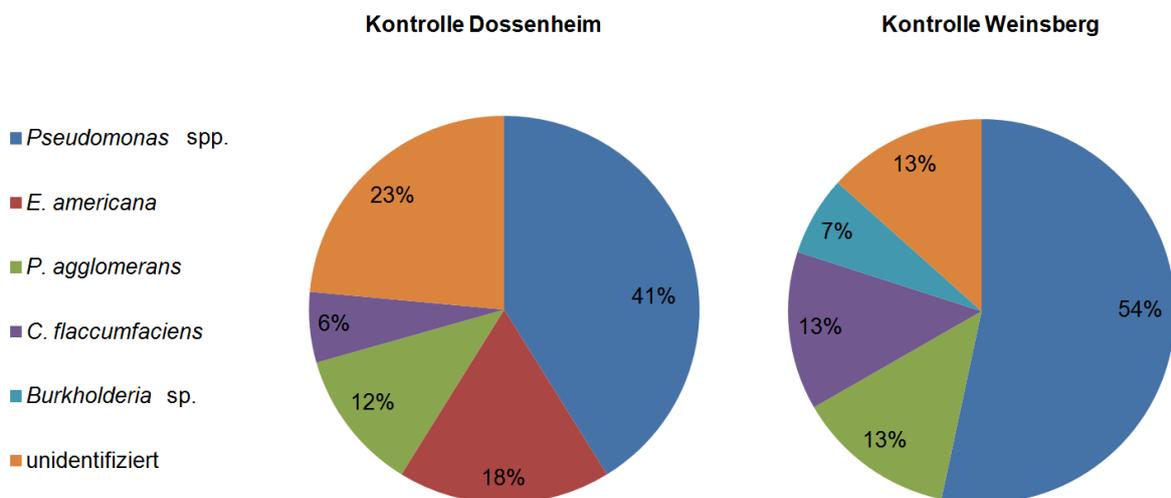
**Abb. 31:** Identifizierte Bakteriengattungen/-arten aus der Gesamtzahl der Isolate 2010/2011

Die Anzahl und Verteilung der identifizierten Bakterienarten und -gattungen auf den Casaminoacid 6% und TSB 9% behandelten Blättern entsprach annähernd der Kontrolle (Abb. 32). Die Falllaubbesiedler der Pepton Soja 6% und Saponin behandelten Blätter wiesen eine größere Artenvielfalt auf, wobei der Anteil der jeweiligen Arten/Gattungen an der Gemeinschaft etwa gleich groß war. Von dem mit Hefeextrakt 1,1%, Casaminoacids 6% und TSB 9% behandelten Falllaub konnten 20-40% mehr Pseudomonaden als von unbehandelten Blättern isoliert werden.



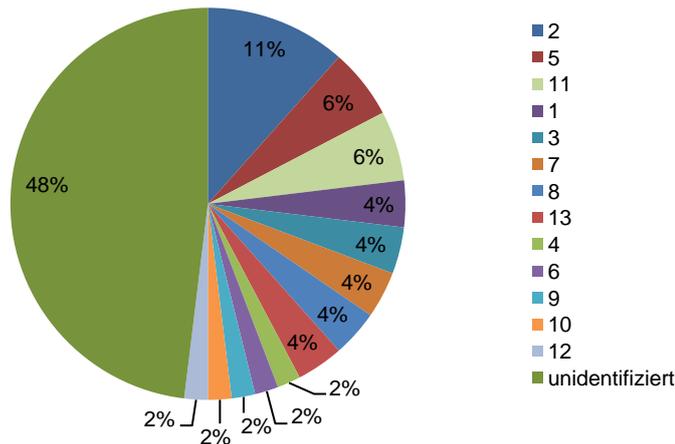
**Abb. 32:** Bakterienarten und -gattungen aus den unterschiedlich behandelten Blattdepots 2010/11

Die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaft auf den unbehandelten Blättern an den Standorten Dossenheim und Weinsberg ist in Abb. 33. vergleichend dargestellt. Die Pseudomonaden waren mit 41 bis 54% der Falllaubbewohner an beiden Standorten die dominante Gattung. In Dossenheim stellte *E. americana* mit 18% die zweitwichtigste Art. In Weinsberg konnte das Vorkommen von *E. americana* nicht nachgewiesen werden. An beiden Standorten wurden 12-13% der Isolate als *P. agglomerans* identifiziert. Vertreter der Gattung *Burkholderia* hatten in Weinsberg einen Anteil von 7% in der Bakteriengemeinschaft. In Dossenheim konnte *Burkholderia* sp. nicht von unbehandelten Blättern isoliert werden.



**Abb. 33:** Bakterienarten und -gattungen in der bakteriellen Gemeinschaft des Falllaubs in Dossenheim und Weinsberg

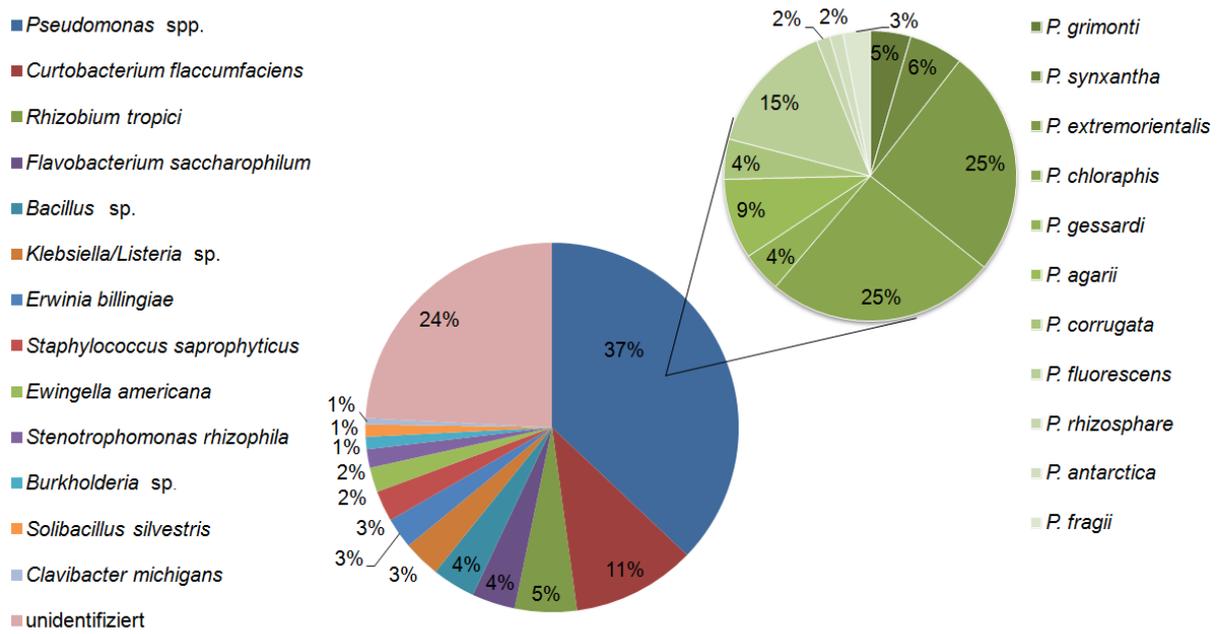
Die 52 vom Falllaub isolierten Pilze konnten mit MALDI-TOF 13 verschiedenen Gruppen zugeordnet werden (Abb. 34). Eine genaue Identifizierung der Gattungen und Arten war nicht möglich, da am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Heidelberg zum Abgleich der Proteinspektren nur eine Datenbank mit humanpathogenen Pilzen zur Verfügung stand. Die identifizierten Gruppen hatten einen Anteil von 2-6% an der mikrobiellen Gemeinschaft des Falllaubs. Isolate der Gruppe 2 waren mit 11% häufiger vertreten.



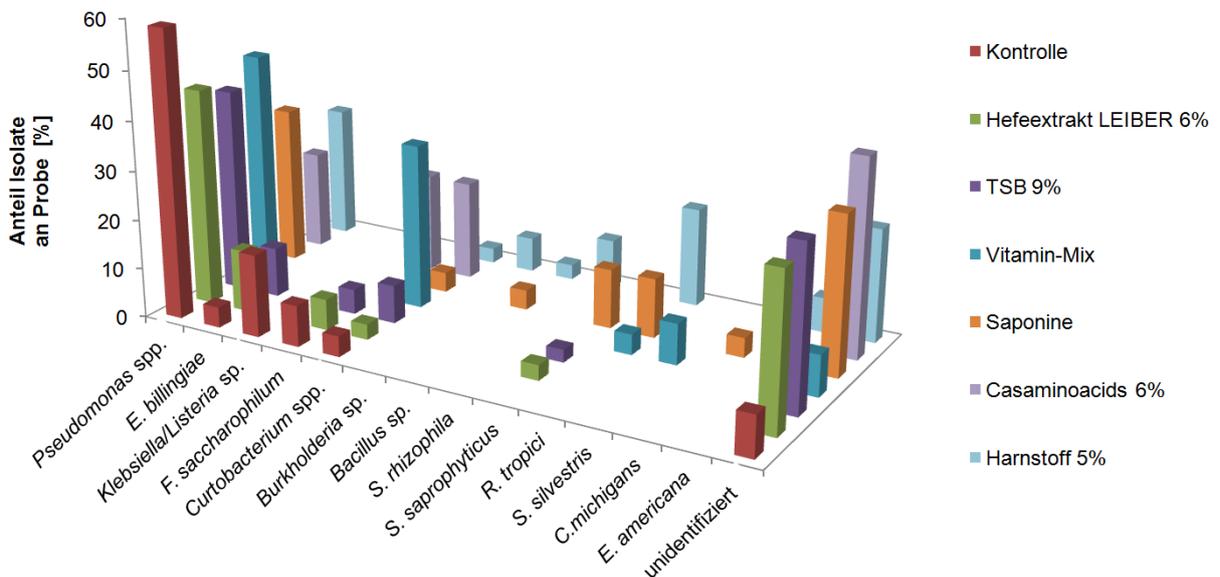
**Abb. 34:** Identifizierte Pilzgattungen/-arten aus der Gesamtzahl der Isolate 2010/2011

Im Versuchsjahr 2011/2012 wurden 186 Bakterienisolate von den Blättern gewonnen. Die Pseudomonaden waren mit 37% der Isolate die dominante Gruppe (Abb. 35). Der Gattung konnten 11 Arten zugeordnet werden, von denen *P. grimonti* und *P. synxantha* zusammen 50% der Isolate stellten. *C. flaccumfaciens* hatte einen Anteil von 11%, *R. tropici* von 5% an der bakteriellen Gemeinschaft des Falllaubs. Es konnten 10 weitere Gattungen/Arten identifiziert werden, die zusammen 24% der Gemeinschaft darstellten.

Die Isolate aus den einzelnen Falllaubdepots zeigten eine ähnliche Zusammensetzung der Gattungen und Arten (Abb. 36). Die Pseudomonaden waren mit 20-58% die dominante Gattung. Bei der Kontrolle, dem LEIBER Hefeextrakt 6%, TSB 9% und dem Vitamin Mix lag der Anteil der Pseudomonaden an der mikrobiellen Gemeinschaft bei über 40%. In den TSB 9% und Hefeextrakt 6% behandelten Blattdepots entsprach der Anteil der jeweiligen Bakterienarten und -gattungen etwa denen der Kontrolle. Auf den Blättern, die mit dem Vitamin Mix behandelt wurden, konnten die Curtobacterien als dominante Gattung identifiziert werden. Bei den Saponin- und den Harnstoffbehandlungen wurde das Vorkommen von vier weiteren Bakterienarten nachgewiesen.

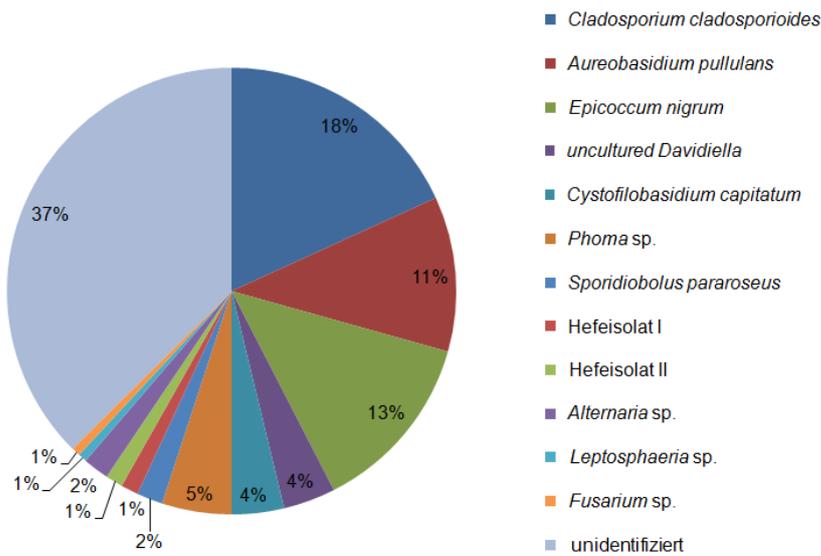


**Abb. 35:** Identifizierte Bakteriengattungen/-arten aus der Gesamtzahl der Isolate 2011/2012



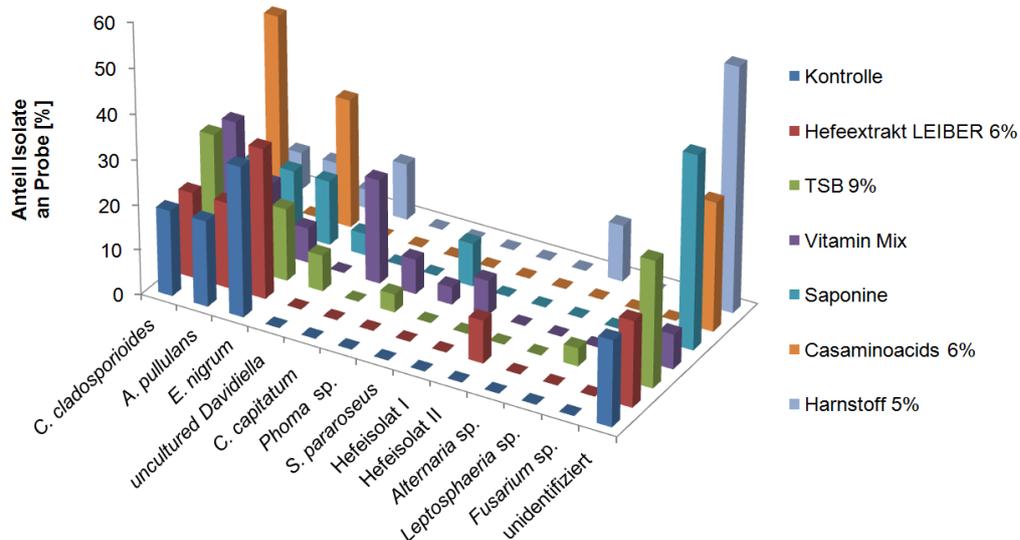
**Abb. 36:** Bakterienarten und -gattungen aus den unterschiedlich behandelten Blattdepots 2011/12

Die 150 Pilzisolat konnten 12 verschiedenen Gattungen/Arten zugeordnet werden (Abb. 37). *Cladosporium cladosporioides* war mit einem Anteil von 18% die dominante Art auf dem schorfbefallenen Falllaub. *Aureobasidium pullulans* hatte einen Anteil von 11%, *Epicoccum nigrum* von 13%. Die einzelligen Hefen *Sporidobolus pararoseus*, *Cystofilobasidium capitatum* und zwei weitere Hefeisolate, die nicht näher bestimmt wurden, stellten zusammen 8% der Pilzisolat dar. Andere Gattungen und Arten kamen nur vereinzelt auf den Blättern vor.



**Abb. 37:** Identifizierte Pilzgattungen/-arten aus der Gesamtzahl der Isolate 2011/2012

*C. cladosporioides* und *E. nigrum* konnten von allen Falllaubdepots isoliert werden (Abb. 38). Die Behandlung der Blätter mit den Casaminoacids 6% förderte die Population von *C. cladosporioides* um 24%. Das Vorkommen von Hefen konnte in den mit Hefeextrakt LEIBER 6%, den Vitamin-Mix und Saponin behandelten Blättern nachgewiesen werden. Die Pseudomycel bildende Art *A. pullulans* konnten von diesen Depots ebenfalls isoliert werden, so wie von der Kontrolle, den TSB und Hefeextrakt behandelten Blättern. Die anderen Pilzarten und -gattungen konnten nur vereinzelt aus den Falllaubdepots isoliert werden. Die Behandlung der Blätter mit dem Vitamin-Mix führte zu einer höheren Artendiversität der Pilze.

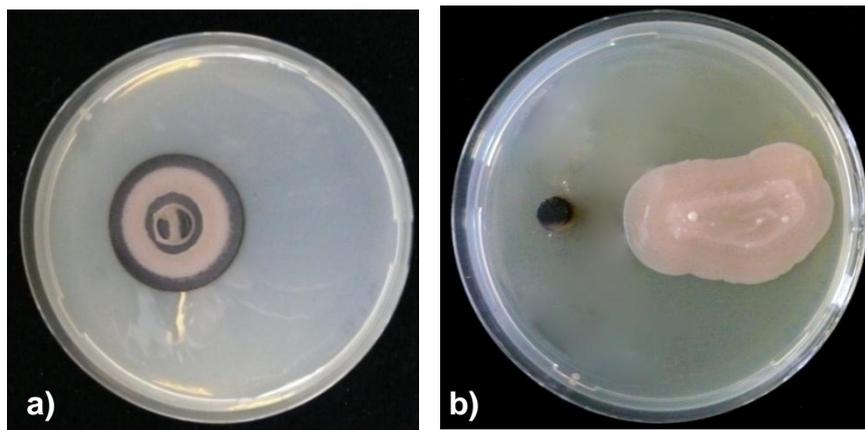


**Abb. 38:** Pilzarten und -gattungen aus den unterschiedlich behandelten Blattdepots 2011/12

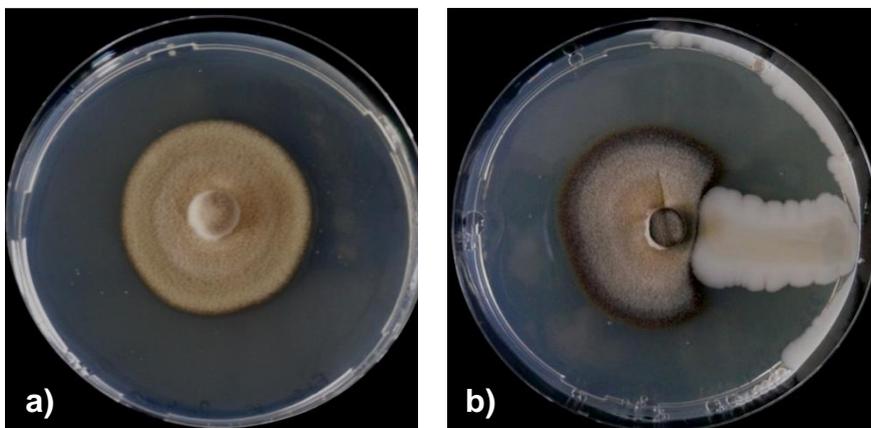
### 3.5. Analyse des hemmenden Potenzials von Antagonisten

#### 3.5.1. Dualkultur-Test

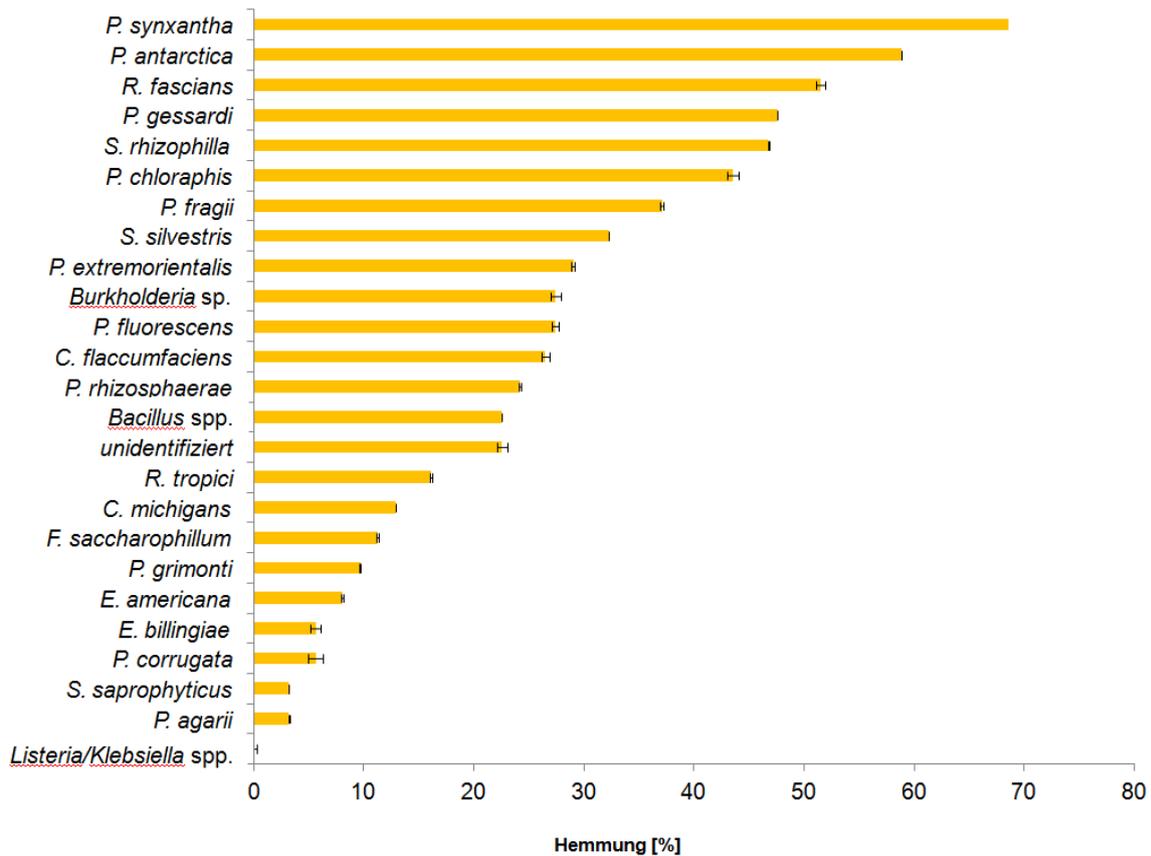
Das Mycelwachstum von *V. inaequalis* auf TSA war gegenüber dem Wachstum auf PDA deutlich verlangsamt (Abb. 39 a, 40 a). Auf TSA konnte nach 21 Tagen Inkubationszeit ein Mycelradius von 1,5 cm, auf PDA von 2,1 cm gemessen werden. Alle Bakterienarten und -gattungen inhibierten das Wachstum von *V. inaequalis* auf TSA vollständig (Abb. 39 b). Bei den Hemmtests der Bakterien auf PDA wiesen Vertreter aus der Gruppe der Pseudomonaden das stärkste Hemmpotenzial auf (Abb. 40 b). *P. synxantha*, *P. antarctica*, *P. gessardi* und *P. chloraphis* hemmten das Mycelwachstum des Erregers zu 48-69% (Abb. 41). Als weitere potenzielle Antagonisten konnten *R. fascians* und *S. rhizophila* identifiziert werden, die das Mycelwachstum zu etwa 50% inhibierten. Weitere Vertreter der Gattung *Pseudomonas*, *S. silvestris*, *Burkholderia* spp. und *Bacillus* spp. verminderten das Wachstum des Erregers zu 23-37%.



**Abb. 39:** Wachstum von *V. inaequalis* auf einer TSA-Platte nach 21 d  
a) Kontrolle b) Dualkultur-Test mit *R. tropici*

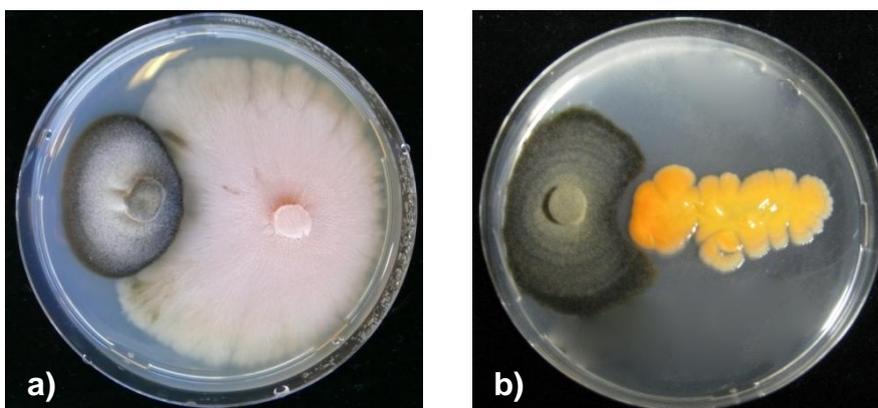


**Abb. 40:** Wachstum von *V. inaequalis* auf einer PDA Platte nach 21 d  
a) Kontrolle b) Dualkultur-Test mit *Pseudomonas* spp.

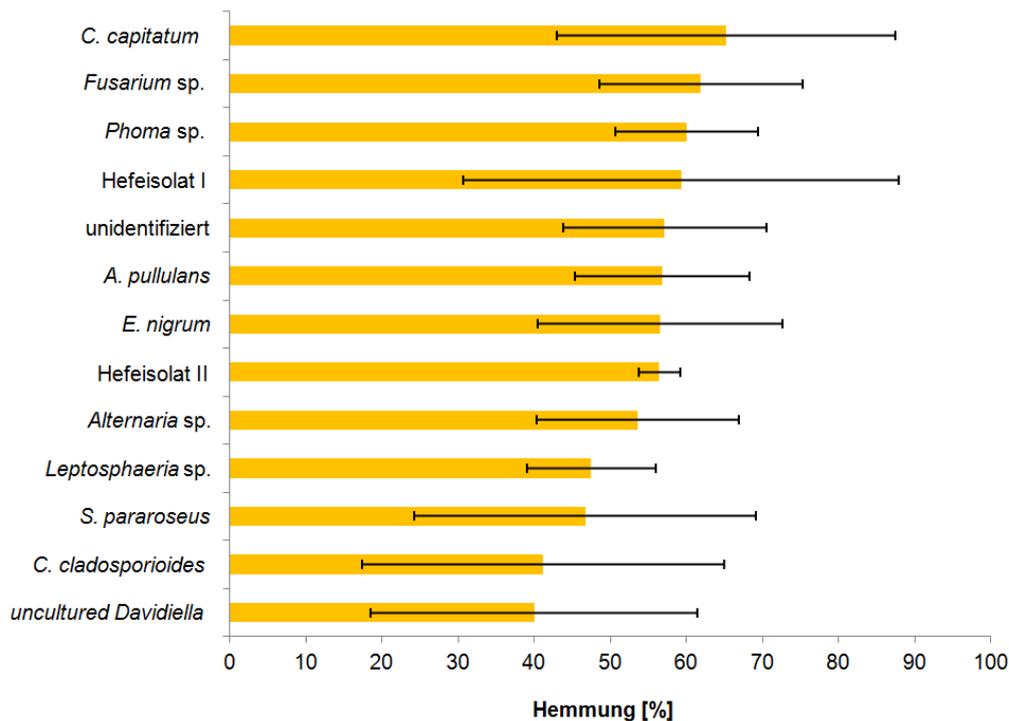


**Abb. 41:** Hemmung des Mycelwachstums [%] von *V. inaequalis* auf PDA nach 21 d Inkubationszeit durch die Bakterienarten und -gattungen des Falllaubs

Die Isolate aus der Gruppe der Hefen bewirkten eine Hemmung des Apfelschorfmycelwachstums um 47-65% (Abb. 42, 43). Bei den mycelbildenden Pilzen hemmten Isolate der Gattung *Fusarium* sp., *Phoma* sp. und *E. nigrum* die Entwicklung von *V. inaequalis* am stärksten. *C. cladosporioides* und *Leptosphaeria* sp. inhibierten das Mycelwachstum zu 41-48%.



**Abb. 42:** Mycelwachstum von *V. inaequalis* im Dualkultur-Test mit a) *A. pullulans* und b) *C. capitatum* nach 21 d



**Abb. 43:** Hemmung des Mycelwachstums [%] von *V. inaequalis* auf PDA nach 21 d Inkubationszeit durch die Hefe- und Pilzisolat des Falllaubs

### 3.5.2. Hemmung in Flüssigkultur

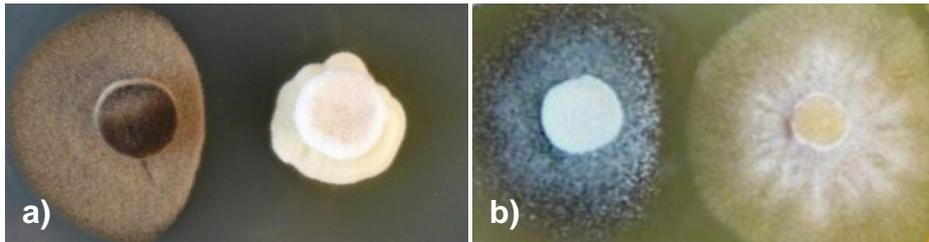
In Flüssigkultur konnten *P. extremorientalis*, *P. fluorescens* und *C. michigans* das Mycelwachstum von *V. inaequalis* vollständig inhibieren. Von den Pilzisolaten hemmten *C. cladosporioides* und *E. nigrum* das Mycelwachstum des Erregers.

### 3.5.3. Hemmtest volatile Substanzen

Für die potenziellen Antagonisten, die in den Dualkultur-Tests identifiziert wurden, konnte in keinem Fall nachgewiesen werden, dass es sich bei den Hemmstoffen um volatile Substanzen handelt. In allen Hemmtests entsprach das Mycelwachstum dem der Kontrolle.

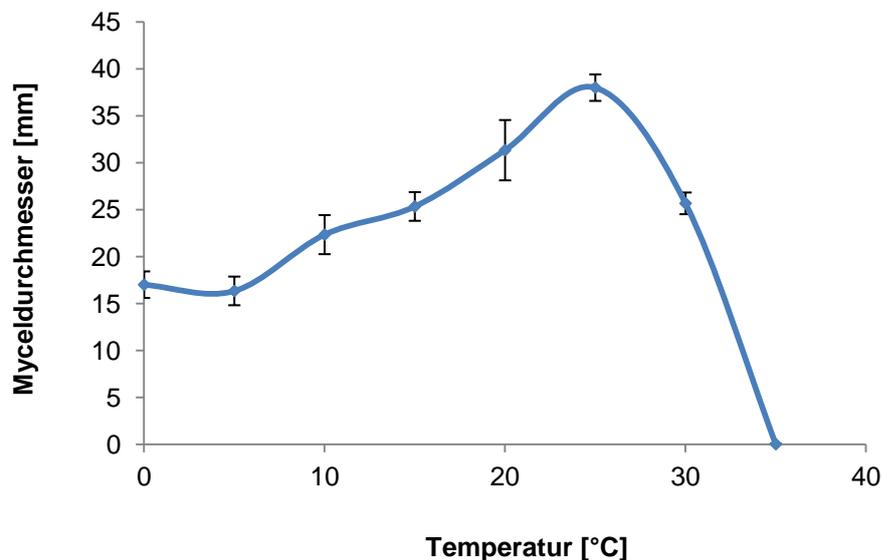
### 3.5.4. Pilzlicher Antagonist *Leptosphaeria sp.*

Der in der Saison 2012/13 auf das Falllaub applizierte Antagonist *Leptosphaeria sp.* konnte *V. inaequalis* auf PDA zu 48% in seinem Wachstum inhibieren (Abb. 44 a). Auf dem Blätteragar „Minimalmedium“ konnte eine Hemmung des Mycelwachstums von 21% nachgewiesen werden (Abb. 44 b). Ein 49 d altes TSB-Kulturfiltrat von *Leptosphaeria sp.* hemmte das Wachstum von *V. inaequalis* vollständig. PDB-Kulturfiltrate von *Leptosphaeria sp.* und jüngere TSB Kulturfiltrate ( $\leq 49$  d) führten nicht zu einer Hemmung des Erregerwachstums.



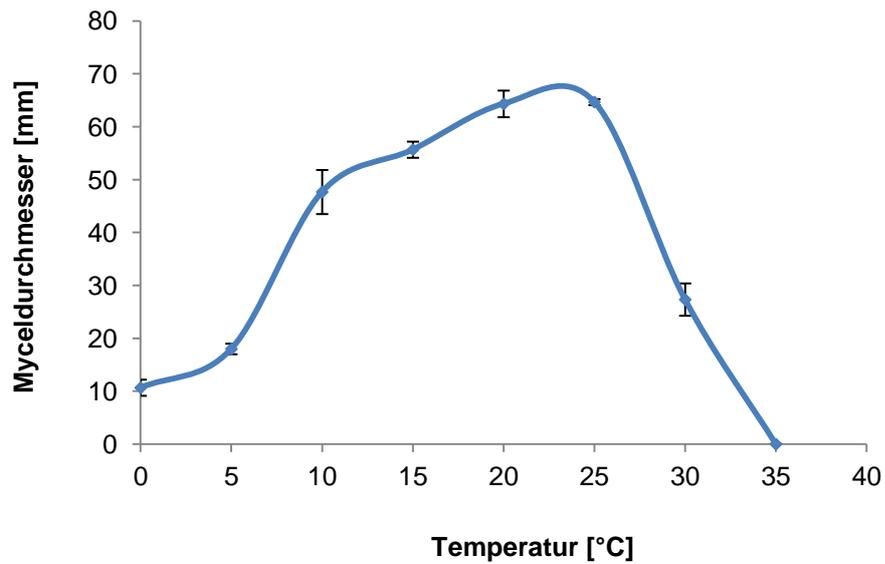
**Abb. 44:** Wachstum von *Leptosphaeria* sp. und *V. inaequalis* im Dualkultur-Test auf a) PDA und b) Blätteragar nach einer Inkubationszeit von 28 d bei 20°C

Das Temperaturoptimum von *Leptosphaeria* sp. lag auf PDA bei 25°C (Abb. 45). Die Verringerung des Wachstums zu tieferen Temperaturen war flach ausgeprägt und es konnte noch bei 0°C ein deutlicher Mycelzuwachs festgestellt werden. Im Freiland konnte bei einer Durchschnittstemperatur von 8°C ein mäßiges Wachstum des potenziellen Antagonisten nachgewiesen werden.



**Abb. 45:** Wachstum von *Leptosphaeria* sp. auf PDA im Temperaturbereich von 0-35°C

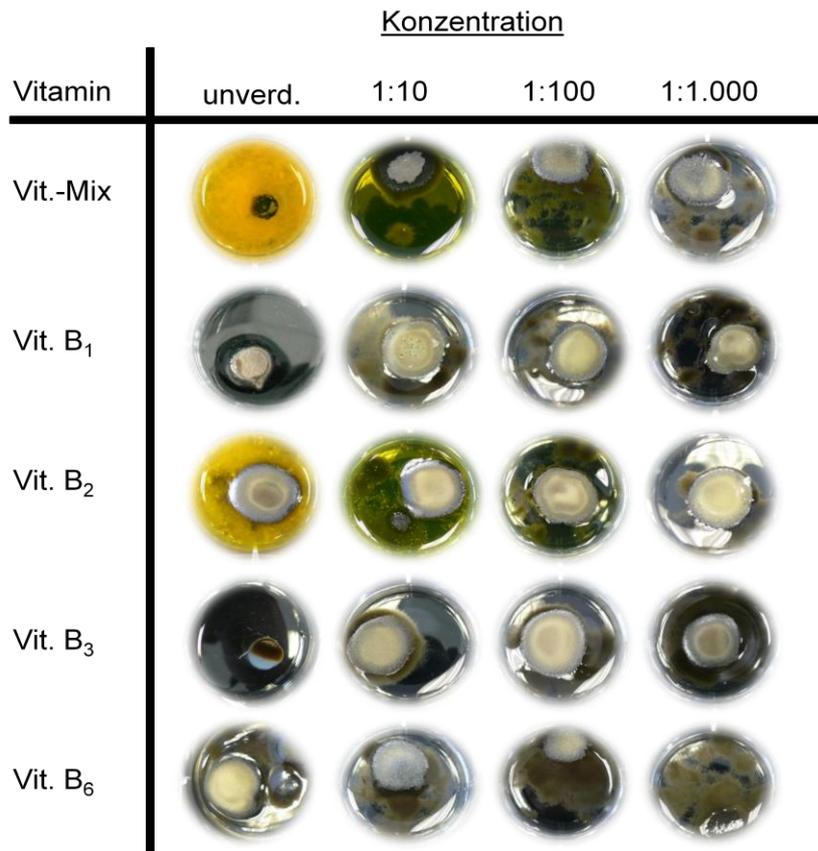
Auf dem Blätteragar „Minimalmedium“ zeigte *Leptosphaeria* sp. über einen weiten Temperaturbereich von 10 bis 25°C ein gutes radiales Mycelwachstum, aber mit deutlich weniger Luftmycel als auf PDA und durchscheinender Kolonie (Abb. 46). Das Temperaturoptimum lag im Bereich von 20 bis 25°C. Unter Freilandbedingungen, bei einer Durchschnittstemperatur von 8°C, war ein gutes Wachstum des Erregers möglich.



**Abb. 46:** Wachstum von *Leptosphaeria* sp. auf Blätterextraktagar im Temperaturbereich von 0-35°C

### 3.5.5. Vitamine

In den Kavitäten einer Microwell-Platte bewirkten Vitamin B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub> und der Vitamin-Mix in der unverdünnten Variante eine vollständige Inhibierung des Mycelwachstums von *V. inaequalis* (Abb. 47). Niedrigere Vitaminkonzentrationen sowie die Vitamine B<sub>2</sub> und B<sub>6</sub> hatten keinen erkennbaren Einfluss auf das Wachstum des Erregers.

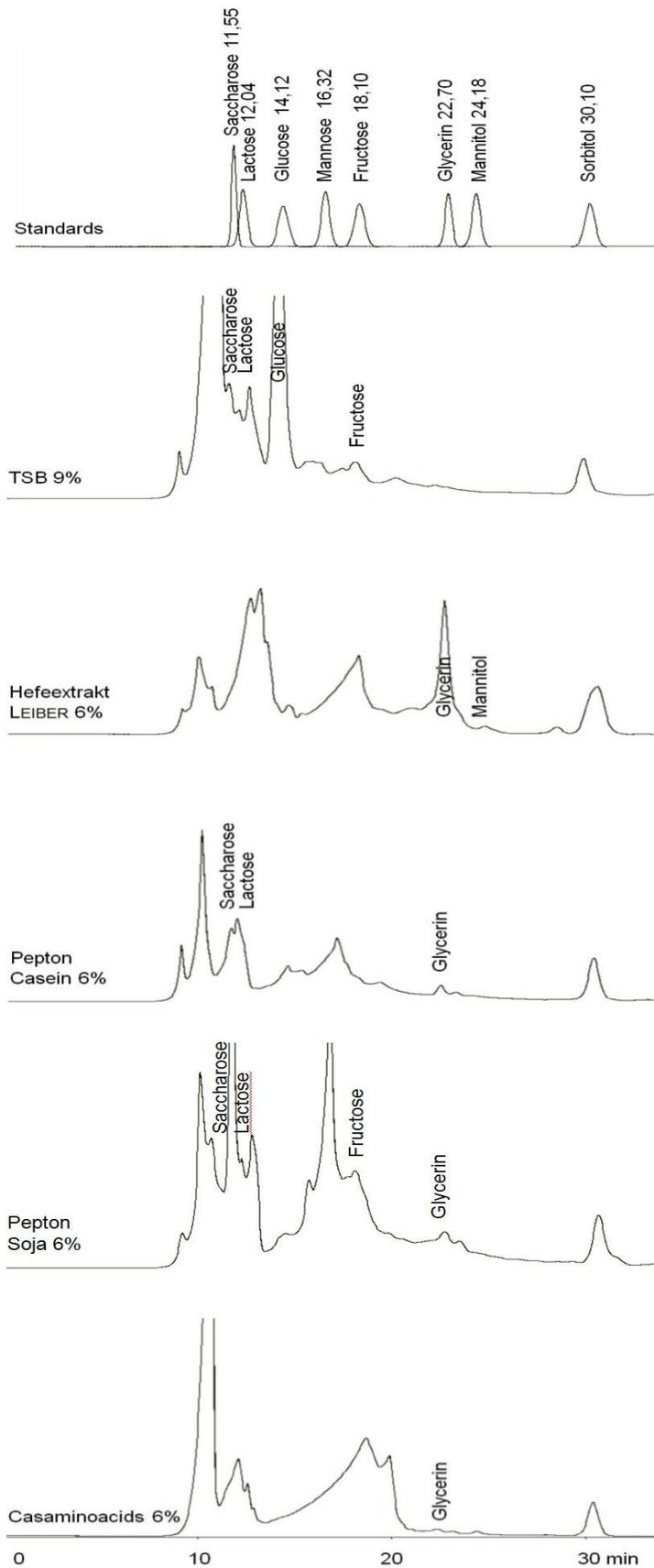


**Abb. 47:** Wachstum von *V. inaequalis* nach 14 d in Abhängigkeit von der Konzentration der Vitamine B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>6</sub> und einem Vitamin-Mix

### 3.6. Analyse der Nährmedienwirkstoffe

#### 3.6.1. Saccharide und Zuckeralkohole

Die Saccharid- und Zuckeralkohol-Chromatogramme der Nährmedien sind in Abb. 48 dargestellt. Einen Überblick über die identifizierten Substanzen und Mengen gibt Tabelle 13. In den Proben von TSB 9% konnte eine Glucosekonzentration von etwa 27.540 ppm nachgewiesen werden. Saccharose, Lactose und Fructose kamen in geringeren Mengen vor. Das Hefeextrakt LEIBER 6% wies neben einem Glycerinpeak nur einen kleinen Mannitolpeak auf. In den Nährmedien Pepton Casein 6% und Pepton Soja 6% konnten Anteile von Saccharose, Lactose und Glycerin nachgewiesen werden. Bei Pepton Soja wurde zusätzlich ein Fructosepeak detektiert. In den Casaminoacids 6% konnten, mit Ausnahme von geringen Mengen Glycerin, keine Saccharide und Zuckeralkohole nachgewiesen werden.



**Abb. 48:** HPLC Analyse der Nährmedien im Vergleich zu einem Saccharid/Zuckeralkoholstandard bestimmt mit der HPX 87C (Eluent H<sub>2</sub>O) und einer Signalstärke von 150 mV

**Tab. 13:** Konzentration der Saccharide und Zuckeralkohole [ppm] in den Nährmedien

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
<b>Summe</b>	<b>41.715</b>	<b>7.176</b>	<b>9.906</b>	<b>17.910</b>	<b>360</b>

0 = nicht nachweisbar

### 3.6.2. Aminosäuren

Die Konzentration der freien Aminosäuren, die in den Nährmedien mit der HPLC und TLC-Analysen bestimmt wurde, ist in Tab. 14 angegeben. Die Berechnung der Gesamtmenge an freien Aminosäuren erfolgte auf Basis der HPLC-Werte, da diese eine höhere Genauigkeit als die abgeschätzten TLC-Werte aufwiesen. Die TLC Werte wurden für die Berechnung verwendet, wenn keine Werte aus der HPLC-Analyse vorlagen. Die höchste Konzentration an freien Aminosäuren konnte in den Casaminoacids 6% nachgewiesen werden. Glutaminsäure stellte die mengenmäßig wichtigste Aminosäure dar. In der TLC-Analyse konnte für Glutaminsäure die größte Bande (Abb. 50) detektiert werden. Weitere wichtige Aminosäuren waren Asparaginsäure, Valin und Prolin mit Konzentrationen von etwa 4.560 bis 5.400 ppm. Asparagin, Tryptophan, Histidin und Lysin konnten nicht nachgewiesen werden. Im TSB-Präparat wurde eine Konzentration von etwa 38.385 ppm an freien Aminosäuren detektiert. Leucin stellte die wichtigste Aminosäure dar. Mit Hilfe der TLC konnte auch eine hohe Konzentration an Isoleucin nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von Cystein, Lysin und Tyrosin konnten alle anderen Aminosäuren qualitativ bestimmt werden. Im Pepton Soja 6% Präparat war Leucin die wichtigste Aminosäure. Andere Aminosäuren wurden in geringen Konzentrationen oder in Spuren nachgewiesen. Im LEIBER Hefeextrakt 6% konnten Leucin, Prolin und Valin in hohen Konzentrationen detektiert werden. Mit der TLC-Analyse wurden Leucin und Valin ebenfalls in größeren Mengen quantifiziert, das Vorhandensein von Prolin konnte nicht bestätigt werden. Im Nährmedium Pepton Casein 6% konnten, bis auf Tryptophan, alle analysierten Aminosäuren nachgewiesen werden. Glutaminsäure, Valin, Tyrosin und Leucin wurden in höheren Konzentrationen von 2.250 bis 3.690 ppm detektiert. Dipeptide konnten in den TLC-Analysen der Nährmedien nicht nachgewiesen werden.

Tab. 14: Konzentration der Aminosäuren in den Nährmedien

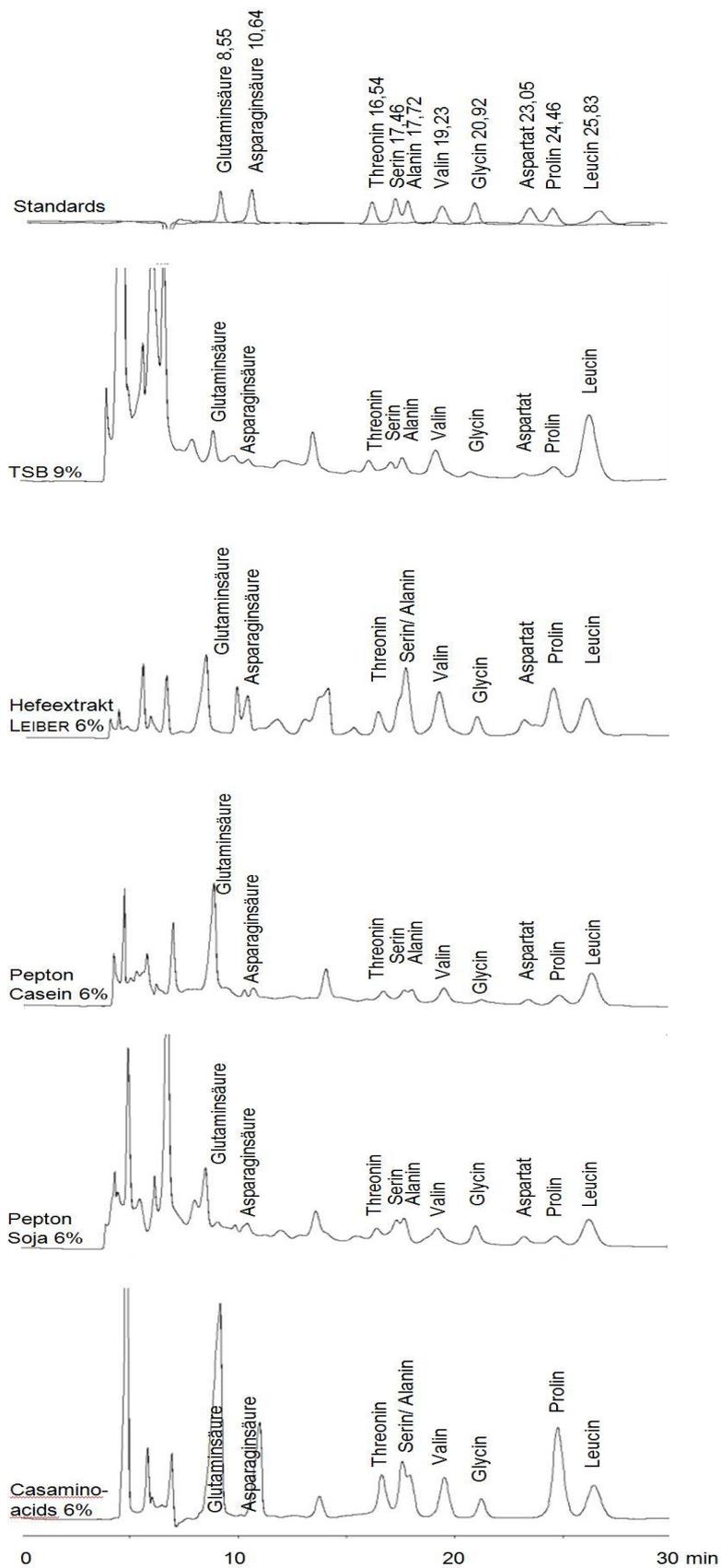
Aminosäuren [ppm]	TSB 9%		Hefe 6%		Pepton Casein 6%		Pepton Soja 6%		Casaminoacids 6%	
	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC	HPLC	TLC
Glutaminsäure	945	0	900	0	3.690	(1.500)	2.790	n.B.	14.010	(12.000)
Asparaginsäure	1.170	0	840	0	360	in Spuren	1.560	n.B.	5.400	(6.000)
Threonin	1.800	0	1.860	0	1.470	in Spuren	1.500	n.B.	3.420	(6.000)
Serin	2.295	in Spuren	735*	0	780	in Spuren	1.800	n.B.	3.300*	in Spuren
Alanin	3.015	in Spuren	672*	(600)	900	(300)	1.680	n.B.	2.460*	(600)
Valin	4.095	in Spuren	4.140	(6.000)	2.940	in Spuren	2.670	n.B.	4.560	in Spuren
Glycin	900	0	1.290	0	1.080	(1.500)	2.370	n.B.	3.090	in Spuren
Asparagin	765	n.B.	1.410	n.B.	630	n.B.	1.560	n.B.	0	n.B.
Prolin	1.710	0	4.560	0	960	(600)	1.260	n.B.	8.490	in Spuren
Leucin	16.740	(22.500)	4.260	(3.000)	2.250	(2.100)	5.520	n.B.	3.510	in Spuren
Arginin	n.B.	in Spuren	n.B.	0	n.d.	(300)	n.d.	n.B.	n.B.	1.500
Phenylalanin	n.B.	in Spuren	n.B.	0	n.d.	in Spuren	n.d.	n.B.	n.B.	1.200
Tryptophan	n.B.	in Spuren	n.B.	0	n.d.	0	n.d.	n.B.	n.B.	0
Cystein	n.B.	0	n.B.	0	n.d.	150	n.d.	n.B.	n.B.	600
Histidin	n.B.	450	n.B.	in Spuren	n.d.	in Spuren	n.d.	n.B.	n.B.	0
Isoleucin	n.B.	4.500	n.B.	in Spuren	n.d.	in Spuren	n.d.	n.B.	n.B.	in Spuren
Lysin	n.B.	0	n.B.	0	n.d.	150	n.d.	n.B.	n.B.	0
Methionion	n.B.	in Spuren	n.B.	0	n.d.	in Spuren	n.d.	n.B.	n.B.	in Spuren
Tyrosin	n.B.	0	n.B.	0	n.d.	3.000	n.d.	n.B.	n.B.	in Spuren
<b>Summe</b>		<b>38.385</b>		<b>20.667</b>		<b>18.360</b>		<b>22.710</b>		<b>51.540</b>

\* Serin- und Alaninpeak waren nicht Basislinien getrennt

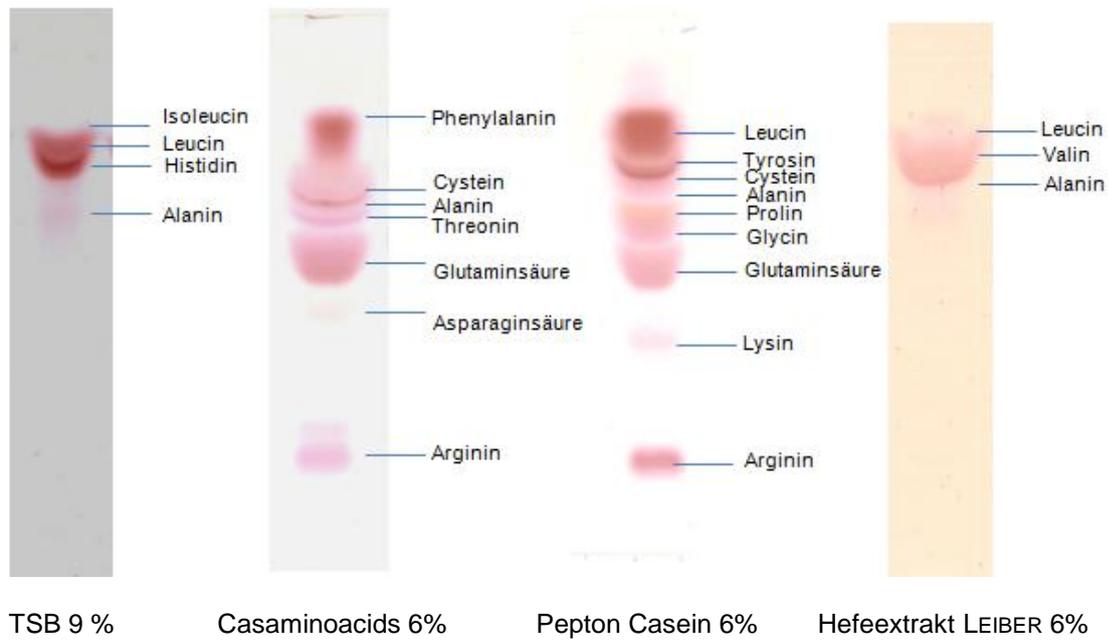
0 = nicht nachweisbar

n.B. = nicht bestimmt

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



**Abb. 49:** HPLC Chromatogramme der Nährmedien im Vergleich zu einem Aminosäurestandard bestimmt mit der HPX 87C (Eluent 10 mM CaSO<sub>4</sub>-Lösung) und einer Signalstärke von 150 mV.



**Abb. 50:** Aminosäure-Banden der Nährmedien auf den Ninhydrin gefärbten TLC-Platten

**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

### 3.6.3. Peptide

Bei der Bestimmung von Peptiden mit einem Molekulargewicht von mehr als 3 kDa wurde mit dem Bradford-Assay beim LEIBER Hefeextrakt 6% die höchste Konzentration (463 ppm) nachgewiesen (Tab. 15). Für das TSB Präparat konnte eine Konzentration von etwa 130 ppm ermittelt werden. In den anderen Nährmedien war die Konzentration der Peptide > 3 kDa geringer.

**Tab. 15:** Peptidkonzentration > 3 kDa der Nährmedien und ihr Anteil bezogen auf die Gesamtprobenmenge

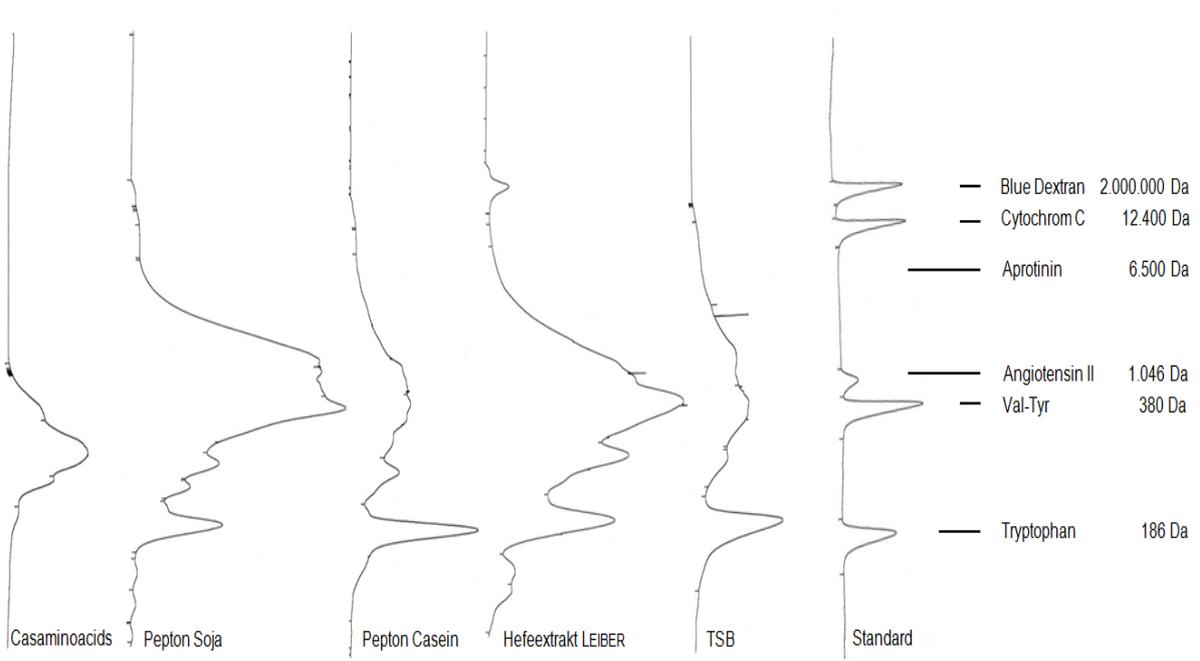
Probe	TSB 9%	Hefeextrakt LEIBER 6%	Pepton Casein 6%	Pepton Soja 6%	Casaminoacids 6%
Peptide > 3 kDa [ppm]	130	463	67	80	30
Anteil an Probe [%]	0,013	0,047	0,007	0,008	0,003

Peptide mit einem Molekulargewicht < 3 kDa bis hin zum Tripeptid wurden in allen Nährmedien in hohen Konzentrationen nachgewiesen (Tab. 16). Die Aufsummierung der Peptidgehalte aus den gelfraktionierten Proben führte beim LEIBER Hefeextrakt 6% und dem Pepton Casein Präparat zu höheren Werten als die Peptidbestimmung der nicht-fraktionierten Probe. In den anderen Medien waren die Peptidkonzentrationen der fraktionierten und nicht-fraktionierten Probe annähernd gleich groß. Für TSB 9% und Pepton Casein 6% wurde in der nicht-fraktionierten Probe eine Konzentration von etwa 40.000 ppm ermittelt. Beim Pepton Soja Präparat lag die Konzentration mit 36.709 ppm in einem ähnlichen Bereich. Geringere Peptidkonzentrationen wurden im LEIBER Hefeextrakt 6% und den Casaminoacids 6% nachgewiesen.

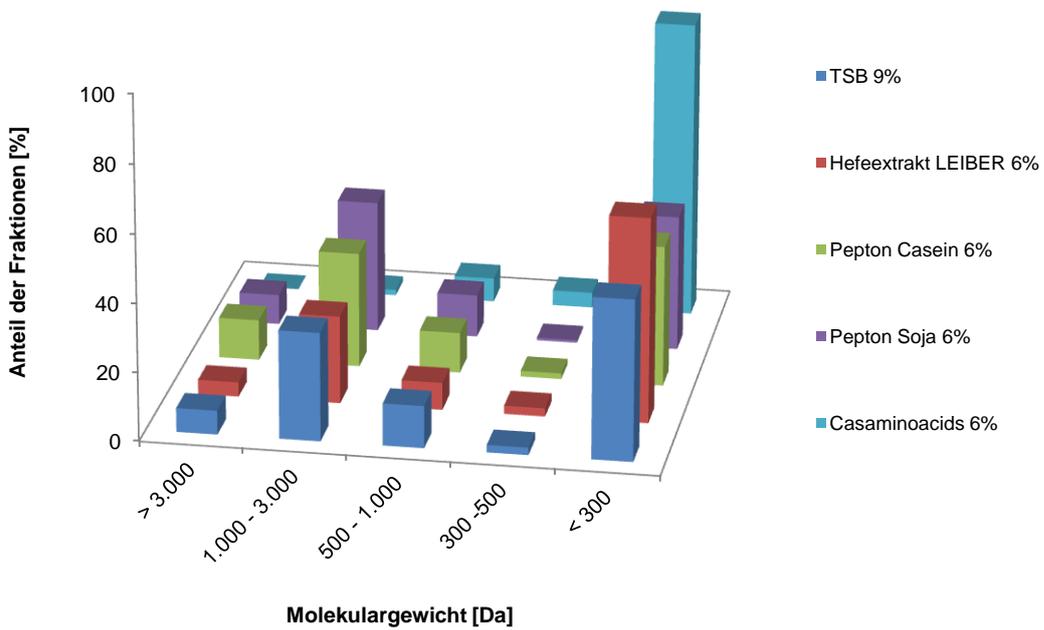
**Tab. 16:** Peptidkonzentrationen < 3 kDa der Nährmedien [ppm] und der fraktionierten Proben

Probe	Peptidkonzentration [ppm]	Peptidkonzentration in den Fraktionen der 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
Casaminoacids 6%	6.021	7.748

Die Chromatogramme der mit Superdex 30 PG größenfraktionierten Nährmedien sind in Abb. 51 dargestellt. Der Anteil der Peptide und Aminosäuren an den einzelnen Fraktionen der Nährmedien ist in Abb. 52 abgebildet. Freie Aminosäuren (< 300 Da) stellten in allen Nährmedien die größte Fraktion dar. 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 500-1.000 Da von 7%. Peptide > 1.000 Da kamen nur in geringen Konzentrationen vor und hatten keinen entscheidenden Anteil an der Zusammensetzung des Präparates. In den anderen Nährmedien war die Verteilung der Fraktionen annähernd gleich. Neben freien Aminosäuren, die zwischen 40-60% der Fraktionen ausmachten, stellten größere Peptide im Bereich von 1.000-3.000 Da mit 25-28%, die wichtigste Fraktion dar. Kleinere Peptide zwischen 300 und 1.000 Da und Peptide > 3.000 Da hatten keinen entscheidenden Anteil an der Zusammensetzung der Präparate.



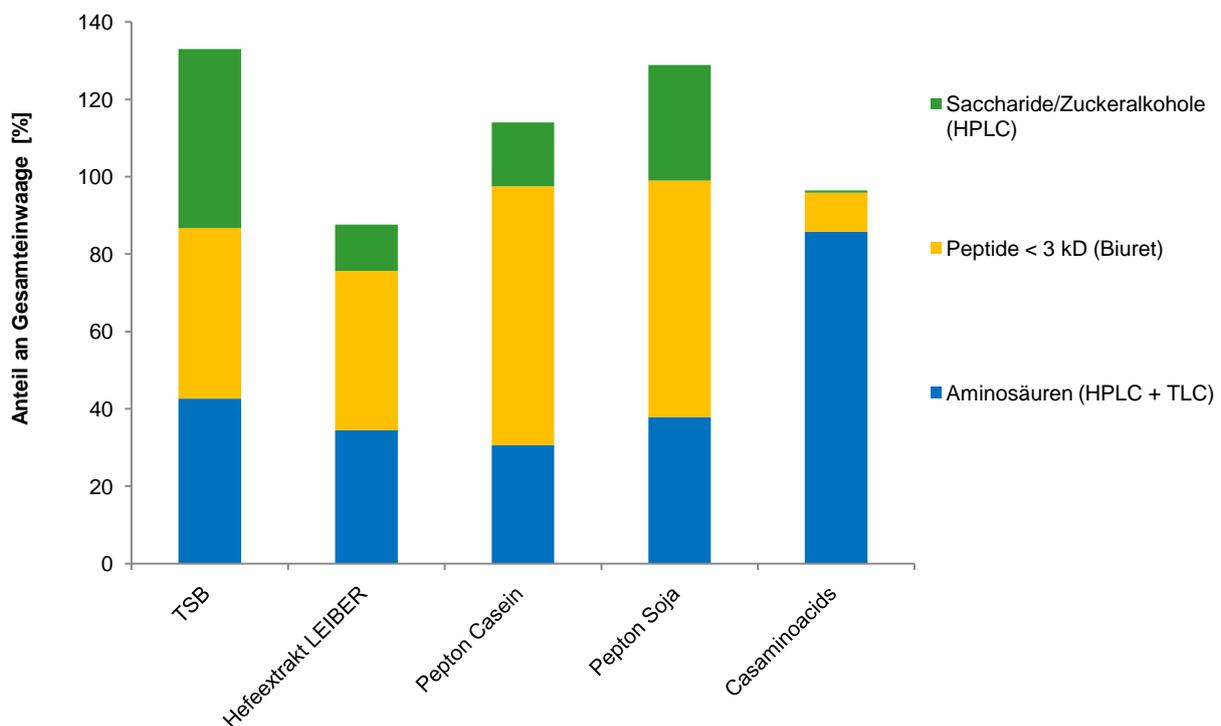
**Abb. 51:** Chromatogramme der mit Superdex 30 PG aufgetrennten Nährmedien im Vergleich zu einem Molekulargewichts-Standard



**Abb. 52:** Anteil der Peptide und Aminosäuren an den größenfraktionierten Proben der Nährmedien

### 3.6.4. Charakterisierung der Präparatzusammensetzung

In Abb. 53 ist der Anteil der analysierten Substanzen an den Nährmedien, bezogen auf die jeweilige Gesamteinwaage, vergleichend dargestellt. Auf eine Abbildung von Peptiden mit einem Molekulargewicht > 3 kDa wurde verzichtet, da diese weniger als < 0,05% der Gesamteinwaage ausmachten. Beim TSB war die Verteilung der Peptide, Aminosäuren und Saccharide/Zuckeralkohole annähernd gleich. Alle Substanzen hatten einen Anteil von 43-46% am Gesamtpräparat. Beim LEIBER Hefeextrakt stellten kleinere Peptide etwa 67% der Gesamteinwaage dar, freie Aminosäuren 34% und Saccharide/Zuckeralkohole 12%. Die Peptid- und Aminosäureanteile beim Pepton Casein und Pepton Soja waren nahezu identisch. Peptide hatten einen Anteil von 61-67%, Aminosäuren von 31-38% am Gesamtpräparat. Saccharide und Zuckeralkohole machten 17 bzw. 30% der eingewogenen Menge aus. Bei den Casaminoacids waren die freien Aminosäuren mit 87% die größte Fraktion. Peptide hatten einen Anteil von 10%, Saccharide/Zuckeralkohole von 0,6% an der Gesamteinwaage.



**Abb. 53:** Anteil der Saccharide, Zuckeralkohole, Peptide (< 3 kDa) und Aminosäuren an der eingewogenen Menge der Nährmedien

### 3.7. Saponine

#### 3.7.1. Biochemische Analysen

##### 3.7.1.1. Spezifische und absolute Hämolyseaktivität von Saponinextrakten

Die spezifische und die absolute hämolytische Aktivität der Saponinextrakte sowie die Saponinausbeute (%) sind in Tab. 17 dargestellt. Die spezifische Aktivität der Butanol-Extrakte war, mit Ausnahme vom Seifenwurzelextrakt, höher als die der Chloroform-Methanolextrakte. Die stärkste absolute Aktivität konnte beim Yuccasaponin der Butanolextraktion nachgewiesen werden. Mit der Chloroform-Methanol-Extraktion konnte eine höhere Saponinausbeute erreicht werden. Aus den Pflanzenmaterialien von Kastanie, Seifenkraut und Primel konnten 38-41% der membranolytischen Saponine extrahiert werden. Im Waschnuss-, Seifenrindenbaum- und Yuccasaponinextrakt war die Ausbeute geringer.

**Tab. 17:** Übersicht der spezifischen und absoluten Aktivität von Saponinextrakten aus der Butanol- und Chloroform-Methanol-Extraktion

Extrakt	spez. Aktivität (U/g)		absolute Aktivität (U)		Saponinausbeute [%]	
	Butanol-Extrakt	Chloroform-Methanol Extrakt	Butanol-Extrakt	Chloroform-Methanol Extrakt	Butanol-Extrakt	Chloroform-Methanol Extrakt
Waschnuss	1,8	1,0	34,1	51,5	8,1	12,3
Seifenkraut	0,8	1,2	5,3	53,0	3,8	38,0
Kastanie	6,6	2,8	46,2	78,0	24,0	41,0
Seifenrindenbaum	-	3,4	-	88,4	-	27,0
Yuccasaponin	7,4	0,7	145,0	117,0	18,0	14,0
Primel	-	6,1	-	122,0	-	38,0

##### 3.7.1.2. Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln

Die Löslichkeit der getesteten Saponine/Saponinextrakte in verschiedenen organischen Lösungsmitteln und der Hämolyseradius [mm] sind in Tab. 18 dargestellt. Die hämolytischen Saponine des Waschnussextraktes waren in Reinstwasser, 80% Aceton und 60% Isopropanol am besten löslich. Käufliches Aescin ( $\geq 97,9\%$ ) konnte in Reinstwasser und 100% Methanol gut in Lösung gebracht werden. In 50% Aceton gingen nur 2% des Pulvers in Lösung, während die hämolytische Aktivität herausgelöst wurde und annähernd der Aktivität des Ausgangsmaterials entsprach. Die hämolytischen Saponine des Kastanienextraktes waren jeweils in 80 % Ethanol, Aceton, Isopropanol und in Reinstwasser gut löslich. Für das käufliche Quillajasaponin (10-11%) erwiesen sich neben Reinstwasser, 80% Aceton, 80% Ethanol sowie 60 und 80% Isopropanol als gute Lösungsmittel.

**Tab. 18:** Löslichkeit [%] und Hämolyseradius [mm] der Saponine/-extrakte in verschiedenen Lösungsmitteln angeordnet nach absteigender Polarität

Lösungsmittel	Waschnussextrakt		Kastanienextrakt		Aescin		Quillajasaponin	
	Löslichkeit [%]	Hämolyse [mm]	Löslichkeit [%]	Hämolyse [mm]	Löslichkeit [%]	Hämolyse [mm]	Löslichkeit [%]	Hämolyse [mm]
Reinstwasser	56	4	80	6	78	10	73	7
Methanol 60%	48	3	78	4	6	1	84	3
Methanol 80%	72	2	62	4	10	2	78	5
Methanol 100%	74	3	70	4	96	9	68	3
Ethanol 60%	68	3	82	4	10	1	26	4
Ethanol 80%	72	3	92	6	8	2	88	6
Ethanol 100%	32	2	10	0	26	3	13	0
Aceton 50%	88	3	70	3	2	9	91	6
Aceton 80%	42	4	78	5	8	3	91	7
Isopropanol 60%	100	4	100	4	30	6	87	7
Isopropanol 80%	60	1	90	5	2	4	89	7
Isopropanol 100%	0	0	0	0	4	3	30	0

### 3.7.2. Fungizide Wirkung von Saponinextrakten

#### 3.7.2.1. Wirkung auf die Konidienkeimung und das Mycelwachstum von *V. inaequalis*

In den Konidienkeimtests wiesen die Saponinextrakte der Butanol-Extraktion eine geringere  $IC_{50}$  als die Saponine der Chloroform-Methanol-Extraktion auf (Tab. 19). Die effektivsten Präparate waren Yuccasaponin- und Waschnussextrakt, die die Keimung der Konidien bei einer Konzentration von 20 bzw. 60 ppm zu 50% hemmten. Das Kastanien- und das Seifenkrautextrakt wiesen ebenfalls eine niedrige  $IC_{50}$  auf. Von den Chloroform-Methanol-Extrakten konnte das Primelsaponin, mit einer  $IC_{50}$  von 80 ppm, die Konidienkeimung am wirkungsvollsten inhibieren. Für die Saponinextrakte von Waschnuss, Kastanie, Seifenkraut und Yuccasaponin wurde eine  $IC_{50}$  zwischen 210 und 360 ppm ermittelt. Die  $IC_{50}$  des Seifenrindenbaum- und Efeuextraktes lag in einem deutlich höheren Bereich. Für die käuflichen Saponinpräparate, Aescin (Kastanie) und Quillajasaponin wurde eine niedrigere  $IC_{50}$  als für die jeweiligen Saponinextrakte bestimmt.

**Tab. 19:** IC<sub>50</sub> der Saponinextrakte im Konidienkeimtest

Pflanzen-material	IC <sub>50</sub> Butanol Extrakt [ppm]	IC <sub>50</sub> Chloroform-Methanol Extrakt [ppm]	IC <sub>50</sub> käufliches Saponinpräparat [ppm]
Waschnuss	60	210	-
Kastanie	210	220	30
Seifenkraut	240	360	-
Primel	-	80	-
Seifenrindenbaum	-	5.800	2.160
Yuccasaponin	20	220	210
Efeu	-	1.350	-

Bei den Wachstumshemmtests auf Agarplatten konnte für die Saponine der Butanol-Extraktion ein hoher Wirkungsgrad nachgewiesen werden (Tab. 20). Die IC<sub>50</sub> der Chloroform-Methanol-Extrakte war im direkten Vergleich etwa doppelt so hoch, beim Kastanienextrakt um das Zehnfache erhöht. Das Mycelwachstum von *V. inaequalis* wurde durch das Butanol-Extrakt der Waschnuss am wirkungsvollsten inhibiert. Das Kastanienextrakt zeigte eine ähnliche IC<sub>50</sub>. Bei den Chloroform-Methanol-Extrakten war das Primelsaponin am effektivsten (Abb. 54). Ab einer Konzentration von  $\geq 0,1\%$  Saponinextrakt konnte eine fungizide Wirkung nachgewiesen werden. Waschnuss- und Kastaniensaponin zeigten ab einer Konzentration von  $\geq 0,5\%$ , Seifenkraut und Yuccasaponin ab einer Konzentration von  $\geq 0,1\%$  ein fungizides Potenzial. Für das Seifenrindenbaum- und Efeuextrakt konnte auch bei hohen Konzentrationen von 1% nur eine fungistatische Wirkung nachgewiesen werden.

**Tab. 20:** IC<sub>50</sub> der Saponinextrakte im Wachstumshemmtest

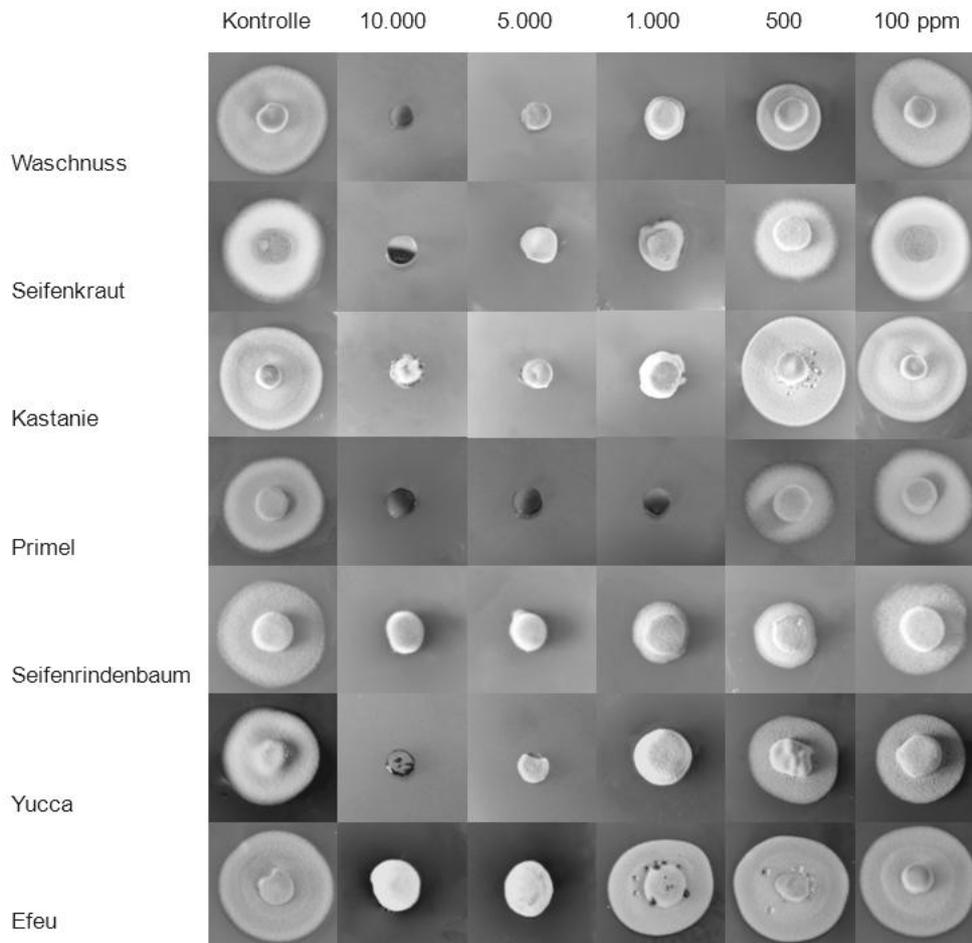
Pflanzen-material	IC <sub>50</sub> Butanol Extrakt [ppm]	IC <sub>50</sub> Chloroform-Methanol Extrakt [ppm]	IC <sub>50</sub> käufliches Saponinpräparat [ppm]
<b>Waschnuss<sup>2</sup></b>	140	270	-
<b>Kastanie<sup>2</sup></b>	180	1.850	170
<b>Seifenkraut<sup>3</sup></b>	230	580	-
<b>Primel<sup>1</sup></b>	-	180	-
<b>Seifenrindenbaum<sup>4</sup></b>	-	1.700	830
<b>Yuccasaponin<sup>3</sup></b>	640	1.150	6.200
<b>Efeu<sup>4</sup></b>	-	2.200	-

<sup>1.</sup>  $\geq 0,1\%$  fungizid

<sup>2.</sup>  $\geq 0,5\%$  fungizid

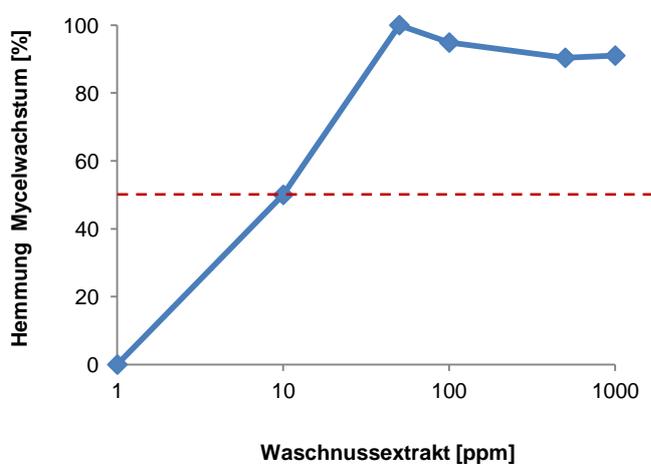
<sup>3.</sup>  $\geq 1\%$  fungizid

<sup>4.</sup> fungistatisch



**Abb. 54:** Mycelwachstum von *V. inaequalis* nach 21 d auf PDA mit 10.000; 5.000; 1.000; 500 und 100 ppm Saponinextrakt (Chloroform-Methanol-Extrakt)

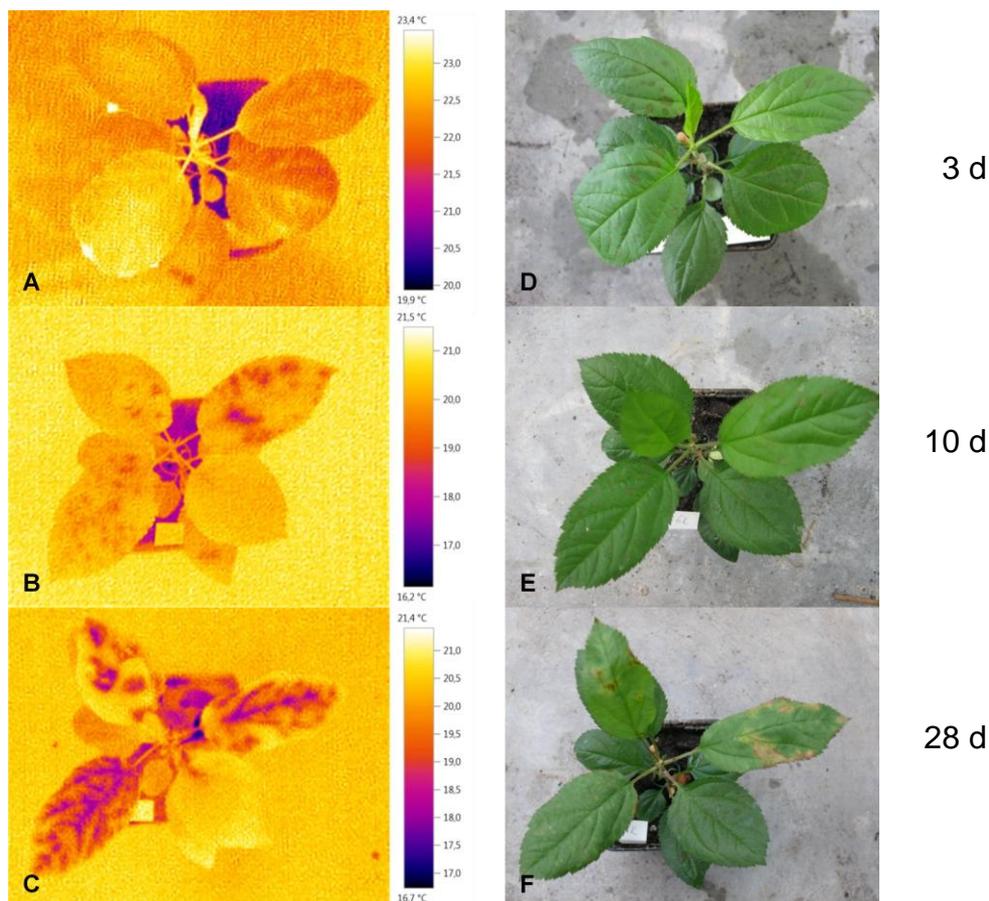
Für das Waschnussextrakt konnte in Flüssigkultur, nach einer Inkubationszeit von 35 d, eine  $IC_{50}$  von 10 ppm ermittelt werden (Abb. 55).



**Abb. 55:** Hemmung des Mycelwachstums von *V. inaequalis* in Flüssigkultur in Abhängigkeit von der Waschnussextrakt-Konzentration [ppm]

### 3.7.2.2. Protektive und kurative Wirkung bei Bekämpfungsversuchen

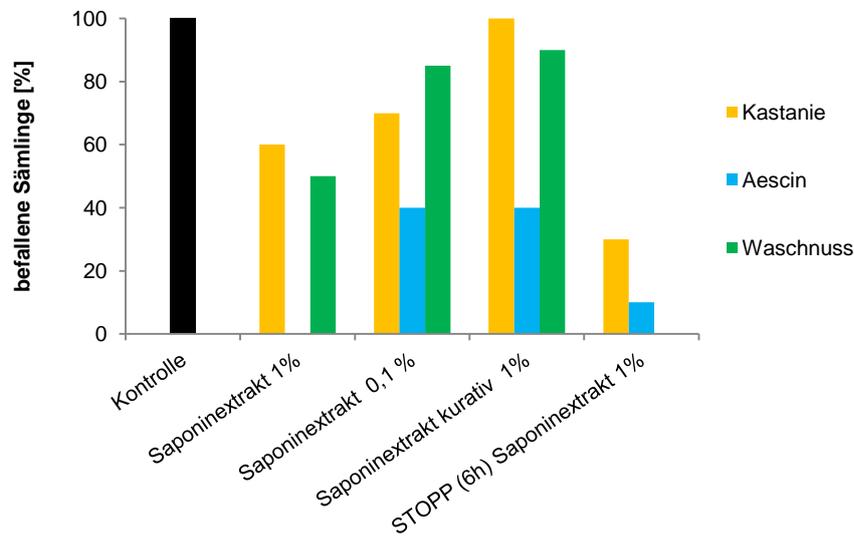
Der natürliche Verlauf einer Apfelschorfinfektion an Apfelsämlingen ist in Abb. 56 dargestellt. An den jungen Blättern waren mit der Thermokamera bereits 6 d nach der Inokulation mit  $10^6$  Konidien/ml erste Infektionssymptome sichtbar. Die infizierten Stellen wiesen eine Temperatur von etwa  $17,5\text{-}19^\circ\text{C}$  auf und waren kühler als symptomlose Bereiche, die eine Oberflächentemperatur von  $20\text{-}22^\circ\text{C}$  zeigten. Zehn bis zwölf Tage nach der Infektion waren die ersten Befallssymptome durch das Auftreten chlorotischer Flecke und sporulierender Läsionen makroskopisch erkennbar.



**Abb. 56:** Zeitlicher Verlauf einer *V. inaequalis*-Infektion an Apfelsämlingen von 'Golden Delicious' 3, 10 und 28 d nach der Inokulation mit  $10^6$  Konidien/ml dokumentiert mit einer Thermokamera (A, B, C) und einer Digitalkamera (D, E, F)

Bei den Bekämpfungsversuchen waren alle unbehandelten Sämlinge nach einer Inkubationszeit von 28 d befallen (Abb. 57). Sie wiesen sporulierende Infektionen auf, die zum Teil nekrotisch waren (Abb. 58). Auf den präventiv mit 1% Saponinextrakt behandelten Sämlingen konnten keine sporulierenden Infektionen festgestellt werden. Die Blätter wiesen chlorotische Flecken auf, so dass diese Pflanzen als befallen gewertet wurden. Auf den präventiv mit 0,1% Saponinextrakt und den 6 h nach der Inokulation mit 1% Saponinextrakt behandelten Sämlingen

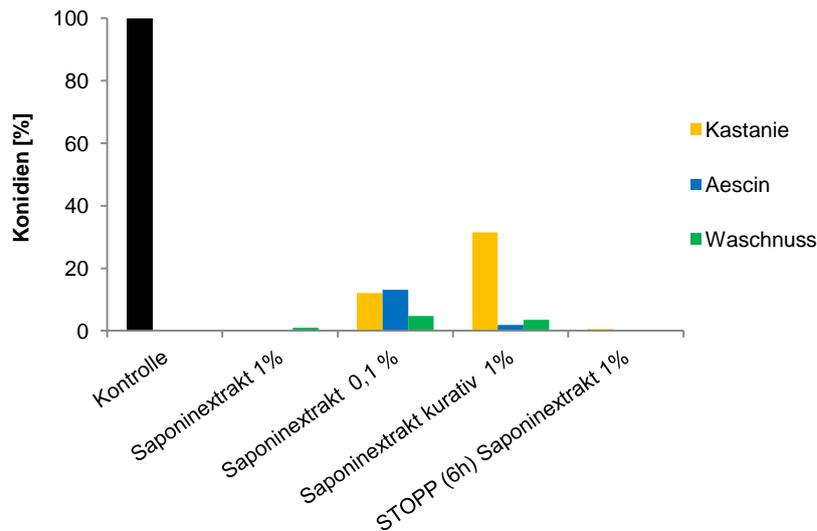
wurde ebenfalls das Erscheinen chlorotischer Flecken sowie das Auftreten von sporulierenden Infektionsstellen beobachtet. Die Sämlinge, die erst 24 h nach der Inokulation kurativ behandelt wurden, zeigten sporulierende Läsionen, die teilweise nekrotisiert waren.



**Abb. 57:** Apfelschorfsymptome [%] an Sämlingen der Sorte 'Golden Delicious', 28 d nach der Inokulation mit  $10^6$  Konidien/ml



**Abb. 58:** Unbehandelter Sämling (A, B), präventiv mit 1% (C, D) und 0,1% Waschnusseextrakt (E, F) behandelter Sämling und kurativ mit 1% Waschnusseextrakt behandelter Sämling, 30 d nach der Inokulation mit  $10^6$  Konidien/ml von *V. inaequalis*

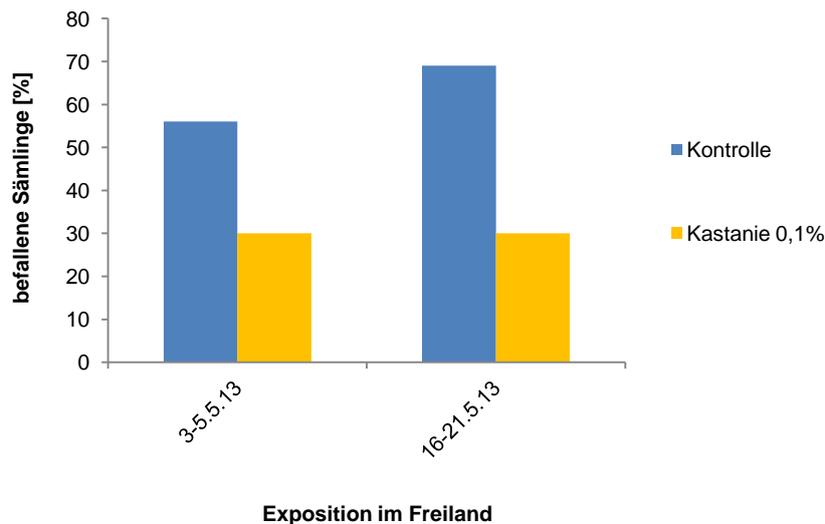


**Abb. 59:** Konidienbildung von *V. inaequalis* auf saponinbehandelten Apfelsämlingen 30 d nach der Inokulation

Eine präventive 1% Saponinbehandlung der Pflanzen zeigte das Potenzial, die Sporulation des Erregers um 99-100% zu reduzieren (Abb. 59). Die 0,1% Behandlung reduzierte die Sporulation um etwa 90%. Eine STOPP-Spritzung der Sämlinge 6 h nach Inokulation bewirkte eine Verminderung der Sporulation um 98-100%, eine kurative Behandlung (24 h nach der Inokulation) um 68-98%. Im direkten Vergleich der drei getesteten Saponinextrakte zeigte das käufliche Aescinpräparat die beste Wirkung.

### 3.7.2.3. Protektive Wirkung im Freiland

Während der beiden Expositionszeiträume (03.-05.05.2013; 16.-21.05.2013) der saponinbehandelten Apfelsämlinge im Freiland fielen 29 bzw. 22 mm Niederschlag bei Durchschnittstemperaturen von 14 bzw. 13°C. Es waren die Infektionsbedingungen für eine mittelschwere Mills-Infektion (85%) bzw. für eine leichte Mills-Infektion gegeben. In beiden Versuchen konnte durch die präventive Behandlung mit 0,1% Kastaniextrakt eine Reduktion des sichtbaren Schorfbefalls um etwa 50% nachgewiesen werden (Abb. 60).



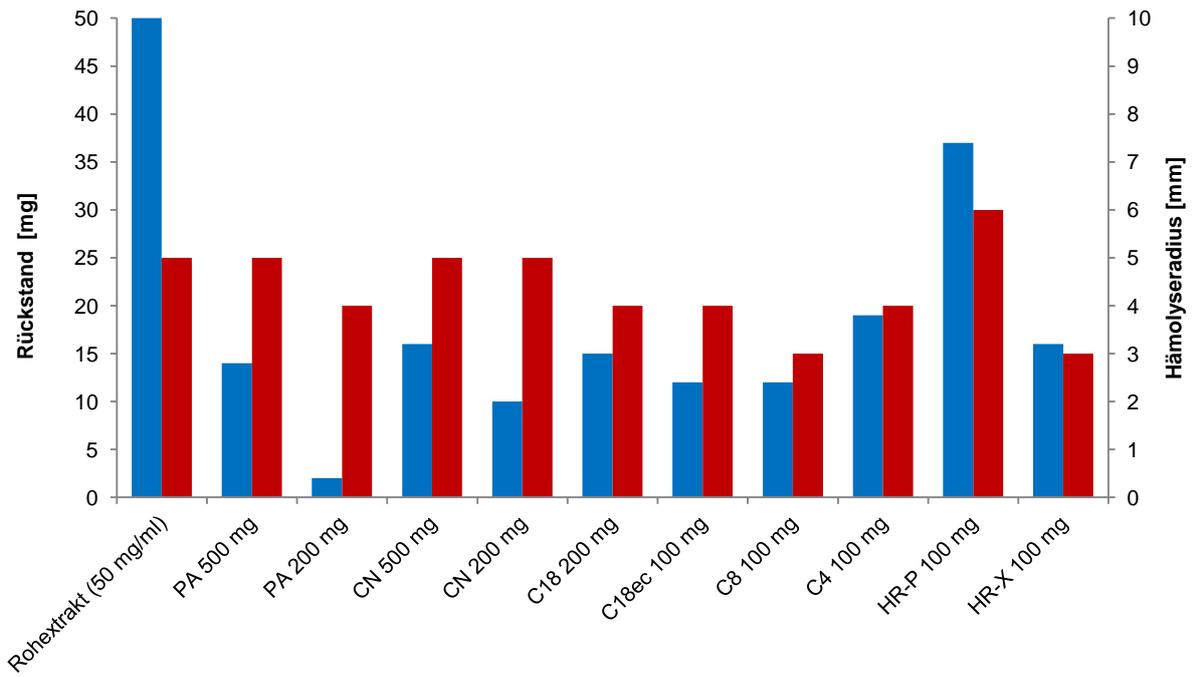
**Abb. 60:** Befall im Freiland exponierter Apfelsämlinge nach präventiver Behandlung mit Kastanienextrakt (0,1%)

### 3.7.3. Aufreinigung von Saponinextrakten

#### 3.7.3.1. Festphasenextraktion

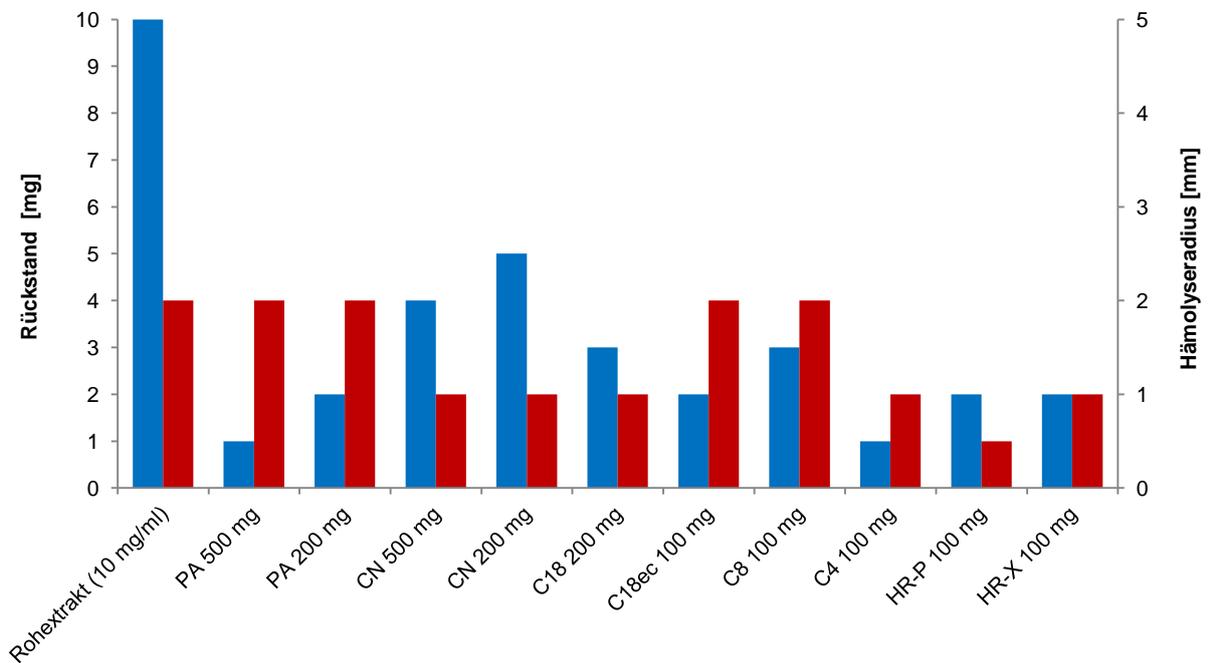
Die Festphasenextraktionen von 50 mg Waschnussextrakt über PA<sub>500 mg<sup>-</sup></sub>, CN<sub>500 mg<sup>-</sup></sub> und CN<sub>200 mg<sup>-</sup></sub>-Kartuschen führte zu einer Aufreinigung der Extrakte um etwa 70-80% (Abb. 61). Die hämolytische Aktivität der Methanol-Eluate entsprach der Aktivität des Rohextraktes. Für 10 mg Extrakt konnte an PA-, C18 ec<sub>100 mg<sup>-</sup></sub> und C8<sub>100 mg<sup>-</sup></sub>-Kartuschen eine Reinigung der Extrakte von bis zu 90% erreicht werden (Abb. 62). Die Aufreinigung führte nicht zu einer verminderten membranolytischen Aktivität der Extrakte.

Die Absorptionsspektren der SPE-Methanol-Eluate sind in Abb. 63 und Abb. 64 dargestellt. Das Rohextrakt der Waschnuss (50 mg/ml) zeigte zwei Absorptionsmaxima im Bereich von 210-220 nm und 260-280 nm. Für die über eine reversed-Phase Kartusche gereinigten Extrakte konnte im Bereich von 260-280 nm eine gute Aufreinigung nachgewiesen werden. Substanzen, die im Bereich von 210-220 nm absorbierten, wurden nicht aus der Probe entfernt. Mit Cyanopropyl-modifizierten Kieselgelsäulen konnten Verunreinigungen im Bereich von 210-220 nm, mit HR-P- und HR-X-Kartuschen Verunreinigungen im Bereich von 260-280 nm entfernt werden. Die beste Aufreinigung der Extrakte wurde an Kartuschen auf Basis von Polyamid erreicht. Die membranolytischen Saponine konnten erfolgreich an das Sorbens gebunden werden, andere Substanzen wurden mit Reinstwasser von der Säule gewaschen (Abb. 65). Die Elution der hämolytischen Saponine erfolgte mit Methanol. Die Absorptionsspektren der Methanol-Eluate waren vergleichbar mit denen von Aescin (97,9%).



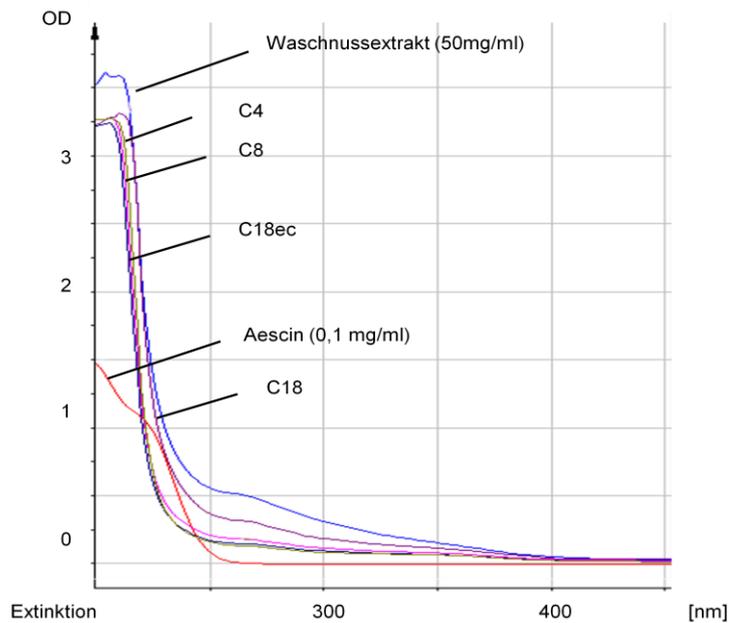
Eluate der Festphasenextraktion

**Abb. 61:** Rückstände [mg] und Hämolyseradien [mm] der Methanol-Eluate von 50 mg Waschnussextrakt nach der Festphasenextraktion an verschiedenen Sorbensmaterialien

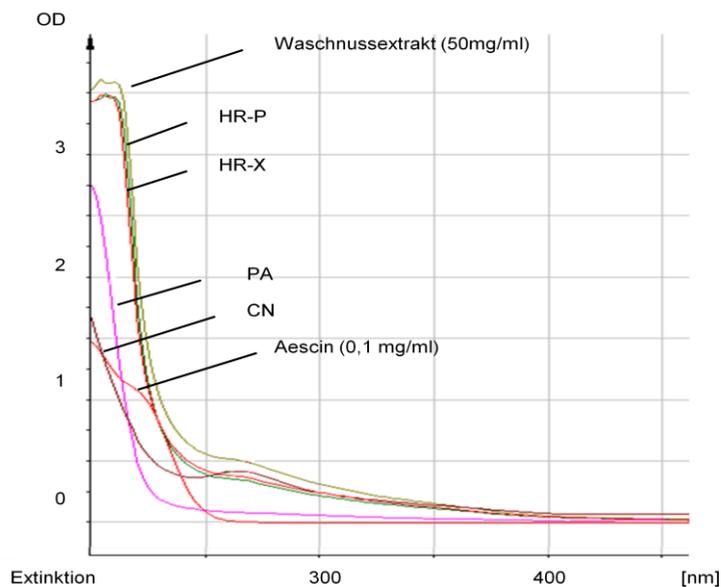


Eluate der Festphasenextraktion

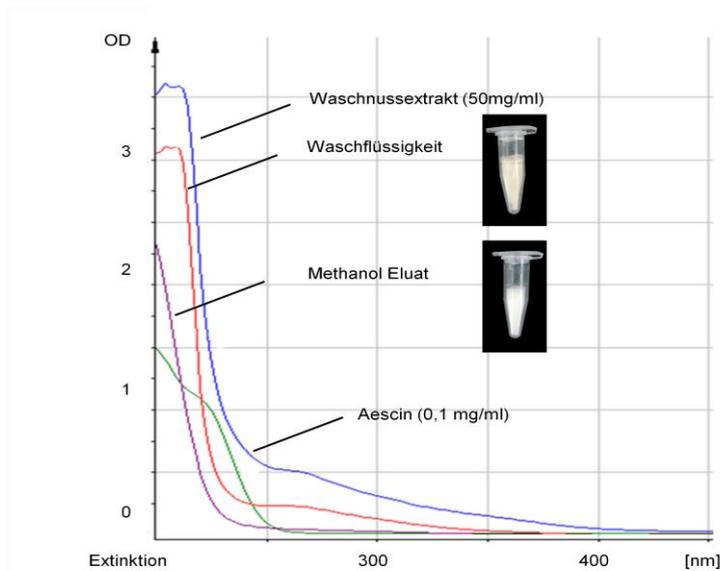
**Abb. 62:** Rückstände [mg] und Hämolyseradien [mm] der Methanol-Eluate von 10 mg Waschnussextrakt nach der Festphasenextraktion an verschiedenen Sorbensmaterialien



**Abb. 63:** Absorptionsspektren des Rohextraktes (50 mg/ml) und der Methanol-Eluate von Waschnussextrakt nach der Aufreinigung über reversed Phase-Kartuschen im Vergleich zu Aescin (97,9%)

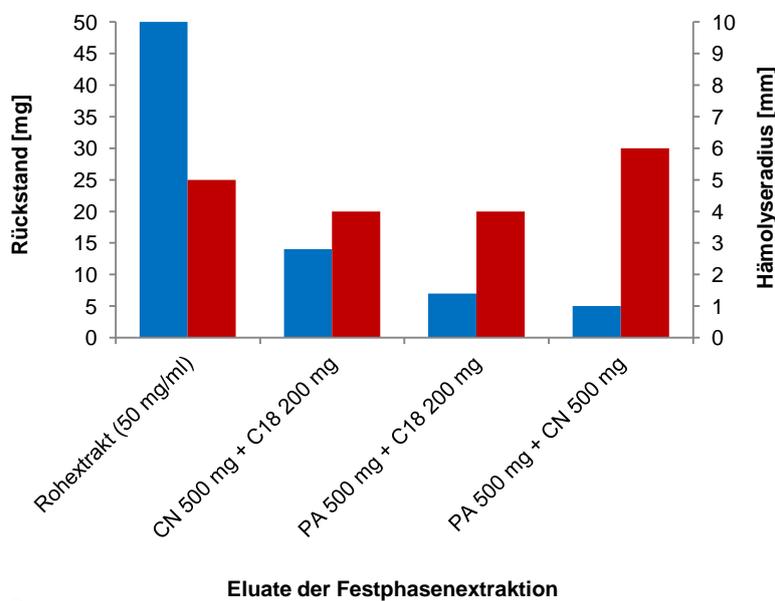


**Abb. 64:** Absorptionsspektren des Rohextraktes (50 mg/ml) und der Methanol-Eluate von Waschnussextrakt nach der Aufreinigung über Festphasenextraktion im Vergleich zu Aescin (97,9%)

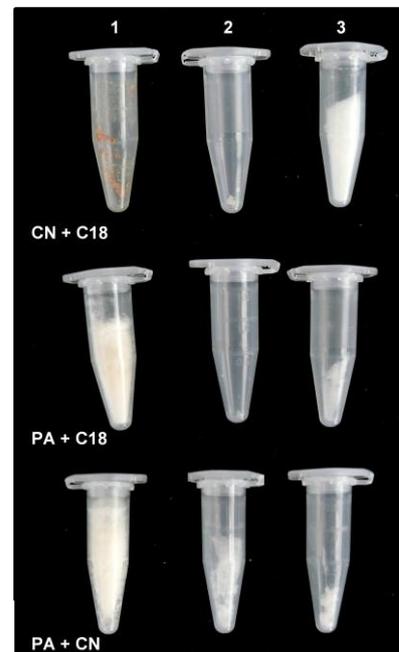


**Abb. 65:** Absorptionsspektren der Waschflüssigkeit und des Methanol-Eluates von 50 mg Waschnussextrakt nach der Aufreinigung über Polyamid-Kartuschen im Vergleich zum Gesamtextrakt und Aescin (97,9%)

Bei der Kombination verschiedener SPE-Retentionsmechanismen konnte mit der Variante PA/CN-Kartusche der höchste Aufreinigungsgrad der Extrakte erreicht werden (Abb. 66 a + b; Abb. 67). Die hämolytische Aktivität der Methanol-Eluate war im Vergleich zum Rohextrakt um 20% erhöht.

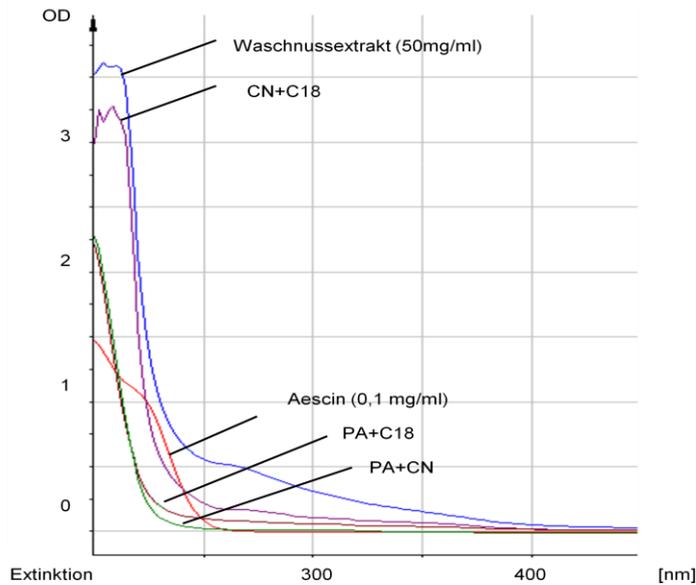


a



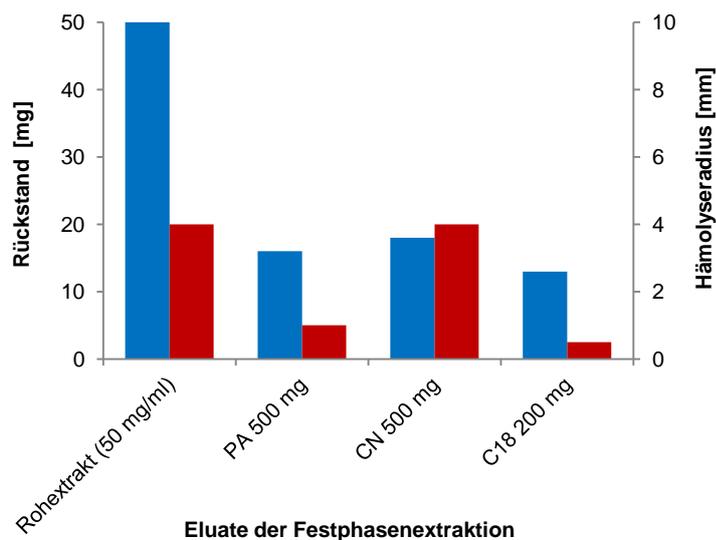
b)

**Abb. 66 a)** Rückstände [mg] und Hämolyseradien [mm] der Methanol-Eluate von 50 mg Waschnussextrakt nach der Festphasenextraktion an verschiedenen Sorbensmaterialien **b)** Abbildung der Rückstände der Waschflüssigkeit (1), des Methanol-Eluates der ersten SPE-Säule (2) und des Methanol-Eluates der zweiten SPE-Säule (3)

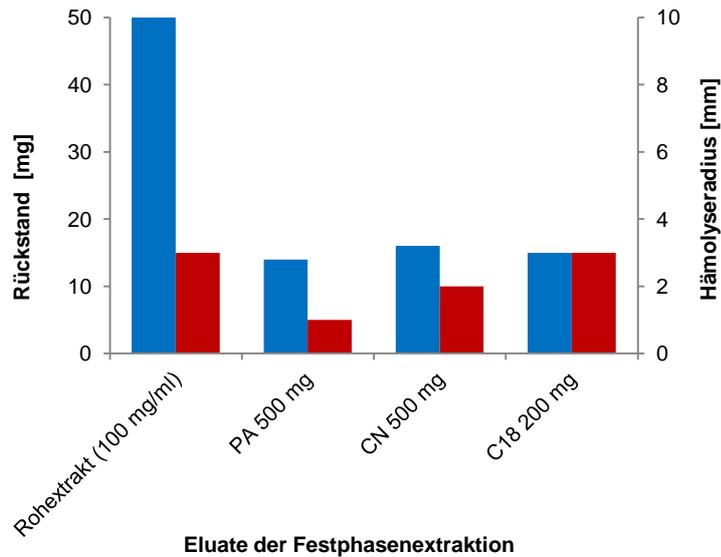


**Abb. 67:** Absorptionsspektren der Methanol-Eluate von Waschnussextrakt (50 mg/ml) nach der Aufreinigung über zwei kombinierte SPE-Kartuschen im Vergleich zu Aescin (97,9%)

Die höchste Aufreinigung und Anreicherung der hämolytischen Saponine des Kastanienextraktes konnte mit CN<sub>500mg</sub>-Kartuschen erreicht werden (Abb. 68). Etwa 65% unwirksamer Substanzen konnten bei gleichbleibender hämolytischer Aktivität aus dem Pulver entfernt werden. Durch die Verwendung von C18<sub>200mg</sub>-Kartuschen konnten 70% des Seifenkrautpulvers von den hämolytischen Saponinen getrennt werden (Abb. 69).



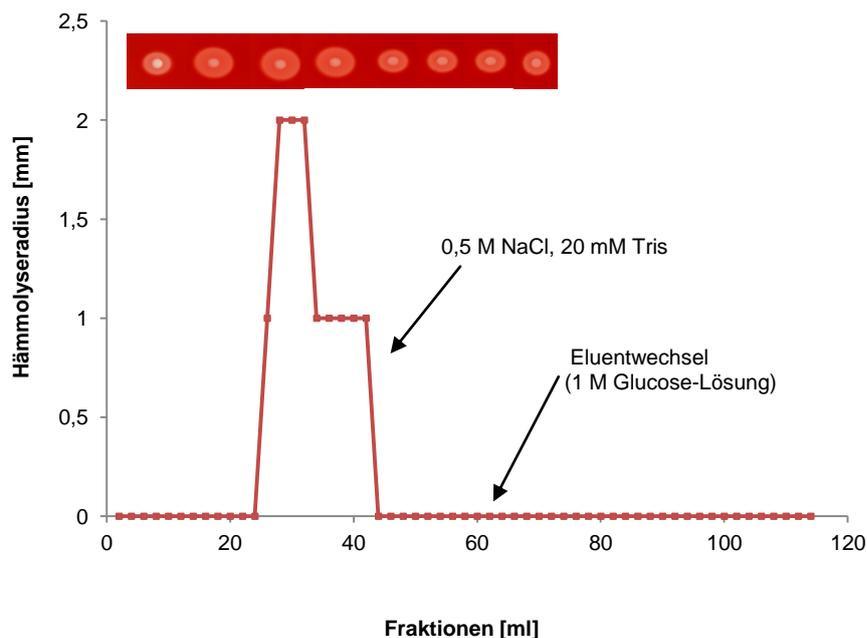
**Abb. 68:** Rückstände [mg] und Hämolyseradien [mm] der Methanol-Eluate von 50 mg Kastanienextrakt nach der Festphasenextraktion an verschiedenen Sorbensmaterialien.



**Abb. 69:** Rückstände [mg] und Hämolyseradien [mm] der Methanol-Eluate von 100 mg Seifenkrautextrakt nach der Festphasenextraktion an verschiedenen Sorbensmaterialien.

### 3.7.3.2. Affinitätschromatographie

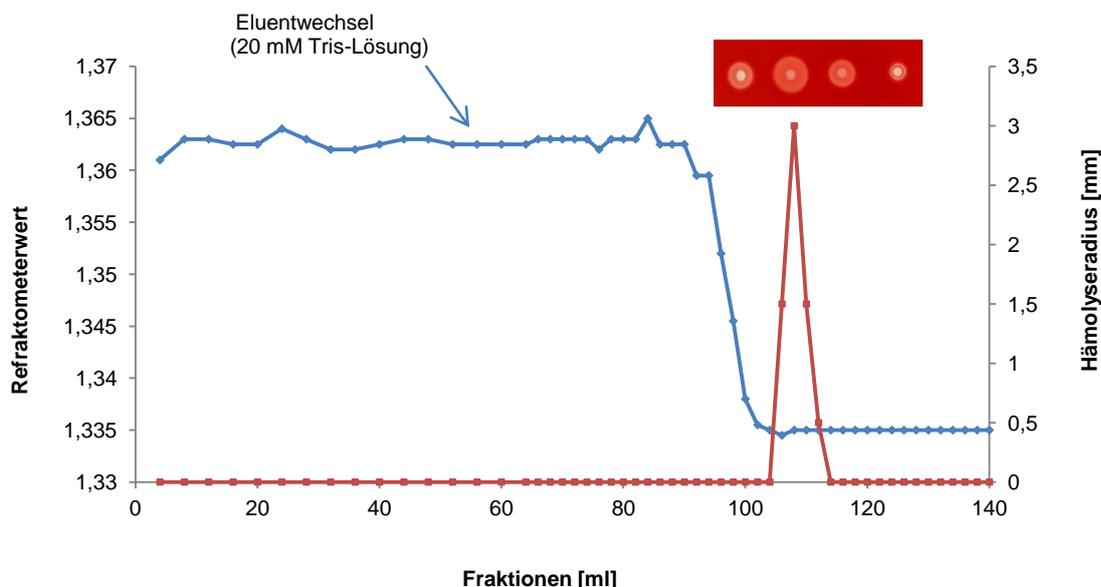
Die Affinitätschromatographie mit Concanavalin A Sepharose 4B und einer 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-Lösung führte nicht zu einer Bindung der Saponine an das Säulenmaterial. Die Saponine wurden direkt nach der Probenaufgabe von der Säule gewaschen und konnten im Hämolyse-Cuptest im Bereich der Eluentfront nachgewiesen werden (Abb. 70).



**Abb. 70:** Elution der hämolytischen Fraktionen von 100 mg Waschnussextrakt an Concanavalin A Sepharose 4B

### 3.7.3.3. HIC

Eine 1 M NaCl Konzentration erwies sich als zu niedrig, um eine Bindung der hämolytischen Waschnussaponine an das Säulenmaterial zu bewirken. Die Saponine eluierten zusammen mit den ersten ungebundenen Substanzen. Die Equilibrierung der Säule mit einem 3 M NaCl, 20 mM Tris-Puffer führte zu einer vollständigen Bindung der membranolytischen Saponine an das Phenyl-Sepharosegel. Im Hämolyse-Cuptest konnten keine Saponine im Säuleneluat detektiert werden. Bei der Elution der Waschnussaponine mit 70% Ethanol konnte in 12 ml der gesammelten Fraktionen starke hämolytische Aktivität nachgewiesen werden. In allen nachfolgenden Fraktionen wurde das Erscheinen kleinerer Höfe (ca. 1 mm) beobachtet. Die Verwendung von Reinstwasser als Eluent führte nicht zu einer Anreicherung der Saponine. Es konnten in 56 ml der gesammelten Fraktionen leichte hämolytische Aktivität nachgewiesen werden. Eine 20 mM Tris-Lösung (pH 8) bewirkte einer Anreicherung der Saponine auf 16 ml, eine nicht titrierte 20 mM Tris-Lösung (~ pH 10) auf 8 ml (Abb. 71). Die nicht titrierte 20 mM Tris-Lösung wurde daraufhin als Standardeluent für die HIC verwendet. Bei den Saponinextrakten von Kastanie, Primel, Yuccasaponin und dem käuflichen Aescin konnten im Tris-Eluat keine hämolytische Aktivität nachgewiesen werden. Die Saponine zeigten eine starke Affinität zum Säulenmaterial, so dass erst mit einem zweiten Elutionsschritt, unter Verwendung von 50% Ethanol, eine Elution vom Säulenmaterial erreicht wurde (Tab. 21). Für das Seifenrindenbaumextrakt konnten sowohl im 20 mM Tris-Eluat, als auch im 50% Ethanol-Eluat hämolytische Saponine nachgewiesen werden. Beim Efeuextrakt wurden keine hämolytischen Fraktionen detektiert.

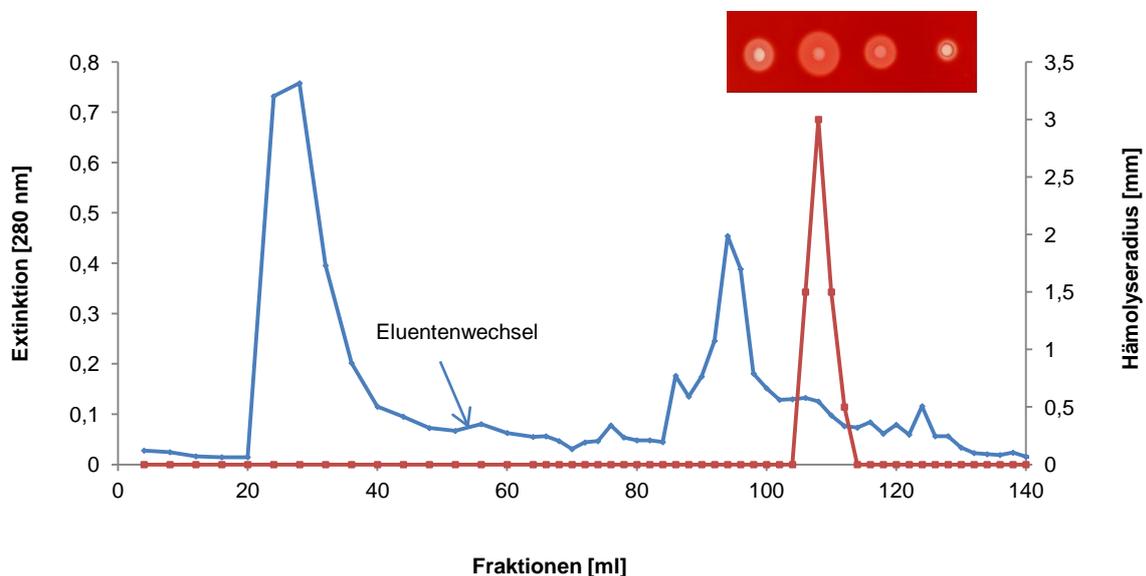


**Abb. 71:** Elution der 4 hämolytischen Fraktionen (8 ml) von 100 mg Waschnusseextrakt in Abhängigkeit vom NaCl-Gehalt an Phenyl Sepharose

**Tab. 21:** Übersicht der hämolytischen Fraktionen der Saponinextrakte und der verwendeten Eluenten für die HIC

Saponin	hämolytische Fraktionen [ml]	Eluent II
Waschnuss	8	20 mM Tris
Kastanie	8	20 mM Tris; 50% Ethanol
Aescin	6	20 mM Tris; 50% Ethanol
Seifenkraut	6	20 mM Tris
Seifenrindenbaum	8	20 mM Tris
	6	20 mM Tris; 50% Ethanol
Primel	6	20 mM Tris; 50% Ethanol
Yuccasaponin	8	20 mM Tris; 50% Ethanol
Efeu	0	20 mM Tris; 50% Ethanol

Es erfolgte eine Aufreinigung der Saponinextrakte an der Phenyl Sepharose-Säule. Die am Spektralphotometer gemessenen Extinktionswerte (280 nm) der eluierten Fraktionen zeigen, dass ein großer Teil an Verunreinigungen bereits mit der ersten Eluentfront von den Saponinen getrennt wurde (Abb. 72). Nur eine geringe Menge an nicht-saponinhaltigen Substanzen, beim Waschnussextrakt im Bereich von 116-122 ml, wurde zusammen mit den hämolytischen Saponinen eluiert.

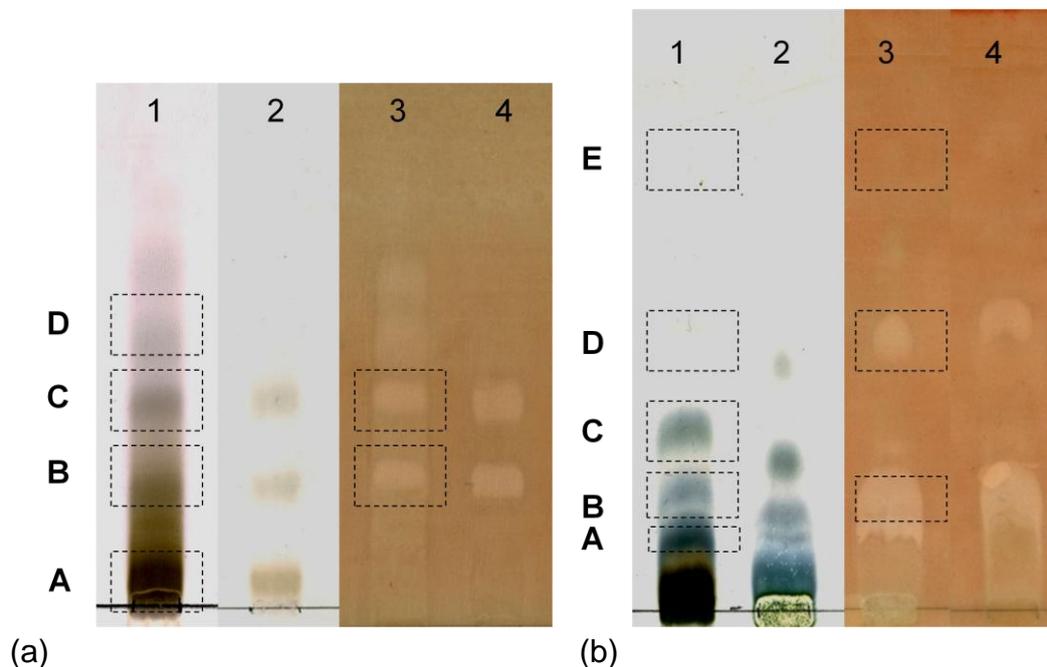


**Abb. 72:** Chromatogramm und Hämolyse der HIC Fraktionen von 100 mg Waschnussextrakt

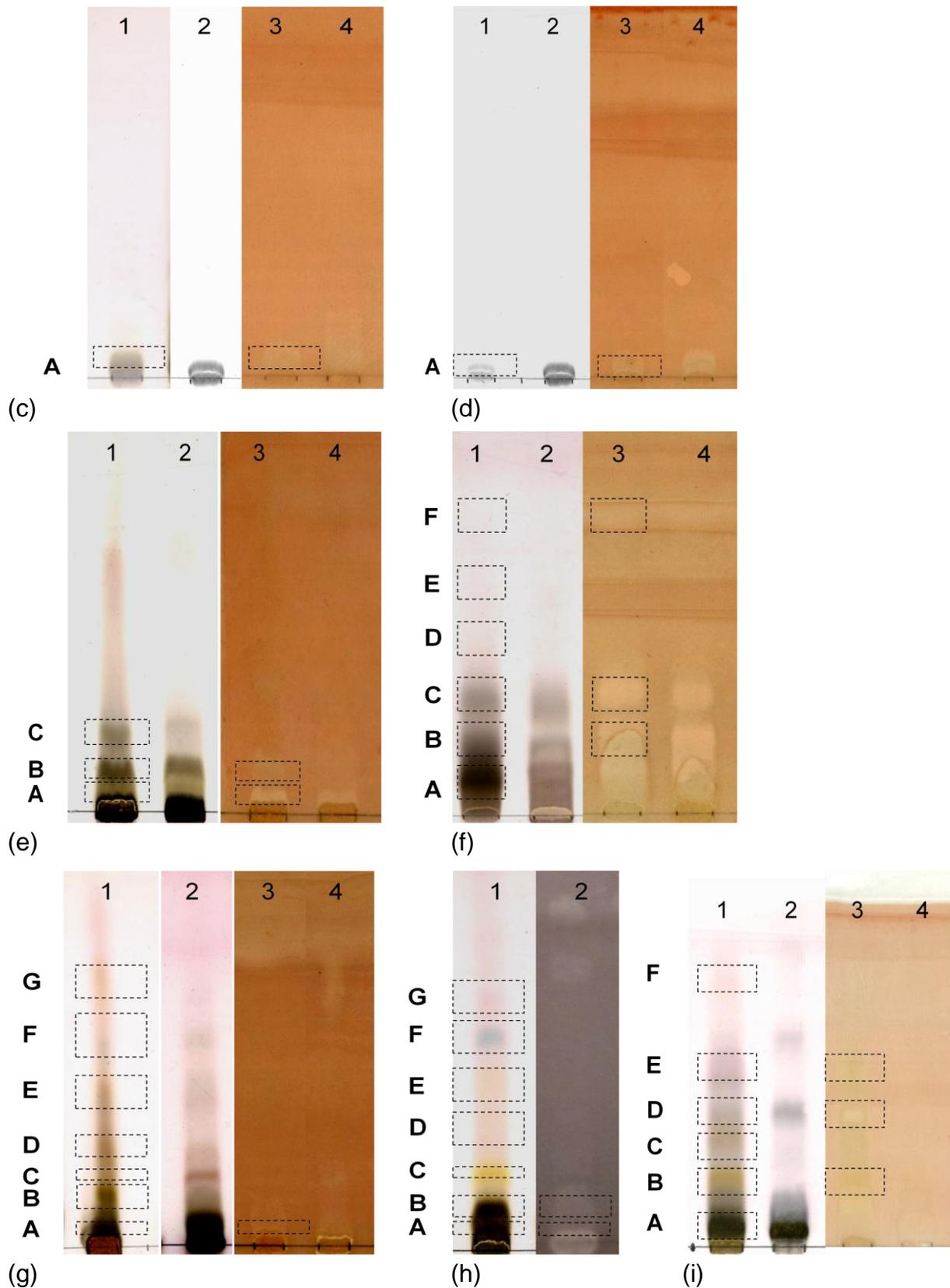
### 3.7.4. Auftrennung und Analyse von Saponinextrakten

#### 3.7.4.1. TLC

Mit der TLC konnte in allen Pflanzenextrakten ein „charakteristischer Fingerprint“ von maximal 7 Saponinbanden nachgewiesen werden. Die gefärbten TLC-Platten und die Rf-Werte der detektierten Saponinbanden sind in Abb. 73 a + b und Tab. 22 dargestellt. In einzelnen Fällen war die Färbung der Banden sehr schwach und nur für kurze Zeit sichtbar. Diese Banden wurden unmittelbar nach der Färbung der Platten markiert und sind ebenfalls in Abb. 73 dargestellt. Die mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz gefärbten Saponinbanden wiesen eine gelbe, grün-bläuliche, violette oder grau-braune Färbung auf. Die hämolytischen Saponine, die auf den mit heparinisiertem Schafblut beschichteten TLC-Platten detektiert wurden, erschienen als weiße Spots vor einem rosa Hintergrund. Die Färbung mit Ehrlich Reagenz lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Im Waschnuss-, Kastanien- und Primelextrakt sowie Aescin konnten ausschließlich Saponinbanden mit einem niedrigen Rf-Wert ( $\leq 0,37$ ) detektiert werden. Die Extrakte vom Seifenrindenbaum, Yuccasaponin, Efeu und Seifenkraut wiesen ein größeres Spektrum an Saponinen auf. Neben Saponinbanden mit einem niedrigen Rf-Wert konnten auch Banden mit höheren Werten von bis zu 0,72 nachgewiesen werden. In den HIC-Fractionen konnten die gleichen Saponinbanden wie im Gesamtextrakt detektiert werden. Diese waren deutlicher voneinander abgegrenzt als die Banden im Gesamtextrakt.



**Abb. 73 a:** TLC-Analyse der bandenförmig aufgetragenen Saponinextrakte von Waschnuss (a) und Seifenkraut (b) Spur 1: Rohextrakt und Spur 2 hämolytische HIC-Fraktion entwickelt mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz. Spur 3 Gesamtextrakt und Spur 4 hämolytische HIC-Fraktion gefärbt mit heparinisiertem Schafblut



**Abb. 73 b:** TLC-Analyse der bandenförmig aufgetragenen Saponinextrakte von Kastanie (c), Aescin (d), Primel (e), Yuccasaponin (f), Seifenrindenbaum (g), Quillajasaponin (h) und Efeu (i). Spur 1: Rohextrakt und Spur 2 hämolytische HIC-Fraktion entwickelt mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz. Spur 3 Gesamtextrakt und Spur 4 hämolytische HIC-Fraktion gefärbt mit heparinisertem Schafblut

**Tab. 22:** Rf-Werte der mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz und heparinisiertem Schafblut gefärbten Saponinbanden

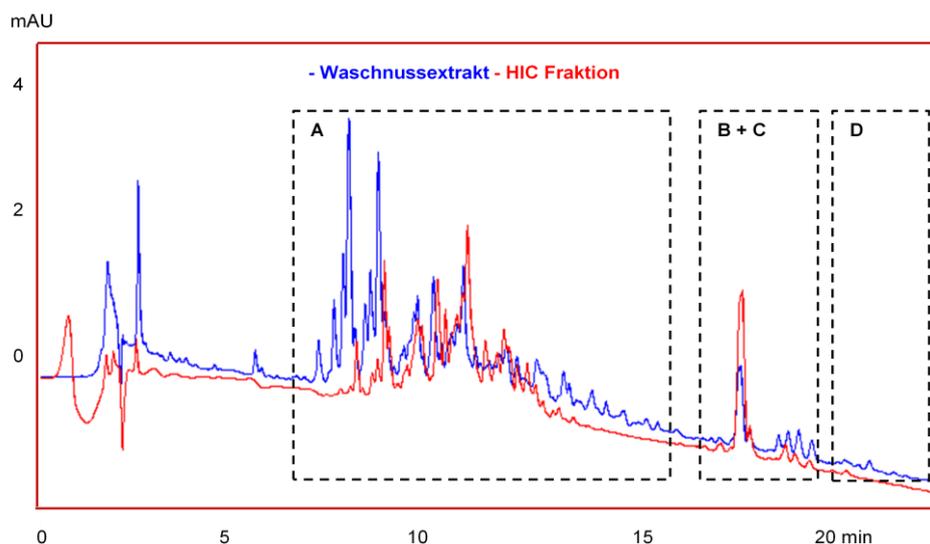
Saponinextrakt	Bande	Rf- Anisaldehyd-Schwefelsäure Reagenz	Rf- heparinisieretes Schafblut
Waschnuss (100 mg/ml)	A	0,04	
	B	0,13	0,13
	C	0,24	0,24
	D	0,37	
Seifenkraut (100 mg/ml)	A	0,10	
	B	0,18	0,18
	C	0,27	
	D	0,40	0,40
	E	0,70	0,70
Kastanie (50 mg/ml)	A	0,03	0,03
Aescin (≥ 97,9%, 1mg/ml)	A	0,02	0,02
Primel (200 mg/ml)	A	0,04	0,04
	B	0,10	0,10
	C	0,18	
Yuccasaponin (200 mg/ml)	A	0,08	
	B	0,18	0,18
	C	0,26	0,26
	D	0,40	
	E	0,53	
	F	0,68	0,68
Seifenrindenbaum (200 mg/ml)	A	0,05	0,05
	B	0,11	
	C	0,16	
	D	0,23	
	E	0,36	
	F	0,49	
	G	0,60	
Quillajasaponin (10-11%, 100 mg/ml)	A	0,05	0,05
	B	0,10	0,10
	C	0,18	
	D	0,28	
	E	0,38	
	F	0,49	
	G	0,58	
Efeu (100 mg/ml)	A	0,07	
	B	0,18	0,18
	C	0,26	
	D	0,36	0,36
	E	0,47	0,47
	F	0,72	

### 3.7.4.2. HPLC

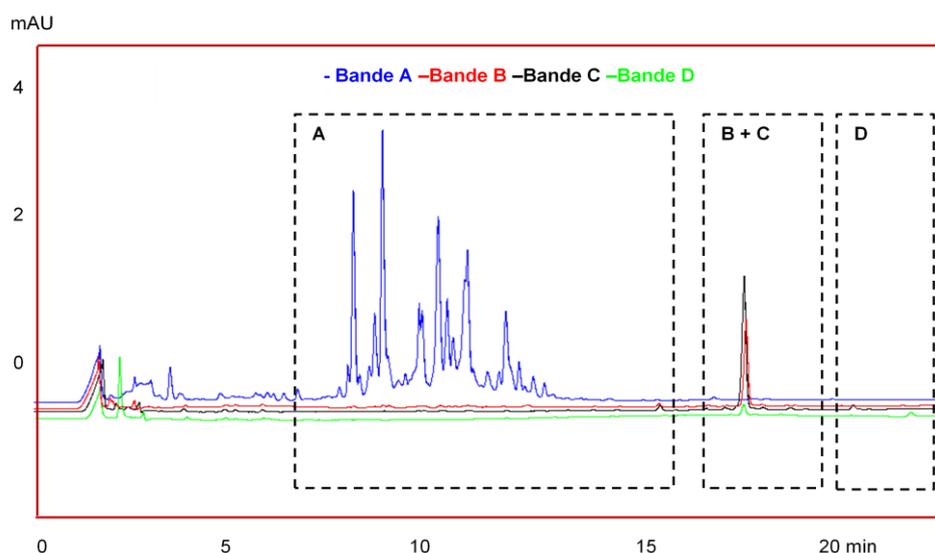
Die HPLC-Analysen der Saponinextrakte von Waschnuss, Kastanie und Seifenkraut, der hämolytischen HIC Fraktionen sowie der extrahierten TLC-Banden sind in Abb. 74-76 a + b dargestellt.

Für das Rohextrakt der Waschnuss konnte ein charakteristischer Peak bei 2,91 min und eine Peakgruppe mit mehreren größeren Peaks im Bereich von 7-16 min detektiert werden (Abb. 74 a). Diese Peakgruppe entsprach der nicht-hämolytischen TLC-Bande A (Abb. 69 b). Bei einer Retentionszeit von 18,68 min konnte ein

Einzelpeak, dem drei kleinere Peaks zwischen 19-21 min folgten, gemessen werden. Diese Peaks stellten gleichzeitig das TLC-Chromatogramm der hämolytischen Banden B und C dar. Für die TLC-Bande D konnten keine signifikanten Peaks nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Rohextrakt, war der Peak mit einer Retentionszeit von 2,91 min in den HIC-Fractionen deutlich niedriger. Die ersten beiden signifikanten Peaks im Bereich von 7-16 min waren stark reduziert, der Peak bei 18,68 min verstärkt.

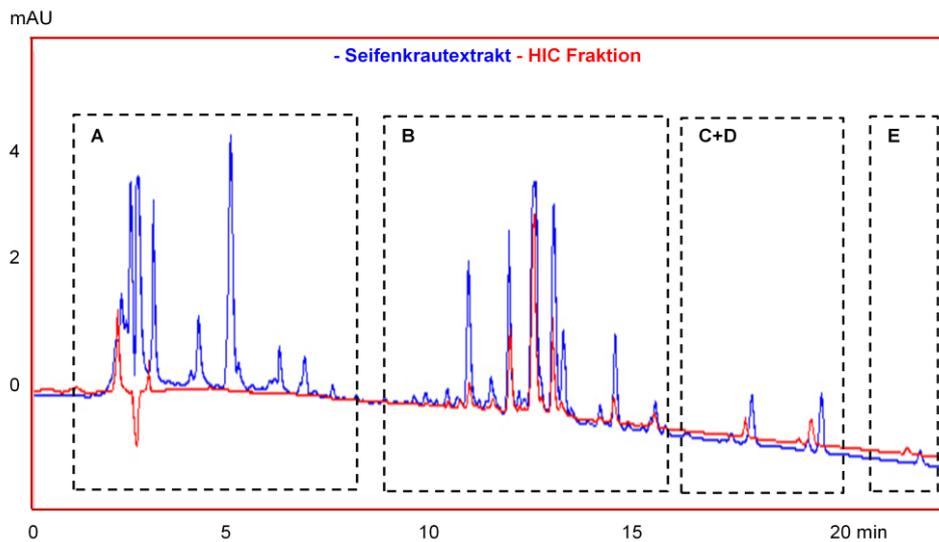


**Abb. 74 a:** HPLC-Analyse des Waschnussextraktes (0,5 mg) und der hämolytischen HIC Fraktion 1 mg Rohextrakt entsprechend (Bereiche der TLC-Banden A-D markiert)

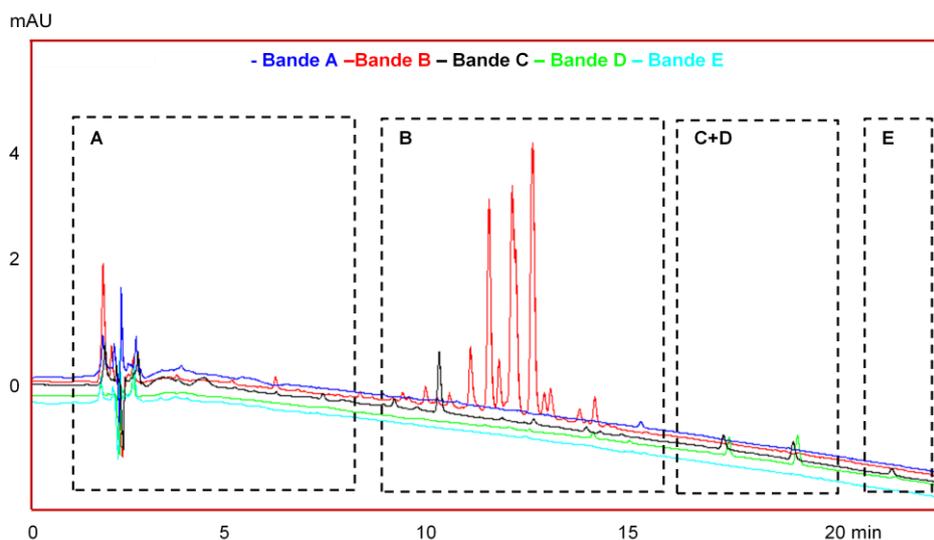


**Abb. 74 b:** HPLC-Analyse extrahierter TLC-Banden aus ca. 12 mg Waschnussextrakt

Die HPLC Analyse des Seifenkrautextraktes wies eine Gruppe von Peaks im Bereich von 2-3 min und im Bereich von 3,5-7 min auf (Abb. 75 a). Im Bereich von 10-16 min konnten mehrere charakteristische Einzelpeaks, die der hämolytischen Bande B aus der TLC-Analyse entsprachen, detektiert werden (Abb. 75 b). Es folgten zwei Einzelpeaks mit einer Retentionszeit von 17,29 und 18,96 min. Diese beiden Peaks entsprachen den nicht-hämolytischen Banden C und D aus der TLC-Analyse. Signifikante Peaks mit höheren Retentionszeiten wurden nicht detektiert. Das Chromatogramm der HIC-Fractionen zeigte im Gegensatz zur nicht aufgereinigten Probe keine Peaks zwischen 3,5-7 min. Alle Peaks mit höheren Retentionszeiten entsprachen annähernd denen des Rohextraktes.

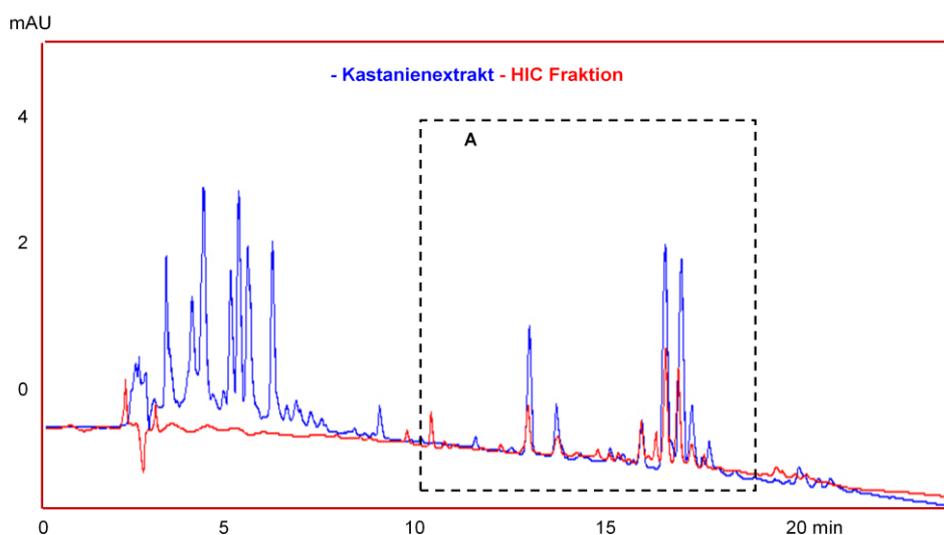


**Abb. 75 a:** HPLC-Analyse des Seifenkrautextraktes (0,5 mg) und der hämolytischen HIC Fraktion 2 mg Rohextrakt entsprechend (Bereiche der TLC-Banden A-E markiert)

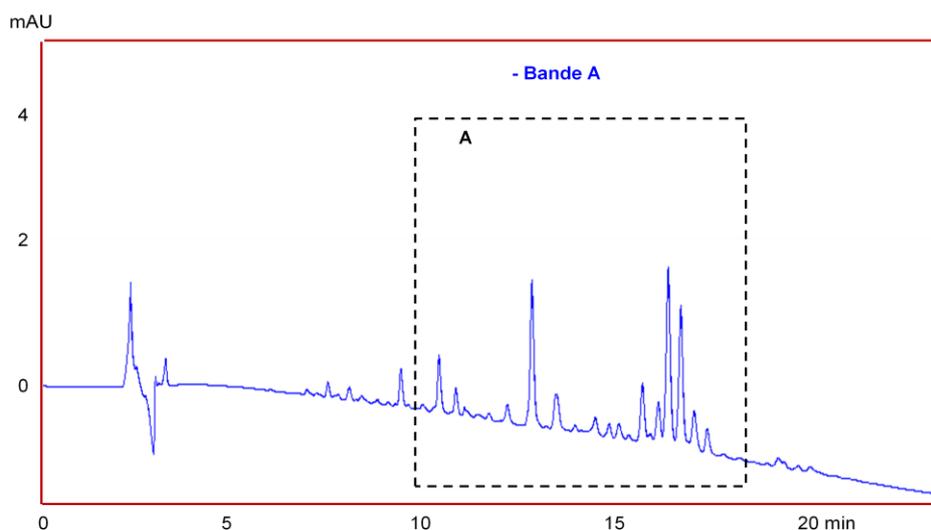


**Abb. 70 b:** HPLC-Analyse extrahierter TLC-Banden aus ca.12 mg Seifenkrautextrakt

Für das Rohextrakt der Kastanie konnte im Bereich von 2-7 min eine Gruppe nicht basislinien-getrennter Peaks detektiert werden (Abb. 76 a). Es folgten zwei größere Einzelpeaks mit einer Retentionszeit von 12,48 und 13,18 min sowie eine Gruppe von fünf Peaks zwischen 15-17 min. Diese Peaks stellten die hämolytische Bande A aus der TLC-Analyse des Kastanienextraktes dar (Abb. 76 b). Signifikante Peaks mit höheren Retentionszeiten konnten nicht detektiert werden. Das Chromatogramm der HIC-Fractionen entsprach dem der hämolytischen Bande A aus der TLC. Die Peakflächen der in diesem Bereich (10-19 min) eluierten Substanzen waren kleiner als die des Rohextraktes.



**Abb. 76 a:** HPLC-Analyse des Kastanienextraktes (0,5 mg) und der hämolytischen HIC Fraktion 5 mg Rohextrakt entsprechend (Bereiche der TLC-Bande A markiert)



**Abb. 76 b:** HPLC-Analyse extrahierter TLC-Banden aus ca. 6 mg Kastanienextrakt

### 3.7.5. Charakterisierung von Saponinfraktionen

Die situativ gesammelten HPLC-Fractionen der Rohextrakte, die Fraktionsgröße und die Retentionszeiten sind in Tab. 23 aufgeführt. Die Ergebnisse der mit diesen Fraktionen durchgeführten Versuche zur Schaumstabilität, Konidienkeimung, Hämolyse und Hemmung des Mycelwachstums von *V. inaequalis* sind ebenfalls dargestellt.

Die dritte Fraktion des Waschnuss- und Seifenkrautextraktes sowie die vierte Fraktion des Kastanienextraktes wiesen eine hohe Schaumstabilität auf und zeigten im Hämolyse-Cuptest eine starke membranolytische Aktivität. Die Fraktionen führten zu einer vollständigen Hemmung der Konidienkeimung und inhibierten im Agardiffusionstest das Wachstum von *V. inaequalis* zu 18-45% (Abb. 77).

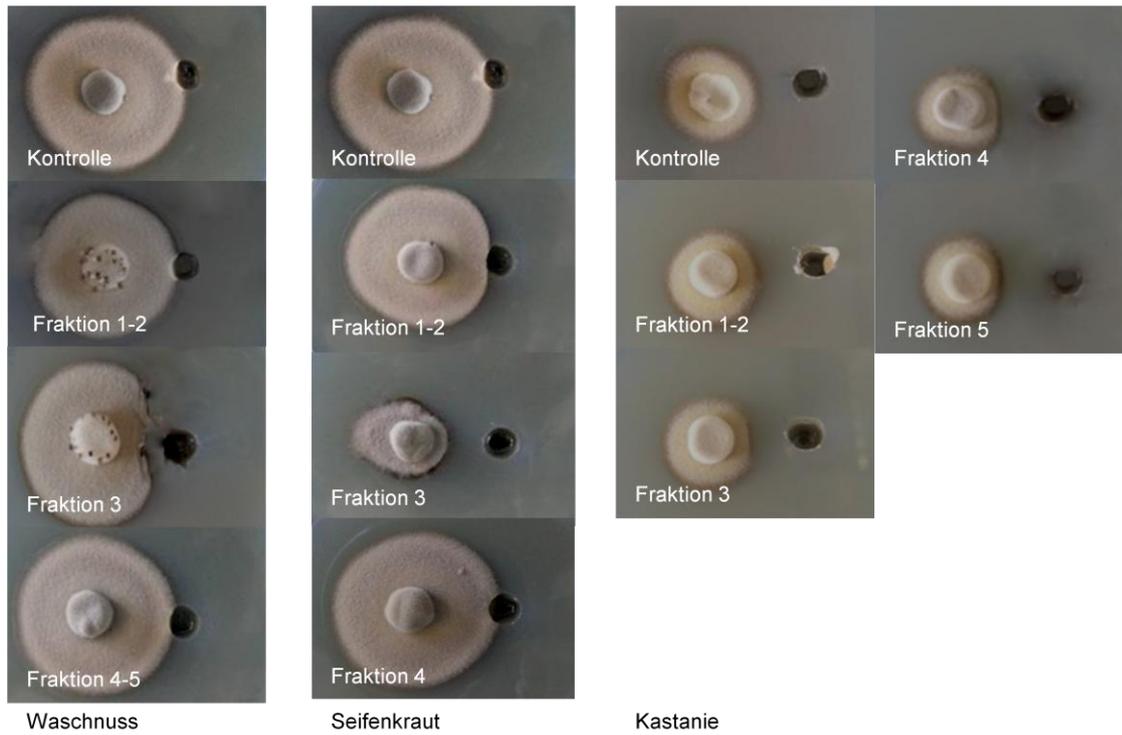
**Tab. 23:** Schaumstabilität, Konidienkeimfähigkeit, hämolytische Aktivität und Mycelhemmung durch die HPLC-Fractionen von Waschnuss-, Kastanien- und Seifenkrautextrakt

Saponinextrakt	TLC Bande	HPLC Fraktion	Retentionszeit [min]	Fraktionsgröße [ml]	Schaumstabilität	Hemmung Konidienkeimung [%]	Hämolyse-radius [mm]	Hemmung Mycelwachstum [%]
Waschnuss (50 mg/ml)	A	1	0,0- 7,0	7,0	-	5	-	0
		2	7,0-16,0	9,0	*	11	-	0
	B+C	3	16,0-18,8	2,8	***	100	3	45
		4	18,8-20,0	3,2	**	100	2	0
	D	5	20,0-30,0	8,0	-	4	-	0
Seifenkraut (50 mg/ml)	A	1	0,0- 8,0	8,0	-	100	-	5
		2	8,0-11,0	3,0	*	100	-	5
	B	3	11,0-13,6	2,6	***	100	2	40
		4	13,6-16,0	2,4	***	100	1	2
	C+D	5	16,0-18,0	2,0	*	100	-	0
		6	18,0-20,0	2,0	-	100	-	0
	E	7	20,0-30,0	10,0	-	0	-	0
Kastanie (50 mg/ml)	A	1	0,0-10,0	10,0	-	5	0	0
		2	10,0-14,0	4,0	**	100	0,5	0
		3	14,0-16,2	2,2	***	100	3	9
		4	16,2-19,0	2,8	***	100	3	18
		5	19,0-30,0	11,0	**	10	0,5	9

\* wenig Schaum, nur kurze Zeit stabil ~ 1 min

\*\* stabiler Schaum ≤ 5 min

\*\*\* stabiler Schaum ≥ 5 min



**Abb. 77:** Wachstumshemmung von *V. inaequalis* durch die HPLC-Fractionen aus etwa 5 mg der Saponinextrakte von Waschnuss und Seifenkraut nach einer Inkubationszeit von 21 d und von Kastanie nach 14 d

## 4. Diskussion

### 4.1. Wirkung der Falllaubbehandlungen auf das Ascosporenpotenzial

Behandlungen mit Harnstoff (5 kg/hl) erfolgen in der Praxis zu Beginn und gegen Ende des Laubfalls, um die Pseudothecienentwicklung während der saprophytischen Phase von *V. inaequalis* zu verhindern (Österreicher, 2014). Eine Harnstoffbehandlung des Falllaubs wurde von Vincent et al. (2004) erprobt. Das Ascosporeninokulum der überwinterten Blätter, welches mit einer Sporenfalle bestimmt wurde, konnte um bis zu 97% reduziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Applikation von Harnstoff im Herbst/Winter auf schorfbefallenes Falllaub ein vergleichbarer Wirkungsgrad von 97-100% nachgewiesen. Die behandelten Blätter zeigten zu Beginn des Frühjahres Anzeichen eines leichten Blattabbaus. Diese Strukturveränderungen und Zerfallserscheinungen sind hinreichend, jedoch nicht notwendig für eine Reduktion des Sporenpotenzials (Kollar & Pfeiffer, 2005). Die Behandlungen mit Harnstoff dienten als Standard, um eine biologische Bewertung des Wirkungsgrades, der mit den entwickelten Nährmedien, Fungiziden und Antagonisten erreicht wurde, zu ermöglichen.

Im ökologischen Obstbau stehen neben Kupferpräparaten nur Netzschwefel und Schwefelkalk für die Schorfbekämpfung zur Verfügung (Holb et al., 2003). Netzschwefel zeigt keine kurative Wirkung und kann im Pflanzenschutz nur kurz vor oder zu Beginn der primären RIMpro-Infektionsperiode eingesetzt werden (Mills, 1944; Jamar et al., 2010). Vor diesem Hintergrund ist die Reduktion der Ascosporenmenge um 60% durch eine Netzschwefelbehandlung 1% des Falllaubs in Dossenheim als positiv zu bewerten. Durch die zum Teil mikroaerophilen Bedingungen, die durch Abbauprozesse im Falllaub entstehen können, wurden möglicherweise das Wachstum und die Aktivität von Desulfurikanten und Schwefeloxidierern begünstigt. Letzteres könnte zu einer verstärkten Freisetzung von Oxidationsprodukten und Schwefelwasserstoff geführt haben. Vermutlich wurde die fungizide Wirkung des Präparates nicht vollständig ausgeschöpft, da die Sublimation des Schwefels erst oberhalb von 10°C einsetzt und zum Zeitpunkt der Behandlungen niedrigere Temperaturen vorherrschten (s. 7.1.3.).

Einige Falllaubdepots wurden mit saponinhaltigen Pflanzenextrakten/-tees behandelt, um eine direkte fungizide Wirkung auf den Erreger und die Fruchtkörperbildung zu erreichen. Es wurden Extrakte von *Saponaria officinalis*, *Yucca schidigera* und *Quillaja saponaria* verwendet, für die eine schorfhemmende Wirkung beschrieben ist (Späth, 2000; Köhl, 2007). Pflanzenextrakte aus dem Pericarp der indischen Waschnuss (*Sapindus mukorossi*), der Kastanie (*Aesculus hippocastanum*) und der Primelwurzel (*Primula veris*) weisen einen hohen Saponingehalt auf (Bosshard, 1916; Müller et al., 2006; Sharma et al., 2012; 2013) und wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals für die Falllaubbehandlung verwendet. Die Heißwasserauszüge aus den Pflanzenmaterialien (Tees) hatten nur eine geringe Wirkung auf die Reduktion des Ascosporenpotenzials. Die Konzentration der in Lösung gegangenen Saponine

und/oder die verwendete Menge der Pflanzenmaterialien war offenbar zu gering, um einen fungiziden Effekt auf den Erreger zu erhalten. Es kann angenommen werden, dass die Saponine von den Blättern teilweise abgewaschen wurden, da in den drei Tagen nach der ersten Behandlung des Falllaubs insgesamt ~34 mm Niederschlag fielen (s. 7.1.1.). Den weiteren Behandlungen folgte jeweils eine längere Trockenperiode von mindestens drei Tagen. Eine fungizide Wirkung der Saponine auf das Mycelwachstum und die Anlage der Pseudothecien sollte in diesem Zeitraum möglich gewesen sein. Eine Erklärung für die unzureichende Wirkung wäre, dass die Saponine inaktiviert wurden. Die nachlassende Aktivität von Saponinen unter Freilandbedingungen ist bereits vielfach beschrieben und unter anderem auf ihre geringe Licht-Stabilität und hohe Wasserlöslichkeit zurückzuführen (Bosshard, 1993; Bosshard & Häseli, 1993; Loskill et al., 2009). Viele pflanzenpathogene Pilze haben Schutzstrategien vor der membranolytischen Wirkung der Saponine entwickelt. Sie synthetisieren saponinspezifische Glycosylhydrolasen, die die Zuckerketten am C<sub>3</sub>-Atom abspalten, was eine Inaktivierung/Umformung in eine weniger toxische Substanz zur Folge hat (Osbourne, 1996; Papadopoulou et al., 1999; Bouarab et al., 2002). In dieser Arbeit konnte *in vitro* eine hemmende Wirkung der Saponinextrakte auf die Konidienkeimung und das Mycelwachstum von *V. inaequalis* festgestellt werden. Im Gewächshaus und Freiland führte die präventive und kurative Applikation der Pflanzenextrakte zu einer Abnahme des sichtbaren Schorfbefalls und einer reduzierten Sporulation des Erregers. Auf Grundlage dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass *V. inaequalis* keine spezifischen Glycosylhydrolasen zur Inaktivierung der getesteten Saponine synthetisieren kann.

Die Behandlungen des Falllaubs mit Saponinextrakten führten 2012 zu einer starken Förderung des Ascosporenpotenzials. Die Konzentrationen der Extrakte lagen deutlich über den zuvor in Konidien- und Wachstumshemmtests bestimmten IC<sub>50</sub>-Werten. Durch die „verschlechterten“ Wachstumsbedingungen könnte die sexuelle Phase des Apfelschorfs verstärkt initiiert worden sein. Zudem könnte die Saponinbehandlung auf Konkurrenten von *V. inaequalis* eine stärkere Wirkung als auf den Erreger, und somit indirekt die Fruchtkörperentwicklung, begünstigt haben. Es sollte auch in Betracht gezogen werden, dass Saponine aufgrund ihrer membranolytischen und detergenzartigen Wirkung (Dourmashkin et al., 1962) das Nährstoffangebot verbessert (Aufschluss von Nährstoffen, Zellyseprodukte von Bakterien etc.) und so zum Wachstum und zur Entwicklung des Erregers beigetragen haben könnten.

Im Jahre 2013 wurde die Ascosporenmenge durch eine viermalige Applikation von Waschnussextrakt 1% um 48%, von Waschnussextrakt 0,1% um 61% vermindert. Eine zweimalige Applikation der Extrakte führte zu niedrigeren Wirkungsgraden als die viermalige. Im Jahr 2014 bewirkte die viermalige Applikation von Waschnussextrakt 3% eine Förderung des Ascosporenpotenzials, die einmalige Behandlung eine Reduktion um etwa 40%. Die Wechselbeziehungen und der Wirkungsgrad der Präparate sowie die Reproduzierbarkeit der Ascosporenrückbildung bleiben „chaotisch“. Scheinbar schlägt die nachweislich fungizide Wirkung der

Pflanzenextrakte bei einer bestimmten Konzentration und/oder Applikationsmenge in eine Förderung der Ascosporenmenge um. In weiteren Versuchen sollte geklärt werden, welche Konzentrationen und wie viele Applikationen der Extrakte notwendig sind, um hohe Wirkungsgrade zu gewährleisten.

Im Jahre 2013 konnte die Ascosporenmenge durch eine viermalige Applikation von Aescin 1% um 90% vermindert werden. Eine Terminierung der Falllaubbehandlungen im späten Winter (Jan., Feb.) erwies sich als besonders günstig. Zu diesem Zeitpunkt kann die Anlage der Ascii bereits abgeschlossen sein (MacHardy, 1996), so dass eine fungizide Wirkung auf die Fruchtkörper zu einer deutlichen Reduktion des Sporenpotenzials führen sollte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen das Potenzial saponinhaltiger Pflanzenextrakte, das Ascosporenpotenzial von *V. inaequalis* zu minimieren.

Die *in vitro* identifizierten Antagonisten konnten im Freiland nicht zu einer wesentlichen Reduktion des Ascosporenpotenzials beitragen. Die unzureichende Wirkung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die vom Falllaub isolierten „Antagonisten“ nicht die tatsächlichen Verursacher einer reduzierten Ascosporenmenge sind. Möglicherweise spielen Falllaubdestruenten eine Rolle, die *in vitro* prinzipiell nicht detektiert werden können. Zudem kann von der hemmenden Wirkung der Antagonisten *in vitro* nicht auf ihre fungizide Wirkung im Freiland geschlossen werden. Eine *in vitro*-Selektion erweist sich daher häufig als ungeeignet, um die tatsächlichen Antagonisten eines Pathogens zu identifizieren.

Die Mikroorganismen wurden nach dem Blattfall auf den Falllaubdepots ausgebracht (21.11.2012; 10.12.2013). Wie Carisse & Roland (2004) in ihren Studien zeigen konnten, scheint der Applikationszeitpunkt eine wesentliche Rolle für die Hemmung der Ascosporenproduktion zu spielen. Eine Behandlung mit *Microsphaeropsis ochracea* kurz vor dem Blattfall zeigte gegenüber einer Falllaubbehandlung eine höhere Effektivität auf die Reduktion des Ascosporenpotenzials. Die antagonistische Wirkung von *M. ochracea* im Falllaub war umso höher, je früher der Pilz ausgebracht wurde (Carisse & Rolland, 2004). Eine Behandlung schorfbefallener Blätter im Freiland reduzierte das Ascosporenpotenzial im August um 94-99%. Eine späte Applikation im November nur noch um 54-67%. In Arbeiten von Kollar und Pfeiffer konnte bei einer Applikation nach dem Blattfall keine Reduktion der Ascosporenmenge nachgewiesen werden (pers. Mitteilung Kollar, A.). Die verminderte Wirkung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Temperaturen kurz nach dem Blattfall niedriger und somit ungünstiger für das Wachstum und die Sporenkeimung des Pilzes waren (Carisse & Rolland, 2004). Zudem wurde davon ausgegangen, dass *M. ochracea* bei einer frühen Applikation das Mycel von *V. inaequalis* parasitiert. Die Paarung der bipolaren „+ und -“ Mycelien würde dadurch verhindert und die Bildung der Pseudothecien beeinträchtigt werden.

Die Tagesdurchschnittstemperatur in den ersten 3 Tagen nach der Applikation der Antagonisten lag bei -0,4°C bis 5°C (s. 7.1.3., 7.1.4.). In den folgenden Tagen nach

der Applikation blieben die Temperaturen vergleichbar oder stiegen bis auf etwa 8°C an. Eine Temperatur von  $\geq 5^\circ\text{C}$  ermöglichte *in vitro* auf Blätteragar ein gutes Mycelwachstum von *Leptosphaeria* sp. Bei einer Temperatur  $\leq 5^\circ\text{C}$  konnte nur ein geringfügiger Mycelzuwachs beobachtet werden. Es kann daher angenommen werden, dass die vorliegenden Temperaturen in der Zeit nach der Applikation für das Wachstum der Antagonisten nicht optimal waren. In den ersten fünf Tagen nach der Applikation kam es zu mehreren Regenereignissen. Diese könnten das Wachstum und die Etablierung auf dem Falllaub zusätzlich durch die Auswaschung von Nährstoffen beeinträchtigt haben. Eine weitere Ursache für die unzureichende Wirkung der Antagonisten könnte sein, dass sie durch die Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen um Platz, Nährstoffe etc. und/oder Parasitismus aus dem Habitat verdrängt wurden. Der Konkurrenzdruck könnte auch dazu beigetragen haben, dass die Antagonisten auf dem natürlichen Blattmedium nicht oder nur in geringen Konzentrationen Hemmstoffe synthetisiert und freigesetzt haben. Zudem unterliegen die von Mikroorganismen synthetisierten Antimykotika/Antibiotika häufig einem schnellen biologischen Abbau. So konnten Boudreau und Andrews (1987) zeigen, dass die von *Chaetomium globosum* freigesetzten Antibiotika eine geringe Stabilität aufweisen und ihre Aktivität z.B. durch eine Änderungen des pH-Wertes verlieren.

Das Ascosporenpotenzial des mit *Leptosphaeria* sp., *A. pullulans* und *E. nigrum* behandelten Falllaubdepots war gegenüber der Kontrolle gefördert. Die Freisetzung von Hemmstoffe und die damit einhergehenden „schlechteren“ Wachstumsbedingungen könnten eine verstärkte Fruchtkörperbildung bei *V. inaequalis* initiiert haben. Wie Burchill & Cook (1970) in ihren Studien feststellten, können antagonistische bakterielle Populationen das Wachstum der Pseudothecien stimulieren oder inhibieren. Alle Versuche zur effektiven biologischen Bekämpfung der Apfelschorffruchtkörper durch das Ausbringen von Antagonisten oder deren Stoffwechselprodukten sind bisher gescheitert. Der guten Wirkung *in vitro* und im Gewächshaus stand immer eine unzureichende Wirkung im Freiland gegenüber (Burr et al. 1996; Heye 1982; Heye & Andrews 1983; Young and Andrews, 1990; Miedtke & Kennel, 1990).

Die erste Behandlung des Falllaubs mit TSB 9% erfolgte durch den frühen Schneefall im Nov./Dez. 2010 erst im Jan. 2011. Es konnte eine Reduktion des Ascosporenpotenzials um 98% erreicht werden. Die kurze Wirkdauer von Mitte Januar bis Mitte März, mit einer Durchschnittstemperatur von 3°C, war ausreichend, um die Ascosporenmenge signifikant zu reduzieren. Es bestätigte sich die beschriebene Wirkung des TSB 9% von einer Reduktion der Ascosporenmenge um mehr als 90% (Kollar & Pfeiffer, 2005; Pfeiffer et al., 2004). Im darauf folgenden Versuchsjahr führte die Applikation von TSB 9% zu einer Reduktion des Ascosporenpotenzials um 62%. Möglicherweise waren die niedrigen Temperaturen an den Tagen nach der ersten Falllaubbehandlung für die verminderte Wirkung verantwortlich. Die starken Niederschläge an den nachfolgenden Tagen der anderen Behandlungstermine (s. 7.1.2.) könnten auch zu einer Verdünnung/Abwaschung des Präparates geführt haben. Die Wirkung von TSB war konzentrationsabhängig. Eine

Behandlung mit TSB 4,5% konnte das Ascosporenpotenzial nicht ausreichend vermindern. Eine vorherige Hitzebehandlung des TSB wurde erprobt. Ziel war es, schwer lösliche Stoffe besser in Lösung zu bringen. Ein möglicher Wirkungsverlust des Präparates durch die Inaktivierung hitzesensitiver Wirkstoffe sollte untersucht werden. Es zeigte sich, dass eine Hitzebehandlung des TSB keinen Einfluss auf die Effizienz des Präparates hatte. In folgenden Behandlungen war dieser energieaufwändige Vorbereitungsschritt verzichtbar. Das Ethanolextrakt und -präzipitat von TSB wurden verwendet, um zu prüfen, ob ethanollösliche/unlösliche Fraktionen des Präparates für die Wirkung verantwortlich sind. Beide Extrakte zeigten einen ähnlichen Wirkungsgrad, der deutlich niedriger war als der des TSB. Für die Wirkung des Präparates sind folglich Bestandteile mit und ohne Ethanol Löslichkeit verantwortlich.

Das TSB-Präparat besteht im Wesentlichen aus enzymatischen Abbauprodukten von Casein und Soja. Die Falllaubbehandlung mit Pepton Casein 6% oder den Casaminoacids 6% führte 2011 zu einer fast vollständigen Reduktion des Ascosporeninokulums. Die Pepton Soja 6% Behandlung konnte das Ascosporenpotenzial nicht in diesem Umfang reduzieren. Die Wirkung der Präparate ist demzufolge auf die Abbauprodukte von Casein zurückzuführen. Ein Säurehydrolyseverdau von Casein erwies sich als ebenso effektiv, wie ein schonender enzymatischer Abbau.

Die Behandlung der Falllaubdepots mit einem Hefeextrakt LEIBER 1,1% bewirkte eine geringfügige Reduktion der Ascosporenmenge. Eine vorherige Hitzebehandlung bzw. die Verwendung eines Ethanolextraktes oder -präzipitates konnte die Wirksamkeit des Präparates nicht entscheidend verbessern. Eine höher konzentrierte Hefebouillon 6% führte zu einer Steigerung der Wirkung. Die Weiterentwicklung des Präparates zu einem konzentrierten Hefeextrakt, in dem wasserlösliche Bestandteile angereichert waren, bewirkte eine nahezu vollständige Inhibierung des Ascosporenpotenzials in zwei aufeinander folgenden Versuchsjahren. Die Zugabe von Saccharose 6% konnte die Wirkung nicht entscheidend verbessern. Die hohe Hefeextraktkonzentration führte zu einem Verklumpen der Suspension beim Anrühren und war schwer in Lösung zu bringen (ca.1 h), da die Löslichkeitsgrenze überschritten war. Dieses Problem wurde durch das mechanische Einrühren des Hefeextraktes und einen anschließenden Zentrifugationsschritt behoben, bei dem unlösliche Bestandteile abgetrennt wurden. Das Pellet des konzentrierten Hefeextraktes wies eine relativ feste Konsistenz auf. Unter Zugabe von Wasser konnte es gelöst und ebenfalls auf dem Falllaub ausgebracht werden. Die Behandlung bewirkte eine deutliche Verminderung des Ascosporenpotenzials. Das Pellet enthält demnach ebenfalls wirksame Inhaltsstoffe. Ausgehend von der guten Wirkung des konzentrierten Hefeextraktes wurde eine um etwa 50% geringere Hefeextraktkonzentration getestet. Diese führte zu einer vergleichbaren Wirkung bei einer fast vollständigen Verwertbarkeit des vorliegenden Hefeextraktes, da dieses nahezu vollständig in Lösung ging. Die zweimalige Applikation der Extrakte zeigte etwa den gleichen Wirkungsgrad wie eine viermalige Applikation, wobei eine

Behandlung im späten Herbst etwas effektiver als eine Behandlung im Winter war. Eine Einmalbehandlung der Blattdepots konnte das Sporenpotenzial des Erregers nicht ausreichend vermindern.

Die Vitamine Pyridoxin (Vit. B<sub>6</sub>), Nicotinsäure (Vit. B<sub>3</sub>) und Thiamin (Vit. B<sub>1</sub>) sind wichtige Bestandteile des LEIBER Hefeextraktes. Pyridoxin und Nicotinsäure haben einen positiven Effekt auf die Entwicklung von *V. inaequalis* (Leben und Keitt, 1948; Fothergill und Ashcroft, 1955 a + b). Das Vorhandensein von Thiamin gilt als essentiell. Die Fragestellung, ob die Vitamine in den verwendeten Konzentrationen des Hefeextraktes zu einer Förderung des Erregers beitragen, sollte geklärt werden. Der konzentrierte Vitamin-Mix war nur als nicht vollständig homogene Dispersion zu verwenden und wurde möglicherweise ungleichmäßig auf dem Falllaub ausgebracht. Eine Vitaminkonzentration, die den Vitaminen in dem LEIBER Hefeextrakt 6% entsprach, reduzierte die Ascosporenfreisetzung in geringem Umfang. Höhere Konzentrationen des Vitamin-Mixes hemmten die Ascosporenpoduktion nahezu vollständig. Die Vitamine des Hefeextraktes sollten in der angewendeten Zusammensetzung und Konzentration demzufolge keinen positiven Einfluss auf die Entwicklung von *V. inaequalis* und die Initiation der Pseudothecien haben. Die hemmende Wirkung des konzentrierten Vitamin-Mixes ist hauptsächlich auf Vit. B<sub>3</sub> zurückzuführen. Eine Behandlung des Falllaubs mit dem wasserlöslichen Vit. B<sub>3</sub> reduzierte das Ascosporenpotenzial ebenso wie der Vitamin-Mix. Niedrigere Vit. B<sub>3</sub> Konzentrationen förderten die Entwicklung der Pseudothecien (2014). In den Microwell-Platten-Hemmtests zeigte auch Vit. B<sub>1</sub> in hohen Konzentrationen ein fungizides Potenzial. Trotz der hohen Wirksamkeit einiger Vitamin-Präparate wäre vor dem Hintergrund einer Präparatoptimierung und -entwicklung neben einer Zulassungsfähigkeit im ökologischen Obstbau die Kostenfrage für eine praktische Anwendung zu prüfen.

Die schorfhemmende Wirkung der applizierten Nährmedien und Fungizide kann nicht auf eine Verschiebung des pH-Wertes im Falllaub zurückgeführt werden. Die von den Blättern abgewaschenen, wässrigen Suspensionen zeigten zu Beginn der Ascosporenreife einen pH-Wert zwischen 5,6 und 7,4. Eine hemmende Wirkung auf das Mycelwachstum ist für einen basischen pH-Wert  $\text{pH} \geq 7$  bzw. ein saurer  $\text{pH} \leq 4$  beschrieben (Cook, 1969; Ross & Hamlin, 1962; MacHardy, 1996). Kollar & Pfeiffer (2003) konnten bei einem pH-Wert zwischen 5,0 und 10,0 keinen Einfluss auf die Sporenfreisetzung des Erregers feststellen.

#### **4.2. Charakterisierung der mikrobiellen Aktivität auf dem Falllaub und dem Blattabbau durch Regenwürmer**

In allen Falllaubdepots, die mit Caseinabbauprodukten oder LEIBER Hefeextrakten behandelt wurden, konnte eine quantitative Förderung der laubzersetzenden Mikroben nachgewiesen werden. Die CFUs der Pilze und Bakterien waren im Vergleich zu unbehandelten Blättern deutlich erhöht. Dadurch kam es zu einem Anstieg des biologischen Sauerstoffbedarfes der Mikroorganismen in den

verwendeten OXI-Top-Testsystemen. Die Behandlung mit einem konzentrierten LEIBER Hefeextrakt förderte die mikrobiologische Aktivität am stärksten. Der Anstieg des BSB<sub>5</sub> korrelierte mit der Konzentration der Nährmedien und ist vermutlich auf die bessere Verfügbarkeit der Nährstoffe zurückzuführen. Die Mikroben fördernde Wirkung der Nährmedien konnte auch bei einer niedrigen Inkubationstemperatur von 10°C, wie sie im Behandlungszeitraum und bis zum Beginn der Ascosporenreife üblicherweise vorliegt (7.1.1. - 7.1.4), nachgewiesen werden.

Die Kolonien der Pilze aus den unbehandelten Blättern nahmen vom Winter bis zum Beginn des Frühjahres ab (23.02.2012-06.04.2012). Dieser Trend konnte bei den Behandlungen, die das Wachstum der Pilze stark förderten, wie den Casaminoacids 6%, dem TSB 9% und dem Hefeextrakt LEIBER 6%, bestätigt werden. Bei den Bakterien wurde im gleichen Zeitraum eine Zunahme der CFUs in den unbehandelten und den mit Nährmedien behandelten Blattdepots nachgewiesen. Der Prozess spiegelt die natürliche Sukzession der Mikroorganismen auf dem Falllaub wider. Saprophytische Pilze, die zu den wichtigsten Primärbesiedlern gehören (Snajdr et al., 2011), werden im Verlauf der Falllaubzersetzung von Bakterien abgelöst/verdrängt (Romani et al., 2006).

Die Nährmedien, die das Wachstum und die Aktivität der Mikroorganismen am stärksten förderten, waren auch die wirkungsvollsten Präparate zur Reduktion des Ascosporenpotenzials. Die Zunahme der Falllaubbesiedler könnte zu einer verstärkten Konkurrenz um Nährstoffe und/oder Raum auf den überwinterten Blättern geführt haben. Vier Wochen nach der ersten Behandlung (Dezember 2011/2012) war die mikrobielle Aktivität bereits deutlich erhöht. Das Wachstum der bipolaren „+ und -“ Mycelien, welches in den ersten zwei bis drei Wochen nach dem Blattfall stattfindet (MacHardy, 1996; Li & Xu, 2002), könnte dadurch beeinträchtigt worden sein. Dies könnte zu einer Störung bei der Anlage/Initiation der Fruchtkörperbildung geführt haben.

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

Die Zunahme der Falllaubbesiedler auf den mit Nährmedien behandelten Blättern hatte einen verstärkten Blattabbau zur Folge. Diese Beobachtung wurde auch von Tshomo et al. (2003) gemacht, die Pilze der Gattung *Phoma*, *Epicoccum*, *Chaetomium* sowie *Trametes versicolor* aus der Phyllosphäre und vom Falllaub verschiedener Obstbäume isolierten. Die Organismen konnten sich *in vitro*, unter Zusatz von Nährstoffen, schnell auf Apfelblättern etablieren und verstärkten den Blattabbau um bis zu 54%.

Die „angedauten“ Blätter wurden von Regenwürmern verstärkt gefressen (s. 7.4.1. - 7.4.3.; 7.5.1 - 7.5.2). In Weinsberg konnte eine Zunahme der Blatteinzugsstellen und

eine erhöhte Blattabbaurate infolge der Nährmedienapplikation verzeichnet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass Apfelblätter von Regenwürmern selektiv gefressen werden und das die Auswahl der Blätter von ihrer chemischen Zusammensetzung und dem Zersetzungsgrad abhängt (Mangold, 1951; 1953; Wittich, 1953). Frisches Falllaub wird von den Regenwürmern „verschmäht“. Das „Andauen“ der Blätter, die kleinere Partikelgröße und der biologische Abbau nicht-schmackhafter Substanzen, z.B. Phenole, durch die Aktivität der Mikroorganismen erhöhen die Attraktivität des Falllaubs für Regenwürmer und haben einen signifikanten höheren Blattabbau zur Folge (Satchell, 1967; Wright, 1972; Cook & Burchill, 1973; Helling & Larink, 1998; Lowe & Butt, 2003; Holb et al., 2006).

Die Weiterentwicklung des LEIBER Hefepräparates in den vier Versuchsjahren korrelierte mit der Förderung des Blattabbaus in den Schalen und mit der Förderung der Regenwurmaktivität. Im Jahr 2011 waren in Weinsberg zu Beginn der ersten Mills-Periode im Depot der Kontrolle noch 37% des Falllaubs vorhanden, von den mit Hefeextrakt LEIBER 1,1% behandelten Blätter nur noch 23% (Kollar et al., 2013). Im Jahr 2012 verblieben 8% der mit Hefeextrakt LEIBER 6% behandelten Blätter in den Gittern. In den Jahren 2013 und 2014 war die Attraktivität der Blätter für die Würmer so gesteigert, dass nur noch die Blattstiele vorhanden waren, die im folgenden Monat ebenfalls gefressen wurden. Die Ergebnisse bestätigen die Versuche von Kollar & Pfeiffer (2005), die ebenfalls eine verstärkte Blattabbaurate durch Regenwürmer infolge einer Hefebehandlung nachweisen konnten. Die Abbaugeschwindigkeit der Blätter war entscheidend abhängig von der Bodentemperatur. Im warmen Winter 2012/13, bei Bodentemperaturen von  $\geq 5^{\circ}\text{C}$  ab dem 21.12.12, waren bereits Ende Januar beträchtliche Mengen an Falllaub abgebaut. Bei Bodenfrost im Jan./Feb. 2012 stagnierte der Blattabbau, da die Aktivität der Regenwürmer bei Bodentemperaturen unter  $2^{\circ}\text{C}$  zum Erliegen kommt (Raw, 1962).

In mehreren Studien wurde belegt, dass Regenwürmer sich aktiv in Richtung einer geeigneten Nahrungsquelle orientieren und bewegen können (Satchell, 1967; Doube et al., 1997; Neilson & Boag, 2003; Curry & Schmidt, 2007). Der Ursprung der Regenwurmpräferenz sind volatile Substanzen, die von Pilzen und anderen Mikroorganismen im Boden abgegeben werden (Zirbes et al., 2011) und mittels Chemorezeptoren im Prostomium und bukkal Epithel detektiert werden (Laverack, 1960; Edwards & Bohlen, 1996). Mikroorganismen, insbesondere Pilze, stellen eine wichtige Nahrungsquelle der Würmer dar (Pierce, 1978; Edwards & Fletcher, 1988; Brown, 1995). Schnell wachsende saprophytische Pionierorganismen werden gegenüber späteren Lignin-abbauenden Pilzen bevorzugt von *L. terrestris* gefressen (Moody et al., 1995; Bonkowski et al., 2000). Die hohe Pilzpopulation der Primärbesiedler im Winter führte vermutlich zu einer verstärkten Abgabe volatiler Stoffe und einer gesteigerten Attraktivität des behandelten Falllaubs. Die Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass die Regenwurmaktivität bei geeigneten Witterungsbedingungen bereits kurze Zeit nach der Falllaubexposition/-behandlung anstieg. Im Jahr 2012 konnte bereits drei Wochen nach einer Hefeextrakt LEIBER 6% und einer TSB 9% Behandlung des Falllaubs ein um 20-25% gesteigerter Blattabbau

durch die Regenwürmer verzeichnet werden. Die Präferenz für die mit Nährmedien behandelten Blätter könnte auch auf die Inhaltsstoffe der Nährmedien zurückzuführen sein. Das verwendete Hefeextrakt enthält Riboflavin, welches von den Würmern nicht selbst synthetisiert werden kann (Fischer & Bacher, 2006) und von essentieller Bedeutung für das Immunsystem ist. Mazur et al. (2011) konnten in ihren Studien belegen, dass Riboflavin ein wichtiger chemischer Lockstoff für die Coelomocyten der Würmer ist und das Potenzial hat, die Bewegung dieser Zellen zu beeinflussen. Für Blätter, die mit einem Vitamin-Mix behandelt wurden, konnte zu Beginn der Primärsaison 2012 und 2013 eine erhöhte Blattabbaurate nachgewiesen werden (s. 7.4.2.; 7.4.3.; 7.5.2.). Vermutlich sind neben den Vitaminen auch andere Stoffe für die gesteigerte Attraktivität des behandelten Falllaub verantwortlich. Olfaktometerversuche mit den einzelnen Wirkstoffen des Hefeextraktes könnten dazu beitragen, die volatilen Substanzen zu identifizieren, die für die Präferenz der Würmer verantwortlich sind.

Die Saponinextrakte zeigten keinen positiven Effekt auf das Wachstum und die Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft, da die Präparate eine fungizide und bakterizide Wirkung aufweisen (Zhang et al., 2005; de Leo et al., 2006; Coleman et al., 2010). Eine Steigerung der mikrobiellen Abbauprozesse im Falllaub konnte folglich nicht beobachtet werden. Ebenso konnte kein Einfluss der Saponinapplikation auf die Aktivität der Regenwürmer aufgezeigt werden (Kollar et al., 2013). Regenwürmer sind in der Lage, zwischen Alkaloiden, Zuckern und Säuren zu unterscheiden (Mangold, 1951; 1953). Bitter schmeckende Alkaloide der Lupine (Lupinin) (Hagen, 1885) hemmen die Fraßleistung der Regenwürmer (Mangold, 1951). Der „Bitterstoff“ Saponin (Watzl, 2001) könnte folglich als eine Ursache für den verminderten Blattabbau durch die Regenwürmer angesehen werden.

Die Wirkung der Nährmedien und Saponinpräparate war in allen Versuchsjahren standortunabhängig. In Weinsberg konnten vergleichbare Wirkungsgrade auf das Ascosporenpotenzial nachgewiesen werden (s. 7.3.1. - 7.3.3.; Kollar et al., 2013). Die Reduktion der Ascosporenmenge war mit einem verstärkten Blattabbau und einer erhöhten Fraßleistung der Regenwürmer korreliert. Die Synergie dieser Wirkungen ist als sehr hoch und entscheidend für die erfolgreiche Bekämpfung der Überwinterungsform von *V. inaequalis* einzuschätzen. Die Behandlung der abgefallenen Blätter mit speziellen Nährmedien zur „Aktivierung“ der natürlichen mikrobiellen Zersetzung durch Mikroorganismen und Regenwürmer könnte als neue phytosanitäre Strategie in der obstbaulichen Praxis etabliert werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens müsste das Laub nicht aus der Anlage entfernt werden. Die Applikation der Nährmedien könnte beispielsweise in Kombination mit dem Mulchen erfolgen und im Sprühverfahren ausgeführt werden. Eine zweimalige Behandlung im Herbst/Winter mit einem Hefeextrakt LEIBER 30% sollte die Reifung der Pseudothecien fast vollständig inhibieren. Die Behandlungen wären auch für Betriebe mit kleineren Strukturen geeignet, in denen kostenaufwändige Laubsauger nicht sinnvoll eingesetzt werden können. Mittel- bis langfristig könnte die Etablierung einer Falllaubbehandlung im Herbst/Winter zu einer höheren Produktivität des

ökologischen Obstbaus führen. Die wirtschaftliche Bedeutung einer Falllaubbehandlung zur Verminderung der Ascosporenmenge im Frühjahr ist aufgrund einer zukünftigen Nichtverfügbarkeit von Kupfer (Richtlinie 2009/27EG) als hoch einzuschätzen. Die Wirksamkeit schwächerer Fungizide könnte durch ein vermindertes Ascosporenpotenzial verbessert werden. Weitere Falllaubversuche hinsichtlich Behandlungszeitpunkt, -häufigkeit und -konzentration sollten dazu beitragen, die Methode und das Hefeextrakt LEIBER zu optimieren und für die Praxis zugänglich zu machen.

### 4.3. Analyse der Epiphytengemeinschaft

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Zusammensetzung der Mikrobengemeinschaft im Falllaub von Apfelbäumen erfasst. Die Mikroorganismen wurden etwa 2-4 Monate nach dem Blattfall von den Blättern isoliert. Der Isolierungszeitpunkt hat einen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft. Je nach Witterung und Zeitpunkt des Blattfalls kann der Blattabbau unterschiedlich weit vorangeschritten sein. Jedes Blattabbau stadium weist eine unterschiedliche taxonomische Zusammensetzung auf (Purahong et al., 2010). Die meisten Arten sind nur kurze Zeit im Falllaub dominant/präsent (Voříšková & Baldrian, 2013) und werden von anderen Arten abgelöst/verdrängt. Die isolierten Mikroorganismen können daher nur als „Momentaufnahme“ der Gemeinschaft betrachtet werden und stellen einen Ausschnitt der Artenvielfalt im Verlauf der Falllaubsukzession dar.

Auf TSA und PDA konnten bis zu 23 Gattungen/Arten der Bakterien, 5 Hefearten und 7 mycelbildende Pilze von schorfbefallenem Falllaub isoliert werden. Die Artenzahl der Bakterien auf dem Falllaub war vergleichbar mit der für die Apfelphyllosphäre beschriebenen. Yashiro et al. (2011) und He et al. (2012) konnten aus der Phyllosphäre des Apfels 23-34 Bakterienarten auf TSA oder King's B-Medium isolieren und kultivieren. Für Hefen und mycelbildende Pilze wurde in der Apfelphyllosphäre eine größere Biodiversität der Mikroorganismen nachgewiesen. Fiss et al. (2003) isolierten 22 Hefearten von verschiedenen Apfelsorten (*Malus domestica*). Es wurde ein malz- und hefehaltiges Komplexmedium (HA) und eine Inkubationstemperatur von 27°C gewählt. Die Bedingungen könnten dazu beigetragen haben, dass ausschließlich thermophile Arten angereichert wurden, die nicht das natürliche Artenspektrum der Hefen in der Phyllosphäre repräsentieren. He et al. (2012) isolierten durch einminütiges Schütteln von Apfelblättern der Sorte 'Fuji' in Wasser 32 verschiedene Pilzarten auf PDA. Die verschiedenen Kultivierungstechniken in den einzelnen Studien könnten die quantitativen Unterschiede in der taxonomischen Diversität bedingt haben.

Die insgesamt geringe Biodiversität der isolierten Arten und Gattungen könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass nicht alle Organismen mit den verwendeten Methoden oder Kulturmedien erfasst wurden. Yashiro et al. (2011) konnten mit einer DAPI-Färbung 100-1000 mal mehr Bakterien in ihren Proben aus der Apfelphyllosphäre nachweisen als durch die Kultivierung auf TSA (CFUs). Von den

mit DAPI gefärbten Bakterien wurden durch die Sequenzierung der 16S-rRNA 85% als kultivierbare Arten identifiziert. He et al. (2012) wiesen durch die Isolierung und Kultivierung auf Agar (PDA, King's B-Medium) die gleichen relevanten Pilz- und Bakterienarten in der Apfelphyllosphäre nach wie über die Sequenzierung der 16S-rDNA und rDNA-ITS. Auf den in dieser Arbeit verwendeten Medien TSA und PDA sollten demnach nahezu alle Bakterien- und Pilzarten aus dem Falllaub kultivierbar gewesen sein. Das unterschiedliche Wachstumsverhalten auf Komplexmedien kann jedoch dazu beitragen, dass schnell wachsende Arten, langsam wachsende Mikroben überwachsen und/oder die Nährstoffverfügbarkeit für diese reduzieren. Ebenso können „Hemmstoffe“ gebildet werden bzw. schon im Extrakt aus den Blättern vorliegen, die sich auch bei hohen Verdünnungen des Inokulums auf die Bestimmung der CFUs auswirken. Ein direkter Nachweis mangelnder Isolierbarkeit aus dem Blattmaterial im Sinne eines „internen Standards“ bestand darin, dass zeitgleich zu einigen Probenahmen für die CFU-Bestimmungen mit der Wasserbadmethode ein Ascosporenpotenzial nachgewiesen wurde. Das Vorhandensein von etwa 800 Ascosporen in der Probe (Kontrolle, 06.04.2012) bewirkte keine Detektion von Schorfkolonien, obwohl die Kultur auf PDA gefolgt von einer Inkubation bei 20°C hierfür optimal war. He et al. (2012) konnten *V. inaequalis* von schorfbefallenen Apfelblättern der Sorte 'Fuji' ebenfalls nicht auf PDA isolieren. Über die Sequenzierung der rDNA-ITS konnte jedoch ein Anteil des Pathogens von 3% an der Population der Pilze in der Apfelphyllosphäre nachgewiesen werden.

In den Falllaubdepots waren die Mikroben wechselnden abiotischen Faktoren ausgesetzt. Veränderte Wachstumsbedingungen, wie z.B. Temperatur- und Feuchtewechsel, veränderte pH-Werte oder die Abnahme von Nährstoffen, können dazu führen, dass Bakterien in einen lebenden, aber nicht kultivierbaren Zustand, das sogenannte VBNC-Stadium (viable but not culturable) übergehen, um die ungünstigen Bedingungen zu überdauern. In diesem „Ruhestadium“ weisen die Zellen eine niedrige Stoffwechselaktivität auf. Sie verlieren ihre Anzüchtbarkeit auf den üblichen mikrobiologischen Medien, auf denen sie normalerweise wachsen (Oliver, 2005). Die Bakterien bleiben vital und in der Lage, bei günstigeren Bedingungen zum metabolisch aktiven Status zurückzukehren (Gauthier, 2000; Wong & Wang, 2004). Die meisten Bakterien, für die VBCN-Stadien beschrieben sind, gehören zu den Gram<sup>-</sup>. Insbesondere  $\gamma$ -Proteobakterien, wie Pseudomonaden, können in dieses Stadium übergehen (Gauthier, 2000; Oliver, 2005). Für Gram<sup>+</sup> Bakterien wurde das VBNC-Stadium unter anderem für Actinomyceten beschrieben (Mukesh et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden die Mikroorganismen im Winter von den Blättern isoliert. Der Übergang in das VBNC-Stadium könnte durch Stressfaktoren, wie die niedrigere Temperatur zum Zeitpunkt der Isolierung, die Konkurrenz um Nährstoffe und die möglicherweise durch Antagonisten freigesetzten Antibiotika verstärkt initiiert worden sein, so dass einige Arten nicht auf TSA und dem Actinomycetenagar kultivierbar waren.

Ein Teil der Bakterienisolate vom Falllaub konnte mit MALDI-TOF nicht identifiziert werden, da keine Übereinstimmung mit den Spektren in der Datenbank vorlag. Bei

den Pilzisolaten gelang der Zellaufschluss nicht für alle Isolate, so dass die Signalstärke zu niedrig für die Aufzeichnung der Proteinspektren war. In zukünftigen Analysen könnten kulturunabhängige Methoden, wie die FISH-Technik (fluoreszente In-situ-Hybridisierung) oder die DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) mit einbezogen werden um ein größeres Spektrum der Mikroorganismen zu erfassen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen erwies sich die Methode der Isolierung und Kultivierung von Mikroorganismen jedoch als geeignet, da es das primäre Ziel war, mögliche qualitative und quantitative Veränderungen der Mikrobengemeinschaft infolge der Falllaubbehandlung exemplarisch aufzuzeigen und potenzielle Antagonisten des Apfelschorferregers zu identifizieren.

Die vom Falllaub isolierten Bakterien konnten in die Klasse der  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Proteobakterien, Actinobacteria, Bacteroidia und Bacilli eingeordnet werden. In der Apfelphyllosphäre stellen die  $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Proteobakterien ebenfalls wichtige Vertreter der Bakteriengemeinschaft dar (Ottesen et al., 2009; Yashiro et al., 2011). Wie auf dem Falllaub, ist auch das Vorkommen von Actinobacteria und Bacteroidia beschrieben (Yashiro et al., 2011). Die Sphingomonadales ( $\alpha$ -Proteobakterien) sind mit etwa 42% die dominanten Bakterien in der Apfelphyllosphäre (Yashiro et al., 2011). Vom Falllaub konnten keine Vertreter dieser Bakterienordnung isoliert werden. Die abiotischen und/oder biotischen Bedingungen entsprachen vermutlich nicht den Lebensansprüchen dieser Mikroorganismen, so dass sie sich nicht im Falllaub etablieren konnten. Die Pseudomonadales ( $\gamma$ -Proteobakterien), die in der Apfelphyllosphäre nach den Sphingomonadales, Actinobacteriales und Rhizobiales die wichtigste Gruppe stellen, konnten im Falllaub als dominante Bakterienordnung identifiziert werden. Die Bakterien wachsen chemoorganotroph bei neutralem pH-Wert und Temperaturen im mesophilen Bereich (ca. 8-48°C) (Madigan & Martinko, 2006). Im Falllaub lagen gute Bedingungen für das Wachstum der Pseudomonaden vor. Sie konnten von den unbehandelten Blättern der Kontrolle und von allen behandelten Falllaubdepots isoliert werden. Die zugeführten Nährstoffe in Form von Autolysaten der Hefe und Säurehydrolyse Produkten/Tryptonen von Casein zeigten das Potenzial, das Wachstum der Pseudomonaden zu fördern. Die gute Wirkung der Nährmedien könnte darauf zurückzuführen sein, dass Pseudomonaden ein weites Spektrum an organischen Verbindungen nutzen können. Einige Arten verwerten mehr als hundert unterschiedliche organische Verbindungen (Madigan & Martinko, 2006).

Die Diversität innerhalb der Gattung war groß. In den Versuchsjahren 2010-2012 konnten 11 bis 13 Pseudomonasarten identifiziert werden. Schnabel & Jones (1999) konnten 18 Arten, von denen 52% als fluoreszierende Pseudomonaden identifiziert wurden, aus der Phyllosphäre des Apfels isolieren. Im Falllaub konnte bei etwa 15-16% der *Pseudomonas*-Isolate fluoreszierende Eigenschaften nachgewiesen werden. Insbesondere für fluoreszierende Pseudomonaden ist die Produktion und Freisetzung einer Vielzahl an Antibiotika und Antimykotika beschrieben (Leisinger & Margraff, 1979; Boruah & Kumar, 2002; Upadhyay & Srivastava, 2008; Yang et al., 2011). Die Synthese dieser Sekundärmetabolite führte möglicherweise dazu, dass

die Pseudomonaden aus der Apfelphyllosphäre sich auch im Falllaub gut etablieren konnten und andere Mikroorganismen durch Antibiose verdrängt wurden. Die Dominanz der Pseudomonaden könnte auch auf Nährstoffkonkurrenz zurückzuführen sein. Pseudomonaden können Siderophore, Oligopeptide die Fe(III)-Ionen in Form von Chelat-Komplexen selektiv und mit hoher Affinität binden, freisetzen (Neilands, 1979). Die Fe (III)-Ionen werden in die Zelle transportiert. Da Eisen in der Natur wenig bioverfügbar ist, stellt die Freisetzung von Siderophoren einen Konkurrenzvorteil gegenüber anderen Mikroorganismen dar.

Actinobacteria, oft auch als Actinomyceten bezeichnet, hatten einen Anteil von bis zu 12% an den Bakterienisolaten des Falllaubs. Neben den  $\gamma$ -Proteobakterien stellten sie die dominante Bakterienklasse dar. In der Apfelphyllosphäre repräsentieren die Actinomyceten mit einem Anteil von etwa 34% die zweitwichtigste Gruppe der Bakteriengemeinschaft (Yashiro et al., 2011). Als dominante Gattung wurden, wie im Falllaub, die Curtobakterien identifiziert (Yashiro et al., 2011). Actinomyceten gelten als wichtige Destruenten und haben einen entscheidenden Anteil am Abbau organischer Materialien, wie Cellulose, Lignocellulose und Pektin (Crawford, 1978; Munk, 2008). Das Falllaub stellt daher ein geeignetes Substrat für die saprophytischen Bakterien dar.

Die Diversität der Actinomyceten und ihr Anteil an der Mikrobengemeinschaft war geringer als erwartet. Das Ergebnis könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Abbau der Blätter zum Zeitpunkt der Isolierung (08.03.2011; 23.02.2012) noch nicht weit fortgeschritten war. Actinomyceten besiedeln frische Substrate langsamer als Pilze und andere Bakterien. Ihr Anteil steigt erst im Verlauf der Falllaubsukzession an, u.a. durch ihre Fähigkeit, die pilzliche Biomasse und Lignin abzubauen (Kirby, 2006). Snajdar et al. (2011) konnten im Falllaub von *Quercus petraea* 4 Monate nach dem Laubfall die ersten Actinomyceten nachweisen. Die maximale Populationsdichte wurde erst nach etwa 2 Jahren erreicht. Eine Förderung der Actinomyceten konnte 2011/12 durch eine TSB 9%, Pepton Soja 6%, Casaminoacids 6% oder eine Vitamin-Mix Behandlung des Falllaubs nachgewiesen werden. Von diesen Blattdepots konnten 10-20% mehr Actinomyceten isoliert werden. Die bessere Verfügbarkeit der Nährstoffe förderte vermutlich das Wachstum der Mikroben. Diese könnten zum verstärkten Blattabbau beigetragen haben.

Die Enterobacteriaceae ( $\gamma$ -Proteobakterien) *P. agglomerans*, *E. billingiae*, *S. liquefaciens* und *E. americana* stellten zusammen 5-21% der Bakterienisolate vom Falllaub dar. Enterobacteriaceae sind ubiquitär verbreitet und besitzen relativ einfache Nährstoffansprüche (Madigan & Martinko, 2006). Durch die Freisetzung extrazellulärer Enzyme, wie Pektinasen, Cellulasen, Hemicellulasen, Proteasen und Lipasen, können sie die pflanzliche Biomasse abbauen (Munk, 2008). Die saprophytischen Bakterien gewinnen erst im späteren Verlauf der Falllaubsukzession an Bedeutung (Kinkel, 1989). Ihr Anteil an der Mikrobengemeinschaft wäre zu einem späteren Zeitpunkt in der Vegetationsperiode wahrscheinlich höher gewesen. Eine Förderung der Enterobacteriaceae durch die Applikation von Nährmedien konnte

nicht beobachtet werden, so dass diese Mikroorganismen vermutlich nicht oder nur in geringem Umfang zum verstärkten Blattabbau beigetragen haben.

Die Gemeinschaft der Falllaubdestruente wurde an den Standorten Dossenheim und Weinsberg vergleichend untersucht. An den beiden Standorten konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Zusammensetzung der natürlichen mikrobiellen Gemeinschaft festgestellt werden. Dies bestätigt die wissenschaftliche Hypothese, dass die Zusammensetzung des Aeroplanktons weltweit sehr gleichmäßig sein kann. Die Selektion des Aeroplanktons erfolgt durch die Bedingungen auf der Phyllosphäre, die über die Vegetationsperiode betrachtet weitgehend standortunabhängig sein sollten. Standortübergreifende Aussagen können auch deshalb gemacht werden, weil die klimatischen Bedingungen für den Apfelanbau einen gewissen Rahmen erfüllen müssen. Es wird daher von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Dossenheim und Weinsberg auf andere Standorte mit gemäßigttem Klima ausgegangen. Die hinsichtlich des Ascosporenpotenzials gleichartig wirkenden mikrobienfördernden Nährmedien an den beiden Standorten bestätigen diese Schlussfolgerung.

Vom Falllaub konnten 7 mycelbildende Pilzgattungen isoliert werden. Die Isolate konnten in die Abteilung der Ascomyceten eingeordnet werden, die im Falllaub zu den wichtigsten Primärbesiedlern gehören (Voříšková & Baldrian, 2013). *C. cladosporioides* und *E. nigrum*, zwei kosmopolische, saprophytische Pilze, konnten von allen Blattdepots isoliert und als dominante Arten identifiziert werden. Die saprophytischen Gattungen *Davidiella* sp. und *Phoma* sp. stellten zusammen 9% der Isolate dar (2011/12). Alle vier Gattungen/Arten können durch die Freisetzung von Cellulasen und Hemicellulasen ein großes Spektrum an organischen Verbindungen als C-Quelle nutzen (Urbanek et al., 1978; Valenzuela et al., 2001; Chiranjeevi et al., 2012). Die Behandlung mit Nährmedien, insbesondere TSB 9%, förderte die Populationen dieser Pilze auf dem Falllaub. Die saprophytischen Pilze haben vermutlich zum verstärkten Abbau der Blätter beigetragen. In Studien von Tshomo et al. (2003) konnte durch das Ausbringen von *Phoma* sp. auf sterilisiertem Apfelfalllaub *in vitro*, bei einer Temperatur von 10°C, innerhalb von neun Wochen ein um 39% schnellerer Abbau der Blätter beobachtet werden.

Einzellige Hefen stellten 19% der pilzlichen Isolate vom Falllaub dar. Die gute Etablierung der Hefen ist wahrscheinlich auf ihre geringen Lebensansprüche zurückzuführen. Sie sind tolerant gegenüber extremen Umweltbedingungen (Trockenheit, Frost, Feuchtigkeit), wie sie im Falllaub vorherrschen. Weiterhin sind sie an hohe Zuckerkonzentrationen und wechselnde pH-Werte angepasst (Janisiewicz, 1991). Diese Anpassungsmechanismen erlauben eine schnelle Besiedlung und Vermehrung der Hefen in neuen Habitaten.

In der Phyllosphäre des Apfels gehört *A. pullulans* zu den Erstbesiedlern und stellt eine der dominanten Arten dar (Pennycook & Newhook, 1981; Kinkel et al., 1989; He et al., 2012). Im Falllaub konnten 11% der Isolate als *A. pullulans* identifiziert werden.

Der Pilz aus der Gruppe der „Schimmelpilze“ kann ein Pseudomycel ausbilden und durch die Freisetzung von Cellulasen und Hemicellulasen die pflanzliche Biomasse abbauen (Ribero, 2007). Auf TSB 9%, Hefeextrakt LEIBER 6%, Saponin und dem mit einem Vitamin-Mix behandelten Falllaubdepot war die Population von *A. pullulans*, vermutlich durch die bessere Verfügbarkeit von Nährstoffen, leicht gefördert und könnte zu einem verstärkten Blattabbau beigetragen haben. Das Auftreten von einzelligen Hefen konnte in den mit Hefeextrakt LEIBER 6%, Saponin und dem mit einem Vitamin-Mix behandelten Blattdepot nachgewiesen werden. Die Anzahl der isolierten Arten war in dem Vitamin-Mix behandeltem Falllaubdepot am höchsten. In den Falllaubdepots die mit Hefeextrakt LEIBER 6% behandelt wurden, stellten die Hefen etwa 30% der Gemeinschaft dar. Wickerham & Burton (1948) konnten zeigen, dass ein Zusatz von reinen Vitaminen zu einem synthetischen Medium das Wachstum von Hefen ermöglicht, die auf den üblichen Kohlenstoffquellen nicht wachsen können. Bouthilet et al. (1949) konnten zudem nachweisen, dass autolytierte Hefen von den einzelligen Pilzen fermentiert werden können. Diese Untersuchungen führen zu der Schlussfolgerung, dass Hefeextrakte oder andere Vitaminquellen das Wachstum von Hefen unterstützen (Wickerham & Burton, 1948) und die taxonomische Diversität dieser Mikroorganismen fördern können.

Die Analyse der pilzlichen Blattbewohner zeigt, dass es durch die Behandlung mit Nährmedien nicht zu einer Verschiebung des Artgefüges kam. In den mit TSB 9% und Hefeextrakt LEIBER 6% behandelten Falllaubdepots konnten annähernd die gleichen Arten und Gattungen wie im unbehandelten Apfelfalllaub nachgewiesen werden. Die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft könnte die Attraktivität des Falllaubs für Regenwürmer und deren Fraßleistung beeinflusst haben. Wright (1972) konnte eine Präferenz von *L. terrestris* für mit *P. aeruginosa* inokulierte Apfelblätter nachweisen. Die qualitative und quantitative Dominanz der Pseudomonaden im Falllaub könnte zu einer Attraktivitätssteigerung der behandelten Blätter für die Würmer geführt haben. Demgegenüber steht die Beobachtung von Cooke & Luxton (1980), dass mit *P. fluorescens* inokulierte Filterpapierscheiben von *L. terrestris* nicht bevorzugt werden. In Laborversuchen führte die Ernährung von *Eisenia foetida* (Lumbricidae) mit Reinkulturen von verschiedenen Bakterien (*Pseudomonas* sp., *Citrobacter freundii*) und Actinomyceten (*Flavobacterium* sp.) zum Gewichtsverlust oder Tod aller Tiere. Die Aufzucht der Würmer mit verschiedenen Pilzkulturen war möglich (Edwards & Fletcher, 1988). Die Förderung der Fadenpilze und Hefen könnte demzufolge für die Attraktivitätssteigerung des behandelten Falllaubs verantwortlich sein.

#### 4.4. Identifizierung potenzieller Antagonisten

Für *S. rhizophila* und *S. silvestris* konnte eine hemmende Wirkung auf das Mycelwachstum von *V. inaequalis* nachgewiesen werden. Es liegen bisher keine vergleichbaren Untersuchungen zu einer schorfhemmenden Wirkung dieser Mikroorganismen vor. Die fungizide Wirkung von *Pseudomonas* spp., *Bacillus* sp. und *Burkholderia* sp. auf das Mycelwachstum, die Konidienkeimung und die

Entwicklung der Pseudothecien von *V. inaequalis* wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Wassermann, 1969; Kucheryava et al., 1999; Meszka & Bielenin, 2006; Hossain et al., 2009). Die Bakterien können eine Vielzahl an Antimykotika synthetisieren, wie z.B. Substanzen aus der Gruppe der Phenazine, Pyrrolnitrin, Pyoluteorin, 2,4-Diacetyl-phloroglucinol (DAPG) oder Oomycin A (Leisinger & Markgraff, 1979; Lignon et al., 2000). Diese Stoffe weisen ein weites Wirkungsspektrum auf. Pyrrolnitrin, produziert von Pseudomonaden und Burkholderia-Arten, kann eine fungizide Wirkung auf Basidiomyceten, Deuteromyceten, Ascomyceten (Ligon et al., 2000) und einige Gram<sup>+</sup> Bakterien (Raaijmakers et al., 2002) haben. DAPG, welches von *P. fluorescens* synthetisiert wird, weist eine antibakterielle Wirkung und eine hohe Aktivität gegen eine Vielzahl phytopathogener Pilze auf (Keel et al., 1992; Tomashow & Weller, 1996). Einige *Bacilli*-Arten können toxische Metabolite freisetzen, wie Zwittermycin A und Aminoglycoside, welche eine fungistatische Wirkung aufweisen (Silo-Suh et al., 1994). *Stenotrophomonas* sp. synthetisiert die fungizid wirkende Substanz Xanthobaccin A (Nakayama et al., 1999). Die Freisetzung von bakteriziden und/oder fungiziden Sekundärmetaboliten und Enzymen ist ein entscheidender Konkurrenzvorteil für die Mikroorganismen bei der Besiedlung neuer Habitate. Das in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene antagonistische Potenzial der Pseudomonaden ist als besonders bedeutend einzuschätzen, da diese die dominante Gattung der Falllaubbesiedler darstellten. Durch die Applikation der Nährmedien (2010/11) konnte die Population um bis 20-40% gefördert werden. Die fungizide Wirkung der Stoffwechselprodukte von Pseudomonaden auf Ascomyceten könnte die Entwicklung der Pseudothecien von *V. inaequalis* beeinträchtigt und bei den mit Nährmedien behandelten Falllaubdepots zu der verminderten Ascosporenmenge geführt haben. Für fluoreszierende Pseudomonaden, wie sie im Falllaub vorkommen, wurde bereits eine hemmende Wirkung gegenüber *V. inaequalis* nachgewiesen. Diese ist auf die Bildung eines extrazellulären Proteins (Bk3) zurückzuführen, welches hydrolytische Enzymaktivität aufweist (Hossain et al., 2009).

Actinomyceten, die neben den Pseudomonaden die wichtigste Bakteriengruppe im Falllaub darstellen, gelten als wichtige Antibiotikabildner (Solecka et al., 2012). In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die freigesetzten Antibiotika auch bei Pilzen zur Bildung morphologischer Abnormalitäten, wie z.B. angeschwollener, unförmiger und stark verzweigter Hyphen führen und/oder die Keimung der Sporen beeinträchtigen können (Gunji et al., 1983; Getha & Vikineswary, 2002). Durch die Freisetzung von Antimykotika und Hyperparasitismus können Actinomyceten das Wachstum vieler saprophytischer Pilze hemmen (Jayasinghe & Parkinson, 2007). Aufgrund der *in vitro*-Tests war die antagonistische Wirkung der Actinomyceten des Falllaubs als gering einzuschätzen. Auf PDA konnten *C. michigans* und *C. flaccumfaciens* das Mycelwachstum von *V. inaequalis* nur in geringem Umfang beeinträchtigen. Kucheryava et al. (1999) konnten für *Curtobacterium* sp. aus der Phyllosphäre von *Malus domestica* im Dualkultur-Test eine ähnliche Wirkung nachweisen. Das Mycelwachstum von *V. inaequalis* war um

18-36% reduziert. *R. fascians* wurde in dieser Arbeit von TSB 9% und Pepton Soja 6% behandelten Falllaub isoliert und hemmte das Mycelwachstum von *V. inaequalis in vitro* um etwa 50%. Angesichts der geringen Nachweise (TSB, Soja) wäre eine antagonistische Wirkung nur in diesen beiden Varianten möglich.

Neben den Bakterien werden mycelbildende Pilze und Hefen zur biologischen Kontrolle phytopathogener Erreger verwendet (Punja & Utkhede, 2003; El-Tarabily & Sivasithamaram, 2006). Die Mechanismen des Antagonismus können sehr vielfältig sein. Pilze und Hefen können durch Mykoparasitismus die Entwicklung des Erregers beeinträchtigen (Benjagoub et al., 1998; Howell, 2003). Die Sekretion hydrolytischer Enzyme kann zur Zellyse führen (Saligkarias et al., 2002; Punja & Utkhede, 2003) und das Wachstum und die Infektionen durch pflanzenpathogene Pilze herabsetzen (Punja & Utkhede, 2003). Ein weiteres antagonistisches Wirkprinzip ist die Freisetzung von Antimykotika. Viele Pilze und Hefen können ein breites Spektrum an Antimykotika z.B. Gliotoxin, Glioverin, Hygromycin B und Cecropin A (Howell, 2003; Punja & Utkhede, 2003) synthetisieren. Als weiteres antagonistisches Wirkprinzip gilt die Konkurrenz um Nährstoffe und Platz zwischen dem Pathogen und den sich schnell vermehrenden Hefen und Pilzen (El-Tarabily & Sivasithamaram, 2006).

Die vom Falllaub isolierten Hefen bewirkten im Dualkulturtest eine starke Hemmung des Apfelschorfmycelwachstums, wobei Isolate von *C. capitatum* zu den stärksten Hemmeffekten führten (65%). In Flüssigkultur konnte für *C. capitatum* eine vollständige Hemmung des Mycelwachstums von *V. inaequalis* beobachtet werden. Die fungizide Wirkung von Hefen auf *V. inaequalis* wurde auch von Fiss et al. (2003) beschrieben. In Versuchen mit Hefeisolaten von Blättern und Früchten einer Apfelanlage im Alten Land konnte *in vitro* eine geringe Hemmwirkung nachgewiesen werden. Im Freiland zeigten Hefeisolaten von *Sporidiobolus* spp. mit einer Befallsreduktion um 81% eine gute Wirkung. Die Behandlung des Falllaubs mit dem LEIBER Hefeextrakt und dem Vitamin-Mix unterstützte das Wachstum der Hefen und damit vermutlich die Freisetzung von fungiziden Substanzen und/oder hydrolytischen Enzymen, die zu einer Reduktion des Ascosporenpotenzials beigetragen haben könnten. Die Hefen könnten den Schorf auskonkurriert und/oder überwachsen haben, wodurch die Entwicklung der Pseudothecien gestört wurde. Um Hefen gezielter vom Falllaub zu isolieren, könnte YPD (Yeast Extract Peptone), ein Komplexmedium für das Wachstum von Hefen, verwendet werden. Für ein Isolat von *Aureobasidium* sp., aus der Phyllosphäre des Apfels, wurde eine Hemmung des Mycelwachstums von *V. inaequalis* um mehr als 80% beobachtet (Fiss et al., 2000). In dieser Arbeit konnte *in vitro* eine Hemmung des Mycelwachstums durch *A. pullulans* um 57% und durch *P. pararoseus* um 47% nachgewiesen werden. Unter Freilandbedingungen reduzierte *P. pararoseus* die Ascosporenmenge des Erregers im Falllaub um 25%. Durch die Applikation von *A. pullulans* konnte kein Einfluss auf die Entwicklung der Pseudothecien festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden mit *C. cladosporioides*, *A. pullulans*, *Davidiella* sp. und *Phoma* sp. viele Vertreter der Schimmelpilze isoliert. Schimmelpilze gelten

ebenfalls als wichtige biologische Quelle für Antibiotika, wie z. B. Penicillin. *C. cladosporioides* und *E. nigrum* inhibierten das Wachstum des Erregers auf PDA zu 41-57%, in Flüssigkultur nahezu vollständig. In anderen Studien konnte teilweise eine bessere antagonistische Wirkung dieser Pilze nachgewiesen werden. Fiss et al. (2000) konnten für Isolate von *Aureobasidium* sp., *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp. und *Fusarium* sp. aus der Phyllosphäre des Apfels eine Hemmung des Mycelwachstums von *V. inaequalis* um mehr als 80% beobachten. Ouimet et al. (1997) für *Aureobasidium* sp. und *Phoma* sp. eine Inhibierung des Mycelwachstum um 81-86%. Die unterschiedliche antagonistische Wirkung der Pilze und Hefen in den Studien könnte auf die verschiedenen Kultivierungsbedingungen zurückzuführen sein. Die Produktion von Antibiotika ist abhängig von den Kulturbedingungen und kann zwischen verschiedenen Isolaten einer Art variieren (Brewer et al., 1968; Brewer et al., 1972; Cullen & Andrews, 1984).

Die mit den natürlichen Antagonisten inokulierten Falllaubdepots wiesen kein oder nur ein geringfügig reduziertes Ascosporenpotenzial auf. Das Ergebnis legt die Schlussfolgerung nahe, dass die starke Hemmung in den mit Nährmedien behandelten Falllaubdepots nicht auf diese einzelnen Mikroorganismen zurückzuführen ist. Vermutlich beruht die Wirkung der Medien auf der synergistischen Wirkung der gesamten, in ihrem Wachstum geförderten, mikrobiellen Gemeinschaft.

Bei vielen Hemmstoffen, die von Bakterien, Pilzen und Hefen freigesetzt werden, handelt es sich um volatile Substanzen. Bei Bakterien wurden volatile Hemmstoffe unter anderem für Vertreter der Gattung *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Serratia* und *Pseudomonas* (Kai et al., 2007), bei Hefen für *Candida maltosa* (Ando et al., 2012) und *A. pullulans* (Mari et al., 2012) und bei Pilzen für *Trichoderma* sp. (Crutcher et al., 2013) beschrieben. Für die potenziellen Antagonisten der vorliegenden Arbeit, die in den Dualkultur-Tests identifiziert wurden, konnte in keinem Fall nachgewiesen werden, dass es sich bei den Hemmstoffen um volatile Substanzen handelt. In allen Hemmtests entsprach das Mycelwachstum dem der Kontrolle.

Die „Düngung“ der Blätter mit Nährmedien förderte das Wachstum der Mikroorganismen in allen Versuchsjahren quantitativ. Wie hoch das antagonistische Potenzial der Mikrobengemeinschaft 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 und die Konkurrenz um Lebensraum und Nährstoffe als höher einzuschätzen ist. Zudem kann von den Ergebnissen der Hemmstofftests *in vitro* nicht auf das Hemmungspotenzial der Organismen im Freiland geschlossen werden, da u.a. die Produktion der Antimykotika von einer Reihe endogener und exogener Faktoren abhängig ist. Bei *Pseudomonas* sp. wird die Synthese fungizid wirkender Substanzen unter anderem

vom Zweikomponentensystem GacA/GacS (Gaffney et al., 1994), dem zell-dichte-abhängigen Signalmolekül Acyl-HSLs, welches am Quorum sensing beteiligt ist (Wood et al., 1997), und Sigmafaktoren (Sarniguet et al., 1995) moduliert. Exogene Faktoren, die die Produktion fungizider Substanzen steuern, sind die Temperatur, die verfügbaren Nährstoffquellen (Shanahan et al., 1992; Georgakopoulos et al., 1994) oder der pH-Wert (Ownley et al., 1992; Georgakopoulos et al., 1994). Ein leicht saurer pH-Wert unter 7 kann bereits zu einer Reduktion der Phenazin-Produktion bei *P. aureofaciens* führen (Georgakopoulos et al., 1994). Ein weiterer wichtiger exogener Faktor ist das UV-Licht. Antimykotika sind häufig wenig stabil, wenn sie dem Sonnenlicht ausgesetzt sind (Umio et al., 1987). Durch die Aktivität von Bakterien, Oxidation oder Reduktion (Hermann et al., 1964; Brewer & Taylor, 1967) können sie inaktiviert werden. Auch das Verteilungsverhalten der Hemmstoffe im Falllaub kann gegenüber dem von Hemmstoffen auf Agarplatten stark verändert sein und somit zu einer verstärkten/abgeschwächten Wirkung auf den Erreger führen. Um das antagonistische Potenzial der Epiphytengemeinschaft besser abschätzen zu können, sollte in künftigen Analysen neben der Freisetzung von Hemmstoffen auch die Aktivität extrazellulärer Enzyme im Falllaub, wie z.B. Chitinasen, untersucht werden. Die Enzymaktivität von Chitinasen könnte in einem photometrischen Enzymtest gemessen werden, bei dem die durch Spaltung des Chitins freigesetzten N-Acetyl-Glucosamin-Einheiten mit Ka-Ferricyanid nachgewiesen werden (Hoster, 2003). Neben der Isolierung und Kultivierung von Bakterien und Pilzen aus dem Falllaub könnten weitere potenzielle Antagonisten über ihre spezifischen Gene für die Antimykotika Produktion detektiert werden. Die Gene für die Biosynthese und Regulation von Zwittermycin A (*Bacillus cereus*), DAPG, Phenazine, Pyrrolnitrin, Pyoluteorin (*Pseudomonas* spp.), Hygromycin B (*Trichoderma harzianum*) und Cecropin A (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden bereits partiell bzw. vollständig sequenziert (Jones & Prusky, 2002; Raaijmakers et al., 2002; Thrane et al., 1995). Die Verfügbarkeit spezifischer Primer für die hochkonservierten Gene eröffnet eine weitere Möglichkeit, Antimykotika-produzierende Bakterien und Pilze im Falllaub zu detektieren und zu isolieren. Ebenso besteht die Möglichkeit, durch genetische Modifikationen die Aktivität/Produktion der Antimykotika zu verbessern. Ligon et al. (2000) konnten die Pyrrolnitrin-Synthese von *P. fluorescens* durch die Klonierung und Integration eines *E.coli* Promotors ( $P_{tac}$ ) um das Vierfache steigern. Durch die „Überproduktion“ an Antimykotika könnten genetisch veränderte Antagonisten phytopathogener Pilze in Zukunft zu besseren Ergebnissen bei der biologischen Kontrolle führen. Im ökologischen Obstbau wäre ein Einsatz genetisch veränderter Mikroorganismen jedoch nicht möglich.

#### 4.5. Präparatanalyse

Saccharide und Zuckeralkohole stellten bei den Nährmedien, die eine Förderung der Falllaubbesiedler und einen damit verbundenen stärkeren biologischen Abbau der Blätter bewirkten, einen Anteil von 12-46% am Gesamtpräparat dar. Bei den Casaminoacids 6%, die die Ascosporenmenge um  $\geq 80\%$  herabsetzen konnten, hatten Saccharide und Zuckeralkohole einen Anteil von 0,6% am Gesamtpräparat.

Es ist daher davon auszugehen, dass diese Fraktion der Nährmedien nicht zu einer wesentlichen Förderung der Mikroorganismen beigetragen hat. Ein weiterer Hinweis sind die OXI-Top-Werte der mit TSB 9% + Saccharose 6% bzw. konzentriertem LEIBER Hefeextrakt + Saccharose 6% behandelten Blättern. Diese waren, mit Ausnahme vom 02.04.2013, im Vergleich zu den Nährmedienvarianten ohne Saccharose-Zusatz nicht oder nicht wesentlich erhöht.

Da es sich bei den Nährmedien um Abbauprodukte von Casein/Soja und Autolysate von Bierhefen handelt, wurde 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 3-5 kDa hatten einen Anteil  $< 0,05\%$  an der Zusammensetzung der Nährmedien und können als nicht wesentlich wirksame Stoffe angesehen werden.

Freie Aminosäuren und Peptide  $< 3$  kDa konnten als wichtigste Stoffgruppen identifiziert werden und wiesen einen Anteil von mehr als 75% am Gesamtpräparat auf. Vermutlich sind diese Werte 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. Die Aminosäurekonzentrationen, die mit der HPLC bestimmt wurden, wiesen eine hohe Genauigkeit auf. Die verwendete Quantifizierungsmethode der Zwei-Punkt-Kalibrierung ergibt in der Regel einen Fehler von maximal 1-2 %. Bei Analysen ohne vollständige Basislinientrennungen der Komponenten können höhere Ungenauigkeiten in Betracht gezogen werden.

Bei den hochwirksamen Casaminoacids stellten die Aminosäuren 87% und die Peptide 12% der Inhaltsstoffe dar. Eine alleinige Wirkung der Aminosäuren kann jedoch ausgeschlossen werden, da mit einer Aminosäurebehandlung des Falllaubs nur eine unzureichende Verminderung der Ascosporenmenge bewirkt werden konnte. Die Wirkung der Peptide, die in allen anderen Nährmedien die dominante Stoffgruppe stellen, ist folglich als ebenso bedeutend einzuschätzen. Es wurde vermutet, dass auch Dipeptide einen großen Anteil am Gesamtpräparat aufweisen. Diese konnten mit der TLC jedoch nicht in höheren Konzentrationen nachgewiesen werden.

Durch die Applikation der Nährmedien wurden den nährstoffarmen Blättern Stickstoffquellen in Form von Aminosäuren und kleinen Peptiden ( $< 3$  kDa) zugeführt. Diese können insbesondere von Bakterien mit weniger Energieaufwand abgebaut werden als hochmolekulare Verbindungen. Die zusätzliche Stickstoffquelle förderte das Wachstum der gesamten Mikrobengemeinschaft in allen Versuchsjahren nachweislich (CFUs/g TG Falllaub; BSB<sub>5</sub>) und hatte einen schnelleren natürlichen Blattabbau zur Folge. Welche Stoffklassen für die Förderung der jeweiligen Falllaubbesiedler 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 Löslichkeit bzw. die Abwaschung der Nährmedien bei Regen/Schnee bedingt wird, eine entscheidende Rolle. Die Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen und Aminosäuren kann auch die Produktion fungizider Substanzen beeinflussen (Chang et al., 1967; Shanahan et al., 1992; Zhou et al., 1992). Die Applikation der Nährmedien könnte zu einer verstärkten Biosynthese von Hemmstoffen geführt haben.

Die Behandlung des Falllaubs mit Nährmedien förderte die Aktivität der Regenwürmer beim Kooperationspartner in Weinsberg. Eine Erklärung für die gesteigerte Attraktivität des behandelten Falllaubs ist, dass Regenwürmer in der Lage sind, nach einer geeigneten Nahrungsquelle zu suchen (Zirbes et al., 2011). Hauptnahrungsquelle sind dabei organische Materialien in verschiedenen Stadien des Blattabbaus (Lee, 1985). Protein- und kohlenhydratreiches Falllaub wird gegenüber Falllaub mit geringerem Protein-Gehalt bevorzugt (Satchell, 1967; Hendriksen, 1990). Laverack (1960) und Edwards & Bohlen (1996) konnten zeigen, dass die Würmer mit Hilfe ihrer Chemorezeptoren Saccharose und Glucose detektieren können. Beide Saccharide sind, wie in dieser Arbeit mit Hilfe biochemischer Analysen nachgewiesen, Bestandteile des TSB und des Pepton Casein Präparates und könnten zu einer Attraktivitätssteigerung der behandelten Blätter beigetragen haben. Am schnellsten wurden von den Würmern die mit Hefeextrakt LEIBER und Casaminoacids 6% behandelten Blätter umgesetzt. Glucose und Saccharose konnten in beiden Präparaten nicht detektiert werden. Laverack (1960) vermutete, dass andere Bestandteile der Blätter wie Aminosäuren wichtiger als Zucker für die Attraktivität der Nahrungsquelle sind. Die Applikation der peptid- und aminosäurereichen Casaminoacids und Hefeextrakte könnte zu der gesteigerten Attraktivität des Falllaubs für die Würmer geführt haben. Vor dem Hintergrund, dass die Konzentration der Nährstoffe infolge von Ab-/Auswaschung bei Regen und dem Anstieg der Mikrobenpopulation (s. 3.3.1.) reduziert wurde, ist jedoch davon auszugehen, dass die gesteigerte Fraßleistung der Würmer vor allem auf die verstärkte Besiedlung des Falllaubs mit Mikroorganismen zurückzuführen ist.

#### **4.6. Bewertung der Extraktion und Löslichkeit von Saponinen mit dem Hämolyse-Cuptest**

Das Ziel der präparativen Arbeiten war die Gewinnung und Anreicherung von Saponinen aus unterschiedlichen Pflanzenmaterialien. Zunächst wurden die Saponine mit einer Butanol-Extraktion in Anlehnung an Saha et al. (2010) gewonnen. Das Arbeiten mit n-Butanol gestaltete sich aufgrund des hohen Siedepunktes als schwierig und zeitaufwändig. Eine Zweiphasentrennung der Extrakte wurde durch das Zufügen von Wasser und n-Butanol zum Extraktionsgemisch bewirkt. Der n-Butanol-Wasser-Anteil war für jeden Aufschluss individuell anzupassen und abhängig von der jeweiligen Extraktion und/oder dem Pflanzenmaterial. Das Verwerfen der wässrigen-Phase könnte zu Verlusten geführt haben, da in dieser eine starke Schaumbildung beobachtet wurde. Die Fällung der Saponine mit Aceton könnte zu weiteren Extraktionsverlusten beigetragen haben. Für eine hohe

Probenzahl und eine quantitative Gewinnung größerer Extraktmengen war die Extraktionsmethode nicht geeignet.

Auf Grundlage einer Lipidextraktion von Blight und Dyer (1959) wurde eine neue, weniger zeitintensive Extraktionsmethode für Saponine entwickelt. Der Vorteil gegenüber der Butanol-Extraktion war, dass die Entfettung des Pflanzenmaterials und die Lösung der Saponine in einem einzigen Extraktionsschritt mit einem Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisch vollzogen wurden.

Zur Bewertung der Butanol- und Chloroform-Methanol-Extraktionen wurde mit dem Hämolyse-Cuptest ein neues Nachweisverfahren für Saponine entwickelt. Dieses nutzt die hämolytische Eigenschaft der Saponine, die zur Zellyse von Erythrocyten führen kann (Baumann et al., 2000; Chwalek et al., 2006; Desai et al., 2009). Mit dem „Schnell-Test“ war es möglich, die Anreicherung und Ausbeute verschiedener Saponinextraktionen zu vergleichen. Die Hämolyse-Höfe der Saponinextrakte waren unterschiedlich gefärbt. Bei Waschnuss-, Yucca- und Seifenkrautextrakt konnte das Auftreten von nahezu klaren Hämolysehöfen beobachtet werden. Die Hämolysehöfe des Primel-, Kastanien- und Seifenrindenbaumextraktes waren in einem leicht rötlichen Ton gefärbt. Die Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass die hämolytische Wirkung dieser Extrakte geringer war und/oder die Saponine schneller diffundierten, so dass nicht alle Erythrocyten im Hofbereich lysiert waren. Bei der Bewertung der hämolytischen Wirkung ist zu berücksichtigen, dass das hämolytische Potenzial der Saponine von ihrer Struktur abhängig ist. Monodesmosidische Saponine weisen in der Regel ein stärkeres hämolytisches Potenzial als bidesmosidische auf (Augustin et al., 2011) und nicht alle Saponine besitzen hämolytische Aktivität (Nakamura et al., 1979; Gauthier, 2009 a, b). Die Extrakte verschiedener Pflanzenmaterialien können daher nur eingeschränkt mit dem Hämolyse-Cuptest verglichen werden. Der spezifische Nachweis hämolytischer Fraktionen war für die vorliegende Arbeit von Vorteil, da der fungizide Effekt gegenüber *V. inaequalis* daran gebunden war.

Für die Aufreinigung von Saponinen erwies sich die Butanol-Extraktion, mit Ausnahme vom Seifenkrautextrakt, als das bessere Verfahren. Die Menge des Gesamtextraktes war gering, wies aber eine hohe spezifische Aktivität auf. Mit der Chloroform-Methanol-Extraktion konnte, bis auf Yuccasaponin, eine größere Saponinausbeute erreicht werden. Die spezifische hämolytische Aktivität dieser Extrakte war im Vergleich zu den Butanol-Extrakten geringer. Die Ergebnisse des Hämolyse-Cuptest zeigen, dass das Extraktionsverfahren an die spezifischen Saponine einer Pflanze anzupassen ist. Dies ist insbesondere schwierig, wenn es sich um unbekannte Substanzen handelt, die je nach Struktur eher polaren oder unpolaren Charakter aufweisen können. In der vorliegenden Arbeit war die Saponinausbeute mit beiden Extraktionsverfahren geringer als erwartet. Mögliche Ursachen für die Verluste könnten eine zu kurze Extraktionsdauer, Wechselwirkungen mit anderen Stoffen und/oder ein Erreichen der jeweiligen Löslichkeitsgrenzen sein.

Die Extraktion der Saponine aus den verwendeten Pflanzenmaterialien war reproduzierbar. Es kam nur zu kleineren Schwankungen bei der Ausbeutemenge. Diese können auch durch den leicht variablen Saponingehalt in Pflanzenmaterialien bedingt werden. 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). Welche Auswirkung die Trocknung der Pflanzenmaterialien und die Lagerung (RT) im Handel auf den Saponingehalt hatte, ist nicht bekannt. Im Labor wurden die Saponinextrakte bei -20°C aufbewahrt, um Verluste zu vermeiden.

Für die Entwicklung eines neuen Extraktionsverfahrens und zur Optimierung der Ausbeute wurde eine Löslichkeitsstudie mit verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt. Die Pflanzenextrakte zeigten eine unterschiedliche Affinität zu den verwendeten Lösungsmitteln, die durch die strukturelle Variabilität ihrer Aglycone und die Vielzahl möglicher Kohlenhydratstrukturen dieser Stoffgruppe bedingt wird. Einen Einfluss auf die Löslichkeit hatten vermutlich auch die in den heterogenen Stoffgemischen enthaltenen Begleitsubstanzen. Diese können die Saponine abschirmen und zur Oxidation/Inaktivierung der Moleküle führen. Als Referenzmaterial wurden daher kommerziell erhältliche Saponine mit unterschiedlichen Reinheitsgraden verwendet. Polare Lösungsmittel, wie Reinstwasser, Ethanol 60-80% oder Methanol, erwiesen sich als gute Lösungsmittel für alle Pflanzenextrakte und das Quillajasaponin. In der Literatur wird für die Extraktion von Saponinen ebenfalls die Verwendung eines polaren Lösungsmittels, wie Methanol 30-80% (Reznicek et al., 1990; Ha et al., 2006; Lendl & Reznicek, 2007) oder Ethanol 70%-96% (Shimoyamada et al., 1995; Liu et al., 2005; Koch et al., 2013; Sharma et al., 2013) empfohlen. Eine schlechte Löslichkeit zeigten die Saponinextrakte in reinem Ethanol und reinem Isopropanol. Der Saponinstandard Aescin war in polaren Lösungsmitteln, wie Methanol 60-80% und Ethanol 60-100%, schlecht löslich. Möglicherweise hätte die Löslichkeit durch eine Erhöhung der Lösungsmittelmenge verbessert werden können. Eine Weiterentwicklung der Extraktionsmethode, bei der das Lösungsmittel an die spezifischen Saponine einer Pflanze angepasst wird, um die Wirkstoffe in höheren Konzentrationen zu extrahieren, ist anzustreben. Möglicherweise könnte die Ausbeute durch Verwendung einer Soxhlet-Apperatur erhöht werden. Diese wurde bereits erfolgreich zur Extraktion von Saponinen verwendet (Onning & Asp, 1993). Für die Herstellung der Saponinextrakte könnte auch die Extraktionsmethode durch Mikrowellen genutzt werden (Kaufmann & Christen, 2002; Pareet al., 1994). Das Prinzip der Mikrowellenbasierten Extraktion besteht in der kapazitiven Erwärmung des Pflanzenmaterials bzw. des Lösungsmittels. (Smith & Carpentier, 1993; Proestos & Komaitis, 2008; Oppermann, 2012). Die Mikrowellenextraktion hat gegenüber konventionellen Methoden den Vorteil, dass weniger Lösungsmittel verbraucht werden, die Aufschlussbedingungen standardisiert, effizienter und reproduzierbarer sind und die

Extraktionszeit minimiert wird (Zhang et al., 2009; Desai et al., 2010; Sharma et al., 2008).

#### 4.7. Charakterisierung des fungiziden Potenzials der Pflanzenextrakte

Für alle untersuchten Pflanzenextrakte konnte *in vitro* eine hemmende Wirkung auf die Keimung der Konidien und das Mycelwachstum des Apfelschorfs nachgewiesen werden. Die Wirkung der Gesamtextrakte war in beiden Testsystemen konzentrationsabhängig. Es zeigte sich ein für fungizide Substanzen typischer, sigmoider Kurvenverlauf. Die  $IC_{50}$  der Butanol-Extrakte war niedriger als die der Chloroform-Methanol-Extrakte, was im Zusammenhang mit der höheren spezifischen Aktivität dieser Extrakte stehen sollte. In den Konidienkeimtests wiesen neben dem käuflichen Aescin das Waschnuss- und das Yuccasaponinextrakt eine hohe Effektivität auf. Bei den Wachstumshemmtests bestätigte sich diese gute Wirkung nur für ein Waschnussextrakt, welches ab einer Konzentration von 0,5% fungizid wirkte und in Flüssigkultur eine noch stärker hemmende Wirkung auf das Mycelwachstum hatte. Für das Kastanien- und Seifenkrautextrakt konnte eine schwächere fungizide Wirkung nachgewiesen werden. Das käufliche Quillaja- und Yuccasaponin sowie die Extrakte vom Seifenrindenbaum und aus Efeu zeigten auch bei hohen Konzentrationen nur eine fungistatische Wirkung.

Eine Korrelation zwischen der  $IC_{50}$  des Wachstums- und Konidienkeimtests konnte nicht in allen Fällen nachgewiesen werden. Eine Erklärung für die unterschiedliche Wirkung der Extrakte in den beiden Testsystemen könnte die Inkubationszeit sein. Im Konidienkeimtest war diese mit 24 h vergleichsweise kurz. Im Hemmtest könnten die fungizid wirkenden Saponine innerhalb der dreiwöchigen Inkubationszeit ihre Aktivität verloren haben. Ebenso wäre es denkbar, dass *V. inaequalis* Enzyme, Schleime etc. freigesetzt hat, die zum Abbau/Inaktivierung der Saponine beigetragen haben. Für die beiden dunkelbraun gefärbten Yuccasaponinextrakte konnte im Konidienkeimtest eine niedrige  $IC_{50}$ , im Mycelhemmtest eine hohe  $IC_{50}$  bestimmt werden. Begleitstoffe der Pflanzenextrakte, wie pflanzliche Phenole, könnten die Keimfähigkeit der Konidien negativ beeinflusst haben. Einen Einfluss auf die hemmende Wirkung der Extrakte könnte auch ihre Löslichkeit im Potato-Dextrose-Agar haben.

Von der spezifischen Aktivität der Pflanzenextrakte, die auch vom Diffusionsverhalten im Cuptest abhängig ist, konnte nicht auf die fungizide Wirkung geschlossen werden. Diese Beobachtung wurde auch von Gauthier et al. (2009 a, b) gemacht, die für Saponine der Lupine nachweisen konnten, dass die Fähigkeit zur Hämolyse nicht immer mit den cytotoxischen Eigenschaften korreliert. Die unterschiedliche Sterolzusammensetzung und -gehalte in der Membran der Erythrocyten und der von *V. inaequalis* sowie die Zugänglichkeit der Membransterole in den beiden Testsystemen könnten zu den abweichenden Ergebnissen geführt haben.

Die Verwendung von SPE-Säulen zur Aufreinigung und Anreicherung der Saponine könnte die fungizide Wirkung der Extrakte weiter steigern. Mit Polyamid-Säulen

konnte bei gleichbleibender hämolytischer Aktivität bis zu 90% unwirksamer Stoffe aus dem Waschnussextrakt entfernt werden. Nicht schäumende Substanzen, die im Bereich von 210-220 nm und 260-280 nm absorbierten, wurden von der Säule gewaschen. Die hellgelbe-bräunliche Färbung der SPE-Waschflüssigkeit lässt vermuten, dass es sich bei den eluierten Substanzen um phenolische Inhaltsstoffe handelt. Der Aufreinigungserfolg wurde auch durch den Vergleich der Absorptionsspektren von Aescin ( $\geq 97,9\%$ ) mit den Methanol-Eluaten deutlich. Interaktionen von unwirksamen Stoffen mit den Saponinen können so nahezu ausgeschlossen werden. Das Sorbensmaterial der SPE-Kartuschen war an die spezifischen Saponine der Pflanzenextrakte anzupassen. Die beste Aufreinigung von Kastanien- und Seifenkrautextrakt konnte durch die Verwendung von CN- bzw. C18-Kartuschen erreicht werden. Die Anreicherung der Saponine könnte durch die Kombination verschiedener SPE-Retentionsmechanismen weiter verbessert werden. Mit der Kombination von CN- und PA-Kartuschen konnte die hämolytische Wirkung des Waschnuss-Methanol-Eluates um 20%, gegenüber dem Rohextrakt, gesteigert werden. In zukünftigen Konidien- und Wachstumshemmtest sollte untersucht werden, ob die höhere spezifische Aktivität der Extrakte auch zu einer stärkeren fungiziden Wirkung beiträgt.

Für die Bekämpfungsversuche im Gewächshaus wurden die Butanolextrakte von Waschnuss und Kastanie verwendet, da diese im *in vitro* Screening das stärkste fungizide Potenzial zeigten. Käufliches Aescin wurde auf die Sämlinge appliziert, um einen Vergleich zwischen der Wirkung eines hochkonzentrierten Saponins mit den eigenen Extrakten zu erhalten. Die präventive Behandlung der Sämlinge mit den 1% Saponinextrakten bewirkte eine nahezu vollständige Befallsreduktion. Es konnten makroskopisch keine sporulierenden Infektionen festgestellt werden. Die Blätter, der mit Waschnuss- und Kastanienextrakt behandelten Sämlinge, wiesen chlorotische Flecken auf, die zunächst als Infektionssymptome gewertet wurden. Diese verhielten sich in Abbildungen mit der Thermokamera wie nicht-infiziertes Gewebe. Die nahezu vollständige Reduktion der Sporulation gegenüber der unbehandelten Kontrolle bestätigte die gute präventive Wirkung der Extrakte. Eine präventive 0,1% Saponinapplikation zeigte eine geringere Wirkung. Es wurde das Erscheinen kleinerer sporulierender Infektionen beobachtet. Damit bestätigte sich die konzentrationsabhängige Wirkung der Saponinextrakte, die bereits beim *in vitro* Screening festgestellt wurde. Eine Behandlung der Sämlinge 6 h nach der erfolgten Inokulation zeigte eine gute Wirkung. Die Sporulation des Erregers war fast vollständig reduziert und es konnten nur kleinere Infektionen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse korrelierten mit den Studien von Bengtson et al. (2009) und Pfeiffer et al. (2001), die in Gewächshausversuchen durch die präventive und kurative Applikation von Heißwasser-/Ethanol-extrakten und käuflichen Saponinpräparaten ebenfalls eine Reduktion von Schorfläsionen und der Konidienproduktion nachweisen konnten. Eine Behandlung der Sämlinge 24 h nach der erfolgten Inokulation zeigte eine deutlich geringere Wirkung. Die Sämlinge wiesen sporulierende Läsionen auf, die zum Teil nekrotisiert waren. Die schlechtere kurative Wirkung der Extrakte 24 h nach der Inokulation ist vermutlich darauf zurückzuführen,

dass die Infektionshypothese des Pathogens zu diesem Zeitpunkt die Cuticula penetriert hat und in den subcuticularen Raum eingedrungen ist. Das Pathogen ist bereits etabliert und kann vom Wirkstoff unter Umständen schlecht erreicht werden. Eine „Stopp-Spritzung“ zum Zeitpunkt der Inokulation oder kurz danach (6h) ist als effektiver zu bewerten. Im direkten Vergleich der drei getesteten Saponinextrakte zeigte das käufliche Aescinpräparat den höchsten Wirkungsgrad. Eine Verbesserung der Extraktionsmethode und die Aufreinigung der Saponinextrakte über die SPE könnte die Wirksamkeit von Waschnuss- und Kastanienextrakten vermutlich steigern.

Im Vergleich zu den Gewächshausversuchen konnte im Freiland, in zwei Infektionsperioden, eine geringere Wirkung der Saponinextrakte nachgewiesen werden. Im Freiland werden meist wesentlich höhere Wirkstoffkonzentrationen als *in vitro* benötigt, um eine ausreichende Reduktion des Befalls zu ermöglichen. Ursachen dafür liegen unter anderem in der Abwaschbarkeit der Saponine bei Regen, die zu einer Verdünnung des Präparates führen kann. Einen starken Einfluss auf die Wirksamkeit hat auch die Stabilität der Wirkstoffe bei den wechselnden abiotischen Bedingungen im Freiland. Mikroorganismen der Phyllosphäre können ebenfalls zum Abbau/Inaktivierung von Saponinen beitragen (Osbourne, 1996; Papadopoulou et al. 1999; Bouarab et al., 2002).

Zusätzlich zur Wirksamkeit der geprüften Saponinextrakte im Gewächshaus und Freiland, erlauben die Untersuchungen auch eine Aussage über die Phytotoxizität der Substanzen. Dieser Aspekt stellt ein wichtiges Kriterium für die Entwicklung und Zulassung neuer Wirkstoffe dar. Die Applikation von Aescin, Waschnuss- und Kastanienextrakt führte weder im Gewächshaus noch im Freiland zu phytotoxischen Schäden an der Pflanze. Die behandelten Sämlinge wirkten vitaler als die Kontrollsämlinge und wiesen eine intensivere Grünfärbung der Blätter auf. Die ausgeprägte Grünfärbung des Blattgewebes wird als Greening-Effekt bezeichnet und ist z.B. bei der Behandlung von Apfelbäumen mit Strobilurinen bekannt (pers. Mitteilung Kollar, A.). Dem Greening-Effekt wird eine vorteilhafte Wirkung, wie eine verzögerte Seneszenz der pflanzlichen Organe und die Vermeidung von Schäden durch oxidativen Stress zugeschrieben (Gerhard, 2001). Grossmann et al. (1999) führen diese Wirkung bei ihren Untersuchungen an Winterweizen (*Triticum aestivum*) auf eine Verschiebung im Phytohormonhaushalt der Pflanze zurück, die zu höheren Cytokiningehalten und einer Reduktion der Ethylenabgabe führt. Die Widerstandskraft der Pflanze gegenüber abiotischen Schadfaktoren wird erhöht (Bertelsen et al., 2001; Magnan und Lacey, 1985) und hat eine positive Wirkung auf das Pflanzenwachstum und die Assimilationsrate (Gerhard et al., 1998; 2001; Beck, 2004). Die Fragestellung, ob Saponine beim Apfel einen ähnlichen Wirkmechanismus aufweisen und die Assimilationsrate und/oder die Seneszenz beeinflussen, könnte durch die Messung der Photosyntheserate, des Chlorophyllgehaltes und der Ethylenabgabe der Sämlinge geklärt werden.

Die fungizide Wirkung der Pflanzenextrakte ist ein Beleg für den potenziellen Einsatz von Saponinen zur Schorfbekämpfung. Für eine verbesserte Wirkung der Präparate

im Freiland sollte die Extraktion optimiert werden, um den Saponingehalt zu erhöhen. Eine Strategie könnte die Anreicherung monodesmosidischer Saponine sein, da diese im Allgemeinen eine stärkere Affinität zu Membransterolen aufweisen. Die lipophilen Eigenschaften der Saponine könnten ein weiteres Extraktionskriterium darstellen und zusätzlich die Haftung auf der Blattoberfläche verbessern. Mit den bisherigen Extraktionsmethoden wurden Gemische aus verschiedenen Saponinen isoliert. Die Synergieeffekte der Substanzen könnten zu einer Abschwächung der fungiziden Wirkung einzelner Saponine geführt haben. Die Isolierung und Anreicherung von Einzelkomponenten könnten zu einer verbesserten Wirkung der Extrakte beitragen. Die Präparation von Formulierungen, die die Wasserlöslichkeit verringern ohne die fungiziden Eigenschaften der Saponine zu beeinträchtigen, wäre anzustreben. Die Entwicklung solcher Formulierungen könnte die Wirkung und die Wirkdauer der Saponine entscheidend verbessern.

#### **4.8. Analyse der aktiven Inhaltsstoffe von Saponinextrakten**

Mit dem Trennmedium Phenyl Sepharose wurde für die Aufreinigung und Anreicherung von Saponinen erstmals die hydrophobe Interaktionschromatographie erfolgreich angewandt. Die Trennung der Moleküle beruht auf einer Wechselwirkung zwischen dem hydrophoben Aglycon der Saponine und dem hydrophoben Phenylrest des Sepharosegels. Die Affinität der beiden Moleküle wurde durch den Zusatz von Salzen und die steigende Polarität des Laufpuffers verstärkt. Die hämolytischen Saponine vom Waschnuss-, Seifenkraut- und Seifenrindenbaumpräparat wurden mit einer ungepufferten 20 mM Tris-Lösung in wenigen Fraktionen von der Säule eluiert und angereichert. Saponine von Kastanie, Primel sowie Aescin und Yuccasaponin wiesen eine höhere Affinität zum Säulenmaterial auf und konnten erst durch Zusatz von Ethanol 50% eluiert werden. Die Hauptkomponenten dieser Saponine und Saponingemische sind Monodesmoside (Matsuda et al., 1997; Coran & Mulan, 2012; Tamura et al., 2012). Der hydrophobe Charakter dieser Stoffe könnte die verstärkte Bindung an das Säulenmaterial bewirkt haben.

Die präparative HIC stellt eine gute Alternative zu den standardmäßig für die Aufreinigung und Anreicherung von Saponinen verwendeten Sephadex LH-20 Säulen dar. Das Säulenmaterial ist gegenüber pH-Änderungen und Eluentenwechseln stabil. Auf das Gelbett können größere Extraktmengen aufgetragen werden. Begleitstoffe, die im Bereich von 280 nm absorbieren, werden fast vollständig vom Extrakt abgetrennt. Ein großer Teil dieser Substanzen eluiert mit der gelb bis bräunlich gefärbten Eluentenfront. Bei diesen Stoffen handelt es sich vermutlich um polare Substanzen, wie z.B. Salze oder Zucker, die mit dem lipophilen Säulenmaterial nicht in Wechselwirkung treten. Die fehlende Schaumbildung führt zu der Annahme, dass keine Saponine in den Fraktionen enthalten sind und es folglich nicht zu Verlusten durch die Aufreinigung kommt. Mit der HIC konnten Saponinpräparate, die einen hohen Anteil hämolytischer Saponine aufweisen, gereinigt werden. Für das Efeupräparat, welches als fungizid charakterisiert wurde, aber nur ein geringes hämolytisches Potenzial zeigte, wurde in keiner HIC-Fraktion

Hämolyse nachgewiesen. Die Fraktionierung nach dem hämolytischen Potenzial führt nicht zu größeren Verlusten der nicht-hämolytischen Saponine. In der TLC konnten für die HIC-Extrakte die gleichen Saponinbanden wie im Gesamtextrakt detektiert werden. Die Banden waren schärfer voneinander getrennt, was ein Beleg für die Aufreinigung der Extrakte ist. In den Chromatogrammen der HPLC wurde der Reinigungserfolg ebenfalls deutlich. In den HIC-Fractionen fehlten Peaks, die im Gesamtextrakt detektiert wurden. Diese Peaks wurden im Agardiffusionstest und im Konidienkeimtest als nicht-fungizide Substanzen charakterisiert. Alle fungizid wirkenden Substanzen konnten mit der HIC gebunden und angereichert werden, unwirksame Begleitstoffe wurden abgetrennt. Die präparative Aufreinigung der Extrakte könnte durch die Verwendung größerer Säulenvolumina noch gesteigert werden.

Mit der Dünnschichtchromatographie wurden die Saponingemische der Pflanzenextrakte voneinander getrennt. Die Färbung mit Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz führte zu einer differenzierten Färbung aller Saponinbanden. Hämolytische Saponine konnten durch die vergleichende Färbung der TLC-Platten mit heparinisiertem Schafblut detektiert werden. Die Färbung verblasste sehr schnell und war bei einigen Proben nur undeutlich zu erkennen. Schwach hämolytische Saponine einzelner Extrakte wurden möglicherweise nicht erfasst. Ein weiteres Problem der TLC-Analyse war, dass nur wenige käufliche Saponinstandards erhältlich waren. Im Hinblick auf die verwendeten Pflanzenmaterialien konnten von der Kastanie und dem Seifenrindenbaum Saponinpräparate erworben werden. Die Banden der Eigenextrakte stimmten mit denen der Standards überein. Für die anderen Saponinextrakte konnte aufgrund der fehlenden Standards nicht vergleichend analysiert werden.

Die berechneten Rf-Werte erlaubten eine Aussage über die Polarität der einzelnen Saponinfraktionen. Im Kastanien- und Primelextrakt sowie Aescin konnten ausschließlich Saponinbanden mit einem niedrigen Rf-Wert detektiert werden. Diese Substanzen waren in dem Fließmittelgemisch n-Butanol-Essigsäure-Wasser (84-14-7) schlecht löslich und weisen auf einen weniger polaren Charakter hin. Die Detektion von Aescin, einem Monodesmosid, nahe der Startlinie bestätigt diese Schlussfolgerung. Die Extrakte von Seifenbaumrinde, Yuccasaponin, Efeu, Seifenkraut und Waschnuss wiesen ein größeres Spektrum an Saponinen auf. Neben Saponinbanden mit einem niedrigen Rf-Wert konnten auch Banden mit höheren Werten nachgewiesen werden, was das Vorhandensein mono- und bidesmosidischer Saponine hindeutet.

Die fungizide Wirkung der Extrakte war nicht von der Anzahl der vorkommenden Saponine abhängig. In den Extrakten von Yucca, Seifenbaumrinde, Efeu und Seifenkraut konnte 5 bis 7 verschiedene Saponine nachgewiesen werden. In den Präparationen von Waschnuss, Primel und Kastanie war die Saponinvielfalt geringer. Diese Präparate wiesen einen großen Anteil monodesmosidischer Saponine auf und zeigten tendenziell eine stärkere fungizide Wirkung.

Für eine erste Analyse der Saponinvielfalt und Eigenschaften erwies sich die TLC als geeignetes Testsystem. In der anschließenden HPLC-Analyse der abgekratzten Banden wurde aber deutlich, dass die Auftrennung der Saponine nicht ausreichend war. Eine Bande bestand oft aus mehreren Einzelpeaks. Mit der verwendeten reversed-Phase-Säule konnte eine bessere Auftrennung der Extrakte erreicht werden. Durch das Fehlen von chromophoren Gruppen war eine UV-Detektion nur an der Absorptionskante, im Wellenlängenbereich von 200-210 nm möglich. Ein Acetonitril-Wasser-Gradient von 20 auf 80% Acetonitril innerhalb von 25 min erwies sich als geeignet, um die verschiedenen Saponine voneinander zu trennen.

Ein Einzelpeak des Waschnussextraktes, der durch die HIC angereichert werden konnte und den TLC-Banden B und C entsprach, hatte eine hemmende Wirkung auf das Mycelwachstum des Erregers. Die starke Schaumbildung und das hämolytische Potenzial dieser HPLC-Fraktion weisen auf das Vorhandensein von Saponinen hin. Der Peak eluierte bei einer Konzentration von etwa 70% Acetonitril. Dies lässt vermuten, dass es sich bei der lipophilen Substanz um ein Monodesmosid handelt. Das Vorkommen monodesmosidischer Saponine in Extrakten von *Sapindus mukorossi* wurde bereits vielfach beschrieben (Nakayama et al., 1996; Kasai et al.; 1986). Neben monodesmosidischen kommen auch bidesmosidische Saponine im Pericarp der Waschnuss vor (Kasai et al., 1986; Sharma et al., 2012; 2013). Möglicherweise waren diese in der Fraktion vor dem Hauptpeak enthalten. Die Fraktion beinhaltet eine Peakgruppe, mit leichter Schaumbildung und geringfügiger Hemmung der Konidienkeimung. Die fehlende hämolytische Wirkung und der nicht vorhandene Einfluss auf das Mycelwachstum des Apfelschorfs könnten mit der geringeren Affinität von Bidesmosiden zu Membransterolen begründet werden.

Im Rohextrakt der Kastanie konnten sieben Peaks detektiert werden, die eine fungizide Wirkung und hämolytische Aktivität aufwiesen. Das Chromatogramm entsprach annähernd dem von Aescin. Im direkten Vergleich war die Peakfläche der beiden vorderen Peaks beim Extrakt größer. Beide konnten das Mycelwachstum des Apfelschorfs weniger hemmen als die nachfolgenden. Die Hauptwirkung des Extraktes ist daher auf die fünf lipophilen Aescin-Peaks zurückzuführen, die bei einer Konzentration von etwa 60-70% Acetonitril eluierten. Die Struktur des Monodesmosids variiert durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Trisaccharide an der C<sub>3</sub> Position und variabler Reste, die mit der Hydroxylgruppe des C<sub>21</sub>- oder C<sub>22</sub>-Atoms verestert sind (Matsuda et al., 1997).

Im Seifenkrautextrakt und in Bande B (TLC) konnten fünf charakteristische Einzelpeaks mit einer fungiziden Wirkung auf das Mycelwachstum von *V. inaequalis* nachgewiesen werden. Die starke Schaumbildung der Fraktion und die Elution im Bereich von 48-60% Acetonitril lassen vermuten, dass es sich um weniger lipophile Saponine als im Waschnuss- und Kastanienextrakt handelt.

Die stark hämolytischen Banden der TLC beinhalteten bei allen Extrakten auch die fungizid wirkenden Saponine, die in den HPLC-Analysen der Rohextrakte

nachgewiesen wurden. Die auf die fungizid wirkenden Peaks folgenden HPLC-Fractionen wiesen zum Teil ebenfalls leichte hämolytische Aktivität auf und konnten das Wachstum von *V. inaequalis* hemmen. Die Wirkung ist vermutlich auf eine „Verschleppung“ (Tailing) von Stoffen aus dem/den fungiziden Hauptpeaks zurückzuführen.

Mit Hilfe der HPLC-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die schorfhemmende Wirkung der Saponinextrakte auf wenigen einzelnen Peaks beruht. Diese weisen einen leicht bis stark lipophilen Charakter auf, haben hämolytisches Potenzial und bilden stabile Schäume. Die Chromatogramme der Extrakte lassen Rückschlüsse auf die Löslichkeit der fungizid wirkenden Saponine zu. Mit diesem Wissen könnten gezielte Extraktionsverfahren für die Substanzen entwickelt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die weitere Charakterisierung der einzelnen HPLC-Peaks, die nicht zwangsläufig aus einer Substanz bestehen, nicht möglich. In zukünftigen Untersuchungen sollten diese Substanzen beispielsweise durch die Kombination von HPLC und Massenspektrometrie weiter charakterisiert und identifiziert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Aalbers, P. 2001. Regenwormen, partners bij de schurftbestrijding. *Fruitteelt-Den-Haag* **91 (31)**: 12-14
- Aber, J.D. & Melillo, J.M. 2001. Terrestrial ecosystems. Academic Press, San Diego
- Aderhold, R. 1900. Die Fusicladien unserer Obstbäume. II. Teil. *Landwirtschaftliche Jahrbücher* **29**: 541-588
- Aderhold, R. 1896. Die Fusicladien unserer Obstbäume. I. Teil. *Landwirtschaftliche Jahrbücher* **25**: 875-914
- Aderhold, R. 1895. Litterarische Berichtigung zu dem Aufsatz ueber die Perithezienform von *Fusicladium dendriticum* Wallr. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. **13**: 54-55
- Aderhold, R. 1894. Die Perithezienformen von *Fusicladium dendriticum* Wallr. (*Venturia chlorospora* f. Mali). *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*. **12**: 338-342
- Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. Academic Press. 3. Auflage, New York.
- Ando, H.; Hatanaka, K.; Ohata, I.; Yamashita-Kitaguchi, Y.; Kurata, A. & Kishimoto, N. 2012. Antifungal activities of volatile substances generated by yeast isolated from Iranian commercial cheese. *Food Control* **26**: 472-478
- Augustin, J.M.; Kuzina, V.; Andersen, S.B. & Bak, S. 2011. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **72**: 435-457
- Baldrian, P. & Valášková, V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbial Reviews* **32**: 501-521
- Baumann, E.; Stoya, G.; Völkner, A.; Richter, W.; Lemke, C. & Linss, W. 2000. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membran structure. *Acta Histochemica* **102**: 21-35
- Beck, C.L. 2004. Einfluss von Fungiziden auf die Ertragsphysiologie von Weizen. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
- Becker, C.M.; Burr, T.J. & Smith, C.A. 1992. Overwintering of conidia of *Venturia inaequalis* in apple buds in New York orchards. *Plant Disease* **76**: 121-126
- Becker, C.M. 1990. Overwintering of the anamorph of *Venturia inaequalis* (*Spilocea pomi*) in apple buds and the viability of conidia as effected by discontinuous wetting. Ph.D. thesis. Cornell University, New York.
- Belz, J. & Ruess, F. 2001. Auswirkungen unterschiedlicher Pflanzenschutzstrategien auf Ertrag, Qualität und Kostenaufwand von schorfresistenten Apfelsorten. *Erwerbsobstbau* **43**: 33-38
- Bengtsson, M.; Wulff, E.; Jørgensen, H.J.L; Pham, A.; Lübeck, M. & Hockenhull, J. 2009. Comparative studies on the effects of a yucca extract and acibenzolar-S-methyl (ASM) on inhibition of *Venturia inaequalis* in apple leaves. *European Journal of Plant Pathology* **124**: 187-198
- Bengtsson, M.; Heijne, B.; Hockenhull, J.; de Jong, P.F.; Paaske, K.; Pedersen, H.L. et al. 2007. New composition for control of fungal diseases. Plant application, International Publication Number WO2007139382-A2, Dezember
- 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
- Benyagoub, M.; Benhamou, N. & Carisse, O. 1998. Cytochemical investigation of the antagonistic interaction between a *Microsphaeropsis* sp. (Isolate P130A) and *Venturia inaequalis*. *Biochemistry and Cell Biology* **88**: 605-613

- Beresford, R.M. & Mantkeltow, D.W.L. 1994. Economics of reducing fungicide use by weather-based disease forecast for control of *Venturia inaequalis* in apples. *New Zealand Journal of crop and horticultural science* **22**: 113-120
- Berg, B. & McClaugherty, C. 2003. Plant litter-decomposition, humus formation, carbon sequestration. Springer Verlag, Berlin.
- Bertagnoll, M. & Marschall, K. 2011. Untersuchungen zur Strobilurin- und Anilinopyrimidinresistenz des Apfelschorfs in Südtirol. *Obstbau Weinbau* **9**: 287-290
- Bertelsen, J. R.; de Neergaard, E. & Smedegaard-Petersen, V. 2001. Fungicidal effects of azoxystrobin and epoxiconazole on phyllosphere fungi, senescence and yield of winter wheat. *Plant Pathology* **50**: 190-205
- Bialy, Z.; Jurzysta, W.; Oleszek, W.; Piacente, C. & Pizza, J. 1999. Saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation. *Agricultural Food Chemistry* **47 (8)**: 3185-3192
- Biehn, W.L.E.B. & Kuc, J. 1966. Resistance of mature leaves on *Malus atrosanguinea* 804 to *Venturia inaequalis* and *Helmithosporium carbonum*. *Phytopathology* **56**: 588-589
- Blight, E.G. & Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Physiology* **37 (8)**: 911-917
- Bonkowski, M.; Griffiths, B.S. & Ritz, K. 2000. Food preference of earthworms for soil fungi. *Pedobiologia* **44**: 666-676
- Börner, H. 1997. Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 7. Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- Boruah, D.H.P. & Kumar, D. 2002. Biological activity of secondary metabolites produced by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Folia Microbiologica* **47 (4)**: 359-363
- Bosshard, E., 1993. Prüfung von alternativen Präparaten zur Bekämpfung von Apfelschorf und –mehltau 1985-1992. Überblick und Schlussfolgerungen. 6. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau. Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau Weinsberg (Hrsg.), pp. 8-86
- Bosshard, E. & Häseli, A. 1993. Schlussbericht zum Projekt: Förderung von Methoden des biologischen Apfelanbaus 1985-1993. Eidg. Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau. Wädenswil. Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Oberwil
- Bosshard, E. 1992. Effect of Ivy (*Hedera helix*) leaf extract against apple scab and mildew. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* **27**: 135-140
- Bosshard, G.A. 1916. Beiträge zur Kenntnis der Roßkastanie und der in diesen Samen enthaltenen Saponin-Substanzen. Dissertation. Technische Hochschule Zürich
- Bouarab, K.; Melton, R.; Peart, J.; Baulcombe, D. & Osbourne, A. 2002. A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**: 889-892
- Boudreau, M.H. & Andrews, J.H. 1987. Factors influencing antagonism of *Chaetomium globosum* to *Venturia inaequalis*: A case study to failed biocontrol. *Phytopathology* **77**: 1470-1475
- Bouthilet, R. J.; Neilson, N. E.; Mrak, E. M. & Phaff, H. J. 1949. The fermentation of trehalose by yeasts and its taxonomic implications. *Journal of General Microbiology* **3**: 282-289
- Bowen, J.K.; Mesarich, C.H.; Bus, V.G.M.; Beresford, R.M.; Plummer, K.M. & Templeton, M.D. 2011. *Venturia inaequalis*: the causal agent of apple scab. *Molecular Plant Pathology* **12 (2)**: 105-122
- 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

- Braun, P.G. 1994. Development and decline of a population of *Venturia inaequalis* resistant to sterol-inhibiting fungicides. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* **17**: 173-184
- Brewer, D.; Duncan, J.; Jerram, W.A.; Leach, C.K.; Safe, S.; Taylor, A.; Vining, L.C.; Archibald, R. McG.; Stevenson, R.G.; Mirocha, C.J. & Christensen, C.M. 1972. Production and toxicology of chetomin, a metabolite of *Chaetomium* spp. *Canadian Journal of Microbiology* **18 (7)**: 1129-1137
- Brewer, D.; Jerram, W.A. & Taylor, A. 1968. The production of cochliodinol and related metabolites by *Chaetomium* species. *Canadian Journal of Microbiology* **14**: 861-866
- Brewer, D. & Taylor, A. 1967. The biological properties of 3,6-epidithiadiketopiperazines. Degradation of gliotoxin-B by *Bacillus subtilis* (HLX 373). *Canadian Journal of Microbiology* **13**: 1577-1589
- Brooks, C. 1909. Some apple diseases. *New Hampshire Agricultural Experiment Station Bulletin* **144**: 116
- Brown, G.G. 1995. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? *Plant and Soil* **170**: 209-231
- Burchill, R.T. 1972. Comparison of fungicides for suppressing ascospore production by *V. inaequalis* (Cooke) Winter. *Plant Pathology* **21**: 19-22
- Burchill, R.T. & Cook, R.T.A. 1970. The interaction of urea and micro-organisms in suppressing the development of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. In: Preece, T.F. & Dickinson, C.H. (eds.) Ecology of leaf surface micro-organisms. *Academic Press*, N.Y. 471-483
- Burchill, R.T.; Hutton, K.E.; Crosse, J.E. & Garrett, C.M.E. 1965. Inhibition of the perfect stage of *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. by urea. *Nature* **205**: 520-521
- Burr, T.J.; Matteson, M.C.; Smith, C.A.; Corral-Garcia, M.R. & Huang, T.C. 1996. Effectiveness of bacteria and yeasts from apple orchards as biological control agents of apple scab. *Biological Control* **6**: 151-157
- Carisse, O. & Rolland, D. 2004. Effect of timing of application of the biocontrol agent *Microsphaeropsis ochracea* on the production and ejection pattern of ascospores by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **94**: 1305-1314
- Carisse, O. & Dewdney, M. 2002. A review of non-fungicidal approaches for the control of apple scab. *Phytoprotection* **83**: 1-29
- Carisse, O.; Pillion, V.; Rolland, D. & Bernier, J. 2000. Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **90**: 31-37
- Carreiro, M.M.; Sinsabaugh, R.L.; Repert, D.A. & Parkhurst, D.F. 2000. Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to stimulated nitrogen deposition. *Ecology* **81**: 2359-2365
- Cesari, A. 2001. Lutte alternative contre la tavelure par l'emploi du champignon antagoniste *Athelia bombacina*. Colloque Européen Pomme – Protection biologique et alternative pomme: Verger – conservation. Centre technique interprofessionnel des fruites et légumes (Hrsg.), Paris
- Chang, C.J.; Floss, H.G.; Hook, D.G.; Mabe, J.A.; Manni, P.E.; Martin, L.L.; Schroder, K. & Shieh, T.L. 1981. The biosynthesis of the antibiotic pyrrolnitrin by *Pseudomonas aureofaciens*. *The Journal of Antibiotics* **1967**: 388-396
- Chapin, F.S. & Kedrowski, R.A. 1983. Seasonal changes in nitrogen and phosphorus fractions and autumn retranslocation in evergreen and deciduous taiga trees. *Ecology* **64**: 376-391
- Chapman, K.S.; Sundin, G.W. & Beckerman, J.L. 2011. Identification of resistance to multiple fungicides in field populations of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* **95**: 921-926

- Chiranjeevi, T.; Rani, G. B.; Chandel, A. K.; Sekhar, P. V. S.; Prakasham, R. S.; Addepally, U. 2012: Optimization of holocellulolytic enzymes production by *Cladosporium Cladosporioides* using taguchi-L'16 orthogonal array. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* **6 (2)**: 148-157
- Chwalek, M.; Lalun, N.; Bobichon, H.; Plé, K. & Voutquenne-Nazabadioko, L. 2006. Structur-activity relationships of some hederagenindiglycosides: haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochimica et Biophysica Acta* **1760**: 1418-1427
- Cinq-Mars, L. 1949. Interactions between *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. and saprophytic fungi and bacteria inhabiting apple leaves. M.Sc. thesis. McGill University, Montreal, Quebec, Canada. **pp. 114**
- Coleman, J.J.; Okoli, I.; Tegos, G.P.; Holson, E.B.; Wagner, F.F.; Hamblin, M.R. & Mylonakis, E. 2010. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chemical Biology* **5**: 321–332.
- Connor, S.R. & Heuberger, J.W. 1968. Apple scab: Effect of late-season applications of fungicides on prevention of perithecial development by *Venturia inaequalis*. *Plant Disease Report* **52**: 654-658
- Cook, M.E. & Swait, A.A.J. 1975. Effects of some fungicide treatments on earthworm populations and leaf removal in apple orchards. *Journal of Horticultural Science* **50**: 495-499
- Cook, M.E. & Burchill, R.T. 1973. Effect of fungicides on earthworm populations. *East Mailling Research Station Report for 1972*, **pp. 151**
- Cook, R.T.A. 1969. Studies on the overwintering of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Ph. D. thesis. University of London.
- Cooke, A. & Luxton, M. 1980. Effects of microbes on food selection by *Lumbricus terrestris*. *Revue d'Ecologie et Biologie du Sol* **17**: 365-370
- Coran, S.A. & Mulan, S. 2012. Validated determination of Primulasaponins in primula root by a high-performance-thin-layer-chromatography densitometric approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis* **70**: 647-651
- Crawford, D.L., 1978. Lignocellulose decomposition by selected Streptomyces strains. *Applied and Environmental Microbiology* **6**: 1041–1045
- Crosse, J.E.; Garrett, C.M.E. & Burchill, R.T. 1968. Changes in microbial population of apple leaves associated with the inhibition of the perfect stage of *Venturia inaequalis* after urea treatment. *Annual Applied Biology* **61**: 203-216
- Croxatto, A.; Prod'hom, G. & Greub, G. 2012. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* **36**: 380–407
- Crutcher, F. K.; Parich, A.; Schuhmacher, R.; Mukherjee, P.K.; Zeilinger, S. & Kenerley, C.M. 2013. A putative terpene cyclase, *vir4*, is responsible for the biosynthesis of volatile terpene compounds in the biocontrol fungus *Trichoderma virens*. *Fungal Genetics and Biology* **56**: 67-77
- Cullen, D. & Andrews, J.H. 1984. Evidence for the role of antibioses in the antagonism of *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. *Canadian Journal of Botany* **62 (9)**: 1819-1823
- Curry, J.P. & Schmidt, O. 2007. The feeding ecology of earthworms – A review. *Pedobiologia* **50**: 463-477
- Curtis, K.M. 1924. Black spot of apple and pear. *New Zealand Journal of Agronomie* **28**: 21-28
- de Leo, M.; De Tommasi, N.; Sanogo, R.; D'Angelo, V.; Germano, M.P.; Bisignano, G. & Braca, A. 2006. Triterpenoid saponins from *Pteleopsis suberosa* stem bark. *Phytochemistry* **67**: 2623–2629.
- Desai, M.; Parikh, J. & Parikh, P.A. 2010. Extraction of natural products using microwaves as a heat source. *Separation & Purification Reviews* **39**: 1-32

- Desai, S.D.; Desai, D.G. & Kaur, H. 2009. Saponins and their biological activities. *Pharma Times* **41 (3)**: 13-16
- Doube, B.M.; Schmidt, O.; Killham, K.; Corell, R. 1997. Influence of mineral soil on the palatability of organic matter for lumbricid earthworms: a simple food preference study. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 569-575
- Dourmashkin, R.R.; Dougherty, R.M. & Harris, R.J.C. 1962. Electron microscopic observations on Rous sarcoma virus and cell membranes. *Nature* **194**: 1116-1119
- Edwards, C.A. & Bohlen, P.J. 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman and Hall, London. **pp. 426**
- Edwards, C.A. & Fletcher, K.E. 1988. Interactions between earthworms and microorganisms in organic-matter breakdown. *Agriculture Ecosystems and Environment* **24**: 235-247
- El-Tarabily, K.A. & Sivasithamaram, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoter. *Mycosience* **47**: 25-35
- Erschbamer, M. 2013. Bio-Erntemengen in Europa erneut über 100 000 t. *Obst- und Weinbau* **7/8**: 230-231
- Fischer, M. & Bacher, A. 2006. Biosynthesis of vitamin B2 in plants. *Physiologia Plantarum* **126**: 304-318
- Fischer, M. 2004. Die Zukunft: krankheitsresistente Apfelsorten. *Erwerbs-Obstbau* **46**: 1-6
- Fiss, M.; Barckhausen, O.; Gherbawy, Y.; Kollar, A. & Auling, G. 2003. Characterization of epiphytic yeasts of apple as potential biocontrol agents against apple scab (*Venturia inaequalis*). *Journal of Plant Diseases and Protection* **110 (6)**: 513–523
- Fiss, M.; Kucheryava, N.; Schönherr, J.; Kollar, A.; Arnold, G. & Auling, G. 2000. Isolation and characterization of epiphytic fungi from the phyllosphere of apple as potential biocontrol agents against apple scab (*Venturia inaequalis*). *Journal of Plant Disease and Protection* **107 (1)**: 1-11
- 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
- Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H.P.S. & Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition* **88**: 587-605
- Frankland, J.C. 1998. Fungal succession-untravelling the unpredictable. *Mycological Research* **102 (1)**: 1-15
- Frey, C.N. & Keitt, G.W. 1925. Studies of spore dissemination of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. in relation to seasonal development of apple scab. *Journal of Agricultural Research* **30**: 529-540
- Gadoury, D.M.; MacHardy, W.E. & Rosenberger, D.M. 1989. Integration of pesticide application schedules for disease and insect control in apple orchards of the northeastern United States. *Plant Disease* **73**: 98-105
- Gadoury, D.M. & MacHardy, W.E. 1986. Forecasting ascospore dose of *Venturia inaequalis* in commercial apple orchards. *Phytopathology* **76**: 112-118
- Gadoury, D.M.; MacHardy, W.E. & Hu, C. 1984. Effects of temperature during ascus formation and frequency of ascospore discharge on pseudothecial development of *Venturia inaequalis*. *Plant Disease* **68**: 223-225

- Gaffney, T.D.; Lam, S.T.; Ligon, J.M.; Gates, K.; Frazelle, A.; Dimaio, J.; Hill, S.; Goodwin, S.; Torkewitz, N.; Allshouse, A.M.; Kempf, H.J. & Becker, J.O. 1994. Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. *Molecular-Plant Microbe Interactions* **7**: 455–463.
- Gauthier, C.; Legault, J.; Girad-Lalancette, K.; Mshvildze, V. & Pichette, A. 2009 a. Haemolytic activity, cytotoxicity and membran cell permeabilization of semisynthetic and natural lupane- and oleane-type saponins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**: 2002-2008
- Gauthier, C.; Legault, J.; Piochon, M.; Lavoie, S.; Tremblay, S. & Pichette, A. 2009 b. Synthesis, cytotoxicity, and haemolytic activity of chacotrioside lupane-type neosaponins and their germanicane-type rearrangement products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**: 2310-2314
- Gauthier, M.J. 2000. Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state. In: Colwell, R.R. and Grimes, D.J. (eds.). *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. ASM Press, Washington, DC. pp. 87-112
- Geipel, K. 1999. Mit oder ohne Überdachung? Apfelschorf. *Bayrische Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau*
- Georgakopoulos, D.; Hendson, M.; Panopoulos, N.J. & Schroth, M.N. 1994. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGS12 and analysis of its expression in vitro with the ice nucleation reporter gene. *Applied Environmental Microbiology* **60**: 2931–2938
- Gerhard M. 2001. Der Einfluss von strobilurinhaltigen Fungiziden auf physiologische Abläufe der Ertragsbildung an Winterweizensorten. Dissertation. Technischen Universität München.
- Gerhard, M.; Habermeyer, J.; Zinkernagel, V. 1998. The impact of strobilurins on plant vitality on winter wheat under field condition. In: Lyr, H.; Russel, P.E.; Dehne, H.-W.; Sisler, H.D. (eds.) *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*. Proceedings 12th International Reinhardsbrunn Symposium, Intercept, Andover, UK. pp. 197-208
- Getha, K. & Vikineswary, S. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology* **28**: 303–310
- Gilliver, K. 1947. The effect of plant extracts on the germination of the conidia of *Venturia inaequalis*. *Annual Applied Biology* **34**: 136-143
- Golba, B. 2002. Alternativen zum Einsatz von kupferhaltigen Präparaten im Apfelanbau, Ergebnisse einer Literaturrecherche im Auftrag der BLE. TU-München, Fachgebiet Obstbau
- Groß-Spangenberg, A. 1992. Untersuchungen zur Regulierung des Apfelschorf *Venturia inaequalis* mit Kompost und Kompostextrakten. Dissertation. Universität Bonn
- Grossmann, K.; Kwiatkowski, J. & Caspar, C. 1999. Regulation of phytohormone levels, leaf senescence and transpiration by the strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Physiology* **154**: 805-808
- Gunji, S.; Arima, K. & Beppu, T. 1983. Screening antifungal activities according including morphological abnormalities. *Agricultural and Biological Chemistry* **47**: 2061-2069
- Ha, Y.W.; Na, Y.-C.; Seo, J.-J.; Kim, S.-O.; Linhardt, R.J. & Kim, Y.S. 2006. Qualitative and quantitative determination of ten major saponins in Platycodi Radix by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1135**: 27-35
- Hagen, M. 1885. Ueber das Lupanin, ein Alkaloid aus dem Samen der blauen Lupine, *Lupinus angustifolius*. Dissertation, Universität Halle
- Han, M.Y.; Zhang, L.X.; Fan, C.H.; Liu, L.H.; Zhang, L.S.; Li, B.Z. & Alva, A.K. 2011. Release of nitrogen, phosphorus, and potassium during the decomposition of apple (*Malus domestica*) leaf litter

- under different fertilization regimes in loess plateau, china. *Soil Science and Plant Nutrition* **57** (4): 549-557
- Haynes, R. J. & Goh, K. M. 1980. Distribution and budget of nutrients in a commercial apple orchard. *Plant and Soil* **56** (3): 445-457
- He, Y.-H.; Isono, S.; Shibuya, M.; Tsuji, M.M; Purushothama, C.-R. A.; Tanaka, K. & Sano, T. 2012. Oligo-DNA custom macroarray for monitoring major pathogenic and non-pathogenic fungi and bacteria in the phyllosphere of apple trees. *PLOS ONE* **7**(3): 1-13
- Heijne, B.; de Jong, P.F.; Pedersen, H.L.; Paaske, K.; Bengtsson, M. & Hockenhull, J. 2007. Field efficacy of new compounds to replace copper for scab control in organic apple production. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Congress of the European Integrated Project Quality Low Input Food (QLIF), Hohenheim
- Heijne, B.; Balkhoven-Baart, J.M.T.; Veenes, T.S.G.M: & Anbergen, R.H.N. 2000. Field evaluation of pre-leaf fall applications to reduce the amount of apple scab inoculum. *Acta Horticulturae* **525**: 251-256
- Helling, B. & Larink, O. 1998. Contribution of earthworm to nitrogen turnover in agricultural soils treated with different N-fertilizers. *Applied Soil Ecology* **9**: 319-325
- Hendriksen, N.B. 1991. Gut load and food-retention time in the earthworms *Lumbricus terrestris* and *L. castaneus* – a field study. *Biology and Fertility of Soils* **11**: 170-173
- Hendrix, P.F.; Parmelee, R.W.; Crossley, D.A.Jr.; Coleman, D.C.; Odum, E.P. & Groffman, P.M. 1986. Detritus food webs in conventional and no-tillage agroecosystems. *Bioscience* **36**: 374-380
- Henrick, J.O. 1939. Apple black spot (*Venturia inaequalis*) investigations. Eradicant experiments – preliminary report. *Tasmanian Journal of Agriculture* **7**: 150-151
- Hermann, H.; Hodges, R. & Taylor, A. 1964. Sporidesmins. Part V. The stereochemistry of bridged dioxopiperazine ring in sporidesmins and in gliotoxin. *Journal of the Chemical Society* **830**: 4315-4319
- Heye, C.C. & Andrews, J.H. 1983. Antagonism of *Athelia bombacina* and *Chaetomium globosum* to the apple scab pathogen *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **73**: 650-654
- Heye, C.C. 1982. Biological control of the perfect stage of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. Ph.D. thesis. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin
- Hirst, J.M. und Stedman, O.J. 1962. The epidemiology of apple scab (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.). II. Observation on the liberation of ascospores. *Annals of Applied Biology* **50**: 552-550
- Holb, I.J.; Heijne, B. & Jeger, M.J. 2006. Effects of integrated control measures on earthworms, leaf litter and *Venturia inaequalis* infection in two European apple orchards. *Agriculture Ecosystems and Environment* **114**: 287-295
- Holb, I.J.; Heijne, B. & Jeger, M.J. 2004. Overwintering of conidia of *Venturia inaequalis* and the contribution to early epidemics of apple scab. *Plant Disease* **88**: 751-757
- Holb, I.J.; de Jong, P.F. & Heijne, B. 2003. Efficacy and phytotoxicity of lime sulphur in organic apple production. *Annals of Applied Biology* **142**: 225-233
- Holland, E.A. & Coleman, D.C. 1987. Litter placement effects on microbial and organic matter dynamics in an agroecosystem. *Ecology* **68**: 425-433
- Holz, W. 1938. Versuche zur Bekämpfung der Perithezien von *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fckl., mittels Kalkstickstoff. *Zentralblatt für Bakteriologie* **97**: 23-26, 466-469
- Hossain, M.B.; Piotrowski, M.; Lensing, J. & Gau, A.E. 2009. Inhibition of conidial growth of *Venturia inaequalis* by the extracellular protein fraction from the antagonistic bacterium *Pseudomonas fluorescens* Bk3. *Biological Control* **48**: 133-139

- Hoster, F. 2003. Identifizierung von Chitinasen mit fungizider Wirkung. Dissertation. Universität Göttingen
- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of concepts. *Plant Disease* **87**: 4-10
- Jamar, L.; Cavelier, M. & Lateur, M. 2010. Primary scab control using a "during-infection" spray timing and the effect on fruit quality and yield in organic apple production. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* **14 (3)**: 423-439
- Jamar, L.; Lefrancq, B.; Fassotte, C. & Lateur, M. 2008. A during-infection spray strategy using sulphur compounds, copper, silicon and a new formulation of potassium bicarbonate for primary scab control in organic apple production. *European Journal of Plant Pathology* **122**: 481-493
- James, R.S. & Sutton, T.B. 1982. Environmental factors influencing pseudothecial development and ascospore maturation of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **72**: 1073-1080
- Janisiewicz, W. 1991. Biological control of postharvest fruit disease In Arora, D.K.; Rai, B.; Mukerji, K.G. & Knudsen, G.R. (eds.) Handbook of Applied Mycology, Volume 1, Marcel Dekker, Inc., New York, USA. pp. 301-325
- Jayasinghe, B.A.T.D. & Parkinson, D. 2007. Actinomycetes as antagonists of litter decomposer fungi. *Applied Soil Ecology* **38**: 109-118
- Jeger, M.J. & Butt, D.J. 1983. Overwintering of *Venturia inaequalis* the causal agent of apple scab in relation to weather. *Annual Applied Biology* **103**: 201-218
- Jones, A.L. & Aldwinckle, H.S. 1990. Compendium of apple and pear disease. New York State Agricultural Experiment Station Cornell University, Geneva
- Jones, R.W. & Prusky, D. 2002. Expression of an antifungal peptide in *Saccharomyces*: a new approach for biological control of postharvest disease caused by *Colletotrichum coccodes*. *Phytopathology* **92**: 33-37
- Kai, M.; Effmert, U.; Berg, G. & Piechulla, B. 2007: Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. *Archives of Microbiology* **187**: 351-360
- Kasai, R.; Fujino, H.; Kuzuki, T.; Wong, W. H.; Goto, C.; Yata, N.; Tanaka, O.; Yasuhara, F.; Yamaguchi, S. 1986. Acyclic sesquiterpene oligoglycosides from pericarps of *Sapindus mukurossi*. *Phytochemistry* **25**: 871-876
- Kaufmann, B. & Christen, P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis* **13**: 105-113
- Keel, C.; Schnider, U.; Maurhofer, M.; Voisard, C.; Laville, J.; Burger, P.; Wirthner, P.; Haas, D. & G. 1992. Suppression of root diseases of by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**: 4-13
- Keitt, G.W.; Clayton, C.N. & Langford, M.H. 1941 a. Experiments with eradicant fungicides for combating apple scab. *Phytopathology* **31**: 296-322
- Keitt, G.W.; Clayton, C.N. & Moore, J.D. 1941 b. Experiments with eradicant fungicides for combating apple scab. *Phytopathology* **31**: 13-14
- Keitt, G.W.; Clayton, C.N. & Langford, M.H. 1940. Eradicant fungicidal treatments in relation to apple-scab control. *Phytopathology* **30**: 13
- Keitt, G.W. 1939. Toxicity of the sodium salt of dinitro-o-cresol to *Venturia inaequalis*. *Science* **90**: 139-140
- Keitt, G.W. & Palmiter, D.H. 1937. Potentialities of eradicant fungicides for combating apple scab and some other plant diseases. *Journal of Agricultural Research* **55**: 397-436

- Keitt, G.W. 1936. Some problems and principles of orchard disease control with special reference to sanitation and related measures. *Journal of Economic Entomology* **29**: 43-52
- Keitt, G.W. & Jones, L.K. 1926. Studies of the epidemiology and control of apple scab. *Wisconsin Agricultural Experiment Station Research Bulletin* **173**: 1-104
- Keyser, P.; Kirk, T.K. & Zeikus, J.G. 1978. Ligninolytic enzyme system of *Phanaerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *Journal of Bacteriology* **135**: 790-797
- Kelderer, M.; Casera, C. & Lardschneider, E. 1997. Schorffregulierung: verschiedene Kupferformulierungen – Alternativen zum Kupfer – gezielte Behandlungen. 8. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau e.V. (Hrsg.), Weinsberg. pp. 9-14
- Kennel, W. 1987. Kelchblätter als erste Objekte für Apfelschorf. *Erwerbsobstbau* **29 (2)**: 36-38
- Kennel, W. 1981. The role of the earthworm *Lumbricus terrestris* in removing sources of phytopathogenic fungi in orchards. *Gartenbauwissenschaft* **46**: 138-142
- Kerem, Z.; German-Shashoua, H. & Yarden, O. 2005. Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea (*Cicer arietinum* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**: 406–412
- Kinkel, L.L.; Andrews, J.H. & Nordheim, E.V. 1989. Fungal immigration dynamics and community development on apple leaves. *Microbial Ecology* **18**: 45-58
- Kirby, R. 2006. Actinomycetes and lignin degradation. *Advanced Applied Microbiology* **58**: 125-132
- Koch, E.; Enders, M.; Ullrich, C.; Molitor, D. & Berkelmann-Löhnertz, B. 2013. Effect of primula root and other plant extracts on infection structure formation of *Phyllosticta ampellicida* (asexual stage of *Guignardia bidwellii*) and on black rot disease of grapevine in the greenhouse. *Journal of Plant Disease and Protection* **120 (1)**: 26-33
- Köhl, J. 2007. REPCO- Replacement of copper fungicides in organic production of grapevine and apple in Europe. *Final activity report* No: 501452
- Kohl, R. & Kollar, A. 1994. Impairment of ontogenetic resistance of apple against *Venturia inaequalis*. *Norwegian Journal of Agricultural Science*. Supp. No. **17**: 399-402
- Kollar, A., Porsche, F.; Nietsch, N.; Bermig, S. & Pfeiffer, B. 2013. Schlussbericht zum Forschungsprojekt Nr.: 2809OE037 und 2809 OE103, Erforschung und Entwicklung alternativer Mittelzubereitungen für die Apfelschorfbekämpfung im Falllaub. Geschäftsstelle Bundeprogramm ökologischer Landbau in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Bonn
- Kollar, A. 2008. Verzögerter Laubfall beim Apfel und die Auswirkungen auf den Apfelschorf. 56. Deutsche Pflanzenschutztagung Kiel, Deutschland. *Mitteilungen aus dem Julius Kühn-Institut* **417**:176
- 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 Bundeprogramm ökologischer Landbau in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), Bonn
- Kollar, A. 1998. A simple method to forecast the ascospore discharge of *Venturia inaequalis*. *Journal of Diseases and Protection* **105 (5)**: 489-495
- Kollar, A. 1997. Aktuelle Forschung an dem bedeutendstem Erreger im Apfelanbau, dem Apfelschorfpilz *Venturia inaequalis*. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* **49 (5)**: 131-136

- Kollar, A. 1996. Evidence for loss of ontogenetic resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 773-778
- Kollar, A. 1994. Characterization of specific induction, activity, and isozyme polymorphism of extracellular cellulases from *Venturia inaequalis* detected *in vitro* and on the host plant *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**: 603-611
- Kollar, A. 1986. Charakterisierung von Siebröhreninhaltsstoffen des Apfels als Komponente des natürlichen Mediums der nicht kultivierbaren Triebsucht Mykoplasmen. Dissertation. Universität Heidelberg
- Kucheryava, N.; Fiss, M.; Auling, G. & Kroppenstedt, R.M. 1999. Isolation and characterization of epiphytic bacteria from the phyllosphere of apple, antagonistic *in vitro* to *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. *Applied Microbiology* **22**: 472-478
- Laverack, M.S. 1960. Tactile and chemical perception in earthworms. I. Responses to touch, sodium chloride, quinine and sugars. *Comparative Biochemistry and Physiology* **1**: 155-163
- 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
- Lee, K.E. 1985. Earthworms: Their ecology and relationships with soil and land use. Academic Press, London. **pp. 411**
- Leisinger, T. & Margraff, R. 1979. Secondary metabolism of the fluorescent pseudomonads. *Microbiological Reviews* **43**: 422-442
- Lendle, A. & Reznicek, G. 2007. Two new saponins from *Solidago gigantea*. *Scientia Pharmaceutica* **75**: 111-120
- Li, B. & Xu, C. 2002. Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. *Journal of Phytopathology* **150**: 687-691
- Lignon, J.M.; Hill, D.S.; Hammer, P.E.; Torkewitz, N.R.; Hofmann, D.; Kempf, H.-J. & van Pée, K.-H. 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science* **56**: 688-695
- Lin, J.T.; Chen, S.L.; Liu, S.C. & Yang, D.J. 2009. Effect of harvest time on saponins in yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *Journal of Food Drug Analysis* **17**: 116-122
- Liu, H. W.; Zhang, X.; Gao, H.; Wang, N. L.; Jin, S. L.; Cai, B.; Yao, X. S. & Cai, G. P. 2005. Two new triterpenoid glycosides isolated from *Aesculus assamica* GRIFF. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **53**: 1310-1313
- Loskill, B.; Molitor, D.; Koch, E.; Harms, M.; Berkelmann-Lohnertz, B.; Hoffmann, C.; Kortekamp, A.; Porten, M.; Louis, F. & Maixner, M. 2009. Abschlussbericht: Strategien zur Regulation der Schwarzfäule (*Guignardia bidwellii*) im ökologischen Weinbau (Management of black rot (*Guignardia bidwellii*) inorganic viticulture). <http://orgprints.org/17072/>.
- Louw, A.J. 1951. Studies of the influence of environmental factors on the overwintering and epiphytology of apple scab (*Venturia inaequalis* [Cke] Wint.) in the winter-rainfall area of Cape Province. Union of South Africa. Department of Agriculture. *Science Bulletin* **310**: 48
- Lowe, C.N. & Butt, K.R. 2003. Influence on food particle size on inter- and intra-specific interactions of *Allobophora chlorotica* (Savigny) and *Lumbricus terrestris*. *Pedobiologia* **47**: 574-577
- MacHardy, W.E.; Gadoury, D.M. & Gessler, C. 2001. Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to disease management strategies. *Plant Disease* **85 (10)**: 1036-1051
- MacHardy, W.E. 1996. Apple scab: Biology, Epidemiology, and Management. *American Phytopathology Society*, St Paul, MN.

- MacHardy, W.E. & Gadoury, D.M. 1986. Patterns of ascospore discharge by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **76**: 985-990
- MacHardy, W.E. & Jeger, M.J. 1983. Integrating control measures for the management of primary apple scab, *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. *Protection Ecoogy* **5**: 103-125
- Madigan, M.T. & Martinko, J.M. 2006. Brock Mikrobiologie, 11. Auflage, Pearson Education, München
- Magnan, N. & Lacey, J. 1985. The phylloplane microflora of ripening wheat and effect of late fungicide applications. *Annals of Applied Biology* **109**: 117-128
- Mangold, O. 1953. Experimente zur Analyse des chemischen Sinnes des regenwurms. 2. Versuche mit Chinin, Säuren und Substanzen. *Zoologische Jahrbucher Abteilung fuer Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* **63**: 501-557
- Mangold, O. 1951. Experimente zur Analyse des chemischen Sinnes des regenwurms. 1. Methode und Verhalten zu Blättern und zu pflanzen. *Zoologische Jahrbucher Abteilung fuer Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* **62**: 441-511
- Manktelow, D.W.L.; Beresford, R.M.; Batchelor, R.M. & Walker, J.T.S. 1996. Use patterns and economics of fungicides for disease control in New Zealand apples. *Acta Horticulturae* **422**: 187-192
- Mari, M.; Martini, C.; Spadoni, A.; Rouissi, W. & Bertolini, P. 2012. Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology* **73**: 56-62
- Matsuda, H.; Li, Y.; Murakami, T.; Ninomiya, K.; Araki, N.; Yoshikawa, M. & Yamahara, J. 1997. Antiinflammatory effects of escins Ia, Ib, IIa, and IIb from horse chestnut, the seeds of *Aesculus hippocastanum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **7 (13)**: 1611-1616
- Mazur, A.I.; Klimek, M.; Morgan, A.J. & Plytycz, B. 2011. Riboflavin storage in earthworm chloragocytes and chloragocyte-derived eleocytes and its putative role as chemoattractant for immunocompetent cells. *Pedobiologia* **54S**: 37-42
- McIntosh, D.L. 1969. A low-volume postharvest spray of benomyl prevents ascospore production in apple leaves infected by *Venturia inaequalis*. *Plant Disease Reports* **53**: 816-817
- Meszka, B. & Bielenin, A. 2006. Effect of saprophytic microorganisms on the development of *Venturia inaequalis* pseudothecia. *Zeszyty naukowe Instytutu sadownictwa I Kwaciarnstwa w Skierniewicach*. **14**: 69-77
- Miedke, U. & Kennel, W. 1990. *Athelia bombacina* and *Chaetomium globosum* as antagonists of the perfect stage of the apple scab pathogen (*Venturia inaequalis*) under field conditions. *Journal of Plant Disease* **97**: 24-32
- Mills, W.D. 1947. Effects of sprays of lime sulfur and of elemental sulfur on apple in relation to yield. Cornell University Agricultural Experimental Station, Ithaca, N.Y. **pp. 273**
- Mills, W.D. 1944. Efficient use of sulfur dusts and sprays during rain to control apple scab. New York State College of Agriculture. *Cornell Extension Bulletin* **630**: 4pp.
- Moller, W.J. 1981. Efficacy of autumn urea in reducing spring inoculums of apple scab. *California Plant Pathology* **52**: 1-2
- Montag, J.; Schreiber, L. & Schönherr, J. 2005. An *in vitro* study on the postinfection activities of hydrated lime and lime sulphur against apple scab (*Venturia inaequalis*). *Journal of Phytopathology* **153**: 485-491
- Moody, S.A.; Briones, M.J.I.; Pearce, T.G. & Dighton, J. 1995. Selective consumption of decomposing wheat straw by earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* **27 (9)**: 1209-1213
- Moritz, S.I. 1993. Bekämpfung primärer Infektionsquellen des Apfelschorfs (*Venturia inaequalis*) durch Einsatz eines Abflamngerätes, einjährige Erfahrungen, Modellansatz. 6. Internationaler

Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau Weinsberg (Hrsg.). pp. 103-106

Mukesh M. K.; Pandey, A.; Sharma, A. & Tiwari, S.C. 2013. Characterization and identification of actinomycetes isolated from 'fired plots' under shifting cultivation in northeast Himalaya, India. *Annals of Microbiology* **63 (2)**: 561-569

Müller, A.; Ganzera, M. & Stuppner, H. 2006. Analysis of phenolic glycosides and saponins in *Primula elatior* and *Primula veris* (primula root) by liquid chromatography, evaporative light scattering detection and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **112**: 218-223

Müller, E. & Löffler, W. 1992. Mykologie. Thieme Verlag, Stuttgart

Munk, K. 2008. Mikrobiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Nakamura, T.; Inoue, K.; Nojima, S.; Sankawa, U.; Shoji, J.; Kawasaki, T. & Shibata, S. 1979. Interaction of saponins with red-blood-cells as well as with the phosphatidylcholine liposomal membranes. *Journal of Pharmacology-Dynamics* **2(6)**: 374-378

Nakayama, K.; Fujino, H.; Kasai, R.; Mitoma, Y.; Yata, N.; Tanaka, O. 1986. Solubilizing properties of saponins from *Sapindus mukorossi* Gaertn. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **34**: 3279-3283

Nakayama, T.; Homma, Y.; Hashidoko, Y.; Mizutani, J. & Tahara, S. 1999. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Applied Environmental Microbiology* **55**: 4334-4339

Ndamba, J.; Lemmich, E. & Mølgaard, P. 1994. Investigations of the diurnal, ontogenetic and seasonal variation in the molluscicidal saponin content of *Phytolacca dodecandra* aqueous berry extracts. *Phytochemistry* **35**: 95-99

Neely, C.L.; Beare, M.H.; Hargrove, W.L. & Coleman, D.C. 1991. Relationship between fungal and bacterial substrate-induced respiration, biomass and plant residue decomposition. *Soil Biology and Biochemistry* **23 (10)**: 947-954

Neilands, J.B. 1979. Microbial iron transport compounds (siderophores). In: Eichhorn, G.L. (eds.). Inorganic Biochemistry, Vol. 1. Elsevier, Amsterdam. pp. 167-202

Neilson, R. & Boag, B. 2003. Feeding preferences of some earthworm species common to upland pasture in Scotland. *Pedobiologia* **47**: 1-8

Niklas, J. & Kennel, W. 1981. The role of the earthworm, *Lumbricus terrestris* (L) in removing sources of phytopathogenic fungi in orchards. *Gartenbauwissenschaft* **46**: 138-142

Niklas, J. 1980. Zur Wirkung von Pestiziden, insbesondere von Benzimidazolen, auf Regenwürmer und andere Bodentiere in Obstanlagen. Ph. D.thesis. Universität Hohenheim

Oberhofer, H., 1985. Der Apfelschorf, Lebensweise und Bekämpfung. Südtiroler Beratungsring für Obst- und Weinbau (Hrsg.). 2. Auflage, Lana.

Oleszek, W.A. 2002. Review-Chromatographic determination of plant saponins. *Journal of Chromatography A* **967**: 147-162

Oleszek, W.A. 1990. Structural specificity of Alfalfa (*Medicago-Sativa*) saponin hemolysis and its impact on 2 haemolysis-based quantification methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **53 (4)**: 477-485

Oleszek, W. 1988. Solid-phase extraction-fractionation of alfalfa saponins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **44 (1)**: 43-49

Oliver, J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology* **43**: 93-100

- Onning, G. & Asp, N.G. 1993. Analysis of saponins in oat kernels. *Food Chemistry* **48** (3): 301-305
- Oppermann, C. 2012. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe für die Krebsprävention und -therapie. Dissertation. Universität Rostock
- Osbourne, A. 1996. Saponins and plant defence - a soap story. *Trends in Plant Science* **1**(1): 4-9
- Österreicher, J. 2014. Außergewöhnliche Schorfsaison 2013, Vorschläge für die Schorfabwehr 2014. *Obstbau Weinbau* **3**: 87-91
- Ottesen, A.R.; White, J.R.; Skaltsas, D.N.; Newell, M.J. & Walsh, C.S. 2009. Impact of organic and conventional management on the phyllosphere microbial ecology of an apple crop. *Journal of Food Protection* **72**: 2321-2325
- Quimet, A.; Carisse, O. & Neumann, P. 1997. Evaluation of fungal isolates for the inhibition of vegetative growth of *Venturia inaequalis*. *Canadian Journal of Botany* **75**: 626-631
- Ownley, B.H.; Weller, D.M. & Thomashow, L.S. 1992. Influence of *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Phytopathology* **82**: 178-184
- Palmitter, D.H. & Keitt, G.W. 1936. Progress of studies of eradicant fungicides in relation to apple scab control. *Phytopathology* **26**: 103-104
- Papadopoulou, K.; Melton, R.E.; Leggett, M.; Daniels M.J. & Osbourn, A.E. 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *PNAS* **96**: 1923-1928
- Paré, J.R.J.; Bélanger, J.M.R. & Stafford, S.S. 1994. Microwave-assisted process (MAPTM): A new tool for the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry* **13**: 176-184
- Parr, J.F. & Papendick, R.I. 1978. Factors effecting the decomposition of crop residues by micro-organisms. In: Crop residue management systems. Oschwald, W.R. (eds.). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. **pp**: 101-129
- Paul, V. 1981. Zur Biologie von *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, dem Erreger des Apfelschorfes. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* **34**: 60-74
- Pennycook, S.R. & Newhook, F.J. 1981. Seasonal-changes in the apple phylloplane microflora. *New Zealand Journal of Botany* **19** (3): 273-283
- Pfeiffer, B.; Alt, S.; Schulz, C.; Hein, B.; Häfner, C. & und Kollar, A. 2004. Investigations on alternative substances for control of apple scab - results from sanitation trials. In: Boos, Markus (Hrsg.). Ecofruit - 11th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from 3rd February to 5th February 2004 at Weinsberg/Germany. **pp**. 79-84
- Peiffer, B. 2001. Alternativen zu Kupfer im ökologischen Obstbau- Prüfung von Pflanzenextrakten. In: Kupfer als Pflanzenschutzmittel- Zielstellung und Ergebnisse seit dem 1. Kupferfachgespräch. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig. **pp**. 21-26
- Philion, V.; Carisse, O. & Paulitz, T. 1997. *In vitro* evaluation of fungal isolates for their ability to influence leaf rheology, production of pseudothecia, and ascospores of *Venturia inaequalis*. *European Journal of Plant Pathology* **103**: 441-452
- Pierce, T.G. 1978. Gut contents of some lumbricid earthworms. *Pedobiologia* **18**: 153-157
- Porsche, F.M. & Kollar, A. 2014. Abschließende Ergebnisse alternativer Maßnahmen und Verfahren zur Apfelschorfbekämpfung. Fachgespräch Kupfer als Pflanzenschutzmittel, Berichte aus dem Julius Kühn-Institut, in press, Berlin-Dahlem
- Proestos, C. & Komaitis, M. 2008. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *Food Science and Technology* **41** (4): 652-659.

- Punja, Z.K. & Utkhede, R.S. 2003. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. *TRENDS in Biotechnology* **21(9)**: 400-407
- Purahong, W.; Lerstaveesin, P. & Ampornpan, L.A. 2010. Succession of fungi associated with decomposition of leaf litter in tropical evergreen forest (north-eastern Thailand). *Polish Journal of Ecology* **58**: 569-576
- Qasba, G.N. & Shah, A.M. 1981. *In vitro* efficacy of some fungicides on inhibition of ascospore discharge in *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint. *Current Science* **51**: 279-280
- Raaijmakers, J.M.; Vlami, M. & de Souza, J.T. 2002. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of general and molecular Microbiology* **81 (1-4)**: 537-547
- Raw, F. 1962. Studies of earthworm populations in orchards. I. leaf burial in apple orchards. *Annual Applied Biology* **50**: 389-404
- Reznicek, G.; Jurenitsch, J.; Kubelka, W.; Michl, G.; Korhammer, S. & Haslinger, E. 1990. Isolierung und Struktur der vier Hauptsaponine aus *Solidago gigantea* var. *serotia*. *Liebigs Annalen der Chemie* **1990 (10)**: 989-994
- Ribero, L.S.; Bocchini, D.A.; Martins, E.D.S.; Silva, D.; Gomes, E. & Da Silva, R. 2007. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **137**: 281-288
- 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
- Ross, R.G. & Hamlin, S.A. 1962. Production of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. on sterile apple leaf discs. *Canadian Journal of Botany* **40**: 629-935
- Ross, R.G. 1961. The effect of certain elements, with emphasis to nitrogen, on the production of perithecia of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Canadian Journal of Botany* **39**: 731-739
- Roßberg, D. 2007. NEPTUN oder "Wie oft wird gespritzt". *Gesunde Pflanzen* **59**: 55-65
- Rüdiger, F. M. & Kollar, A. 2012. Neue Strategien zur Apfelschorfbekämpfung im Falllaub - eine Übersicht der aktuellen Forschungsergebnisse. 58. Deutsche Pflanzenschutztagung, 10. - 14. September, Braunschweig, *Julius-Kühn-Archiv* **438**: 170
- Rüdiger, F.M.; Nietsch, N.; Pfeiffer, B. & Kollar, A. 2012 a. 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, Fördergemeinschaft Ökologischer Obstbau e.V. Weinsberg. pp. 239-244
- Rüdiger, F.M.; Nietsch, N.; Pfeiffer, B. & Kollar, A. 2012 b. Erforschung und Entwicklung alternativer Mittelzubereitungen für die Apfelschorfbekämpfung im Falllaub. *Berichte aus dem Julius Kühn-Institut* **164**: 73-78
- Rudloff, C. F. & Schmidt, M. 1935. Der Erreger des Apfelschorfes, *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. Grundlagen und Möglichkeiten für seine Bekämpfung züchterischem Wege. I. *Der Züchter* **7 (2)**: 30-37
- 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**: 825-831
- Saligkarias, I.D.; Gravanis, F.T. & Epton, H.A.S. 2002. Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: II. a study on mode of action. *Biological Control* **25**: 151-161

- Salmon, E.S. & Ware, W.M. 1931. A new fact in the life-history of the apple scab fungus. *Gardener's Chronicle* **89**: 437-438
- Sarniguet, A.; Kraus, J.; Henkels, M.D.; Muehlchen, A.M. & Loper, J.E. 1995. The sigma factor sigma (S) affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **92**: 12255–12259.
- Satchell J.E. 1967. Lumbricidae. In: Burgess, A. & Raw, F. (eds.). *Soil Biology*. Academic Press N.Y. pp. 259–322
- Schabel, E.L. & Jones, A.L. 1999. Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards. *Applied and Environmental Microbiology* **65** (11): 4898-4907
- Schwabe, W.F.S. 1979. Changes in the scab susceptibility of apple leaves as influenced by age. *Phytophylactica* **11**: 53-56
- Schwarzbach, A. 2004. Vergleichende Untersuchungen zum Saponingehalt von *Asparagus officinalis*. Dissertation. Technische Universität Berlin
- Shanahan, P.; O'Sullivan, D.J.; Simpson, P.; Glennon, J.D. & O'Gara, F. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied Environmental Microbiology* **58**: 353–358.
- Sharma, A.; Sati, S. C.; Sati, O.M.; Sati, M.D.; Kothiyal, S.K.; Semwal, D.K. & Mehta, A. 2013. A new triterpenoid saponin and antimicrobial activity of ethanolic extract from *Sapindus mukorossi* Gaertn. *Journal of Chemistry* Article Number: **218510**
- Sharma, O.P.; Kumar, N.; Singh, B. & Bhat, T.K. 2012. An improved method for thin layer chromatographic analysis of saponins. *Food Chemistry* **132**: 671-674
- Sharma, U.K., Sharma, K.; Sharma, N.; Sharma, A.; Singh, H.P. & Sinha, A.K. 2008. Microwave-Assisted efficient extraction of different parts of *Hippophae rhamnoides* for the comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 374-379
- Shimoyamada, M.; Okubo, K.; Yoshikoshi, M. & Watanabe, K. 1995. Partition of soybean saponins between butanol and water. *Food Science and Technology International* **1** (2): 112-114
- Shimoyamada, M.; Kudo, S.; Okubo, K.; Yamauchi, F. & Harada, K. 1990. Distributions of saponin constituents in some varieties of soybean plant. *Agricultural and Biological Chemistry* **54** (1): 77-81
- Silo-Suh, L.A.; Lethbridge, B.J.; Raffel, S.I.; He, H.Y.; Clardy, J. & Handelsman, J. 1994. Biological-activities of 2 fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Applied Environmental Microbiology* **60**: 2023–2030
- Sinsabaugh, R. L. ; Carreiro, M. M. & Alvarez, S. 2002. Enzyme and microbial dynamics of litter decomposition. In Burns, R. G. & Dick, R. P. (eds.) *Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications*. Marcel Dekker Inc., New York. pp. 249-265
- Smith, B.L. & Carpentier, M.-H. 1993. *The Microwave Engineering Handbook - Microwave Systems and Applications*. Chapman & Hall, London.
- Smith, C.A. & MacHardy, W.E. 1991. Ascospore productivity of *Venturia inaequalis* and the buildup of scab on nine apple cultivars. *Phytopathology* **81** (1): 124
- Snajdr, J.; Cajtham, T.; Valášková, V.; Petránková, M.; Spetz, P.; Leppänen, K. & Baldrian, P. 2011. Transformation of *Quercus petraea* litter: successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology* **75** (2): 291-303

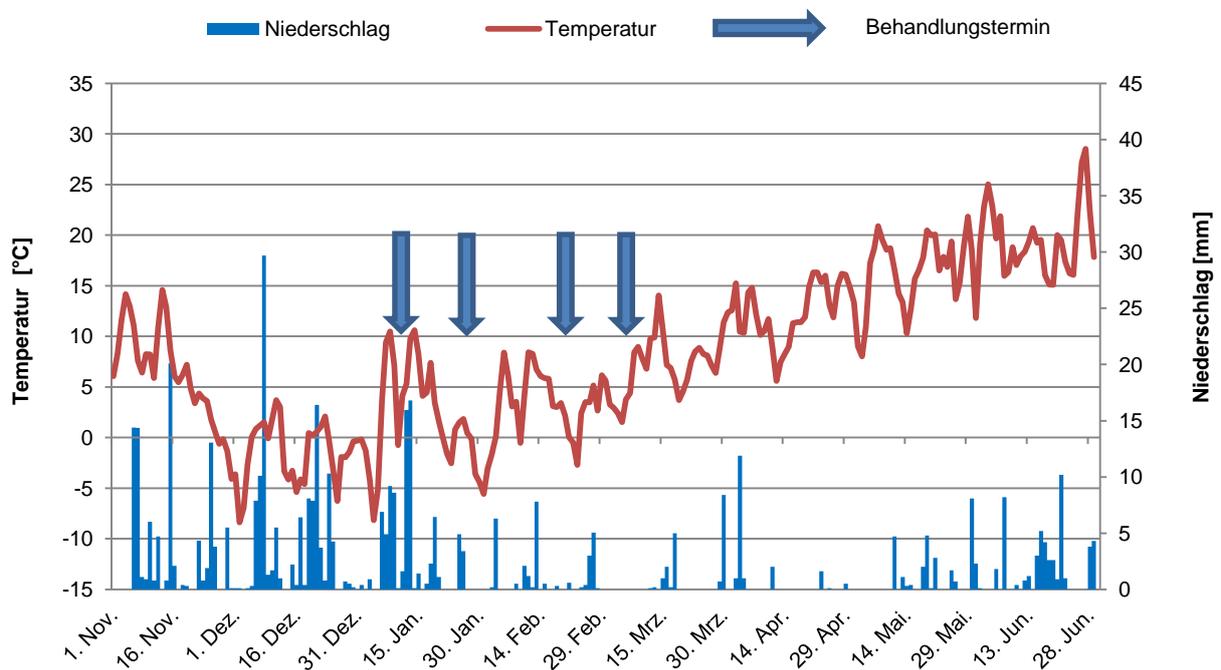
- Solecka, J.; Zajko, J.; Postek, M. & Rajnisz, A. 2012. Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Central European Journal of Biology* **7** (3): 373-390
- Sparg, S. G.; Light, M. E. & van Staden, J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology* **94**: 219-243
- Späth, S. 2000. Versuche an Apfelsämlingen zur Regulierung von Apfelschorf *Venturia inaequalis* (Cooke). Aderhold im ökologischen Landbau. Diplomarbeit. FH Nürtingen
- Stahl, E. 1967. Dünnschicht-Chromatographie: Ein Laboratoriumshandbuch. Springer Verlag
- Studt, H.G. 1975. Apfelschorf, *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter-Untersuchungen zur Sporulation und zur Entwicklung von Bekämpfungsverfahren im mediterranen Klimabereich. Dissertation. Universität Bonn
- Sutton, D.K. & MacHardy, W.E. 1993. The reduction of ascospore inoculum of *Venturia inaequalis* by orchard sanitation. *Phytopathology* **83**: 247
- Swift, M.J. 1976. Species diversity and the structure of microbial communities in terrestrial habitats. In Anderson, J.M. & Macfayden, A. (eds.). *The Role of Terrestrial and Aquatic Organisms in Decomposition Process*. Blackwell, Oxford. pp. 185-122
- Szakiel, A.; Paczkowski, C. & Henry, M. 2011 a. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews* **10** (4): 471-491
- 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
- Tagliavini, M.; Tonon, G.; Scandellari, F.; Quinones, A.; Palmieri, S.; Menarbin, G.; Gioacchini, P.; Masia, A. 2007. Nutrient recycling during the decomposition of apple leaves (*Malus domestica*) and mowed grasses in an orchard. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **118**: 191-200
- Tamura, Y.; Miyakoshi, M. & Yamamoto, M. 2012. Application of saponin-containing plants in foods and cosmetics. In Sakagami, H. (eds.). *Complementary and Alternative Medicine*, InTech
- Thrane, C.; Lubeck, M. & Green, H. 1995. A tool for monitoring *Trichoderma harzianum*. 1. Transformation with the GUS gene by protoplast technology. *Phytopathology* **85** (11): 1428-1435
- Tillett, D. & Neilan, B.A. 2000: Xanthogenate nucleic acid isolation from cultured and environmental cyanobacteria. *Journal of Phycology* **36**: 251-258
- Tomashow, L.S. & Weller, D.M. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control. Mechanisms and antifungal metabolites. In: Stacy, G. & Keen, N.T. (eds.), *Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1. Chapman & Hall, New York. pp. 187-236
- Triloff, P. 2006. Das Laub-Saugen: ein neues Werkzeug in der modernen Schorfbekämpfung? *Obstbau* **2** : 96
- tSaoir, S. M.; Cooke, L. R. & Mc Cracken, A. R. 2010. The effects of leaf litter treatments, post-harvest urea and omission of early season fungicide sprays on the overwintering of apple scab on Bramley's Seedling grown in a maritime environment. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* **49** (1): 55-66
- Tschetsche, R. & Wulf, G. 1973. Biologie und Chemie der Saponine. In Herz, W.; Griesebach, H. & Kirby, G.W. (eds.) *Fortschritte in der Chemie organischer Naturstoffe*. Springer-Verlag. pp. 462-668
- Tshomo, K.; Walter, M.; Steward, A. & Jaspers, M.V. 2003. *In vitro* evaluation of fungal isolates and nutrient amendments for enhancing apple leaf decay. *New Zealand Plant Protection* **56** : 90-94

- Umio, S.; Kamimura, T.; Kamishita, T. & Mine, Y. 1987. Antifungal composition employing pyrrolnitrin in combination with an imidiazol compound. US Patent 4,636, 520. *Official Gazette of the United States Patent and Trademark Office Patents* **1074 (2)**: 1067-1068
- Upadhyay, A. & Srivastava, S.; 2008. Characterization of a new isolate of *Pseudomonas fluorescens* strain Psd as a potential biocontrol agent. *Letters in Applied Microbiology* **47**: 98-105
- Urbanek, H., Zalewskasobczak, J. & Borowinska, A. 1978. Solation and properties of extracellular cellulose-hemicellulase complex of *Phoma hibernica*. *Archives of Microbiology* **118 (3)**: 265-269
- Valaskova, V.; de Boer, W.; Gunnewiek, P.J.A.K.; Pospisek, M. & Baldrian, P. 2009. Phylogenetic composition and properties of bacteria coexisting with the fungus *Hypholoma fasciculare* in decaying wood. *ISME Journal* **3**: 1218-1221
- Valenzuela, E; Leiva, S. & Godoy, R. 2001. Seasonal variation and enzymatic potential of microfungi associated with the decomposition of *Nothofagus pumilio* leaf litter. *Revista Chilena de historia natural* **74 (4)**: 737-749
- Ventura, M.; Scandellari, F.; Bonora, E. & Tagliavini, M. 2010. Nutrient release during decomposition of leaf litter in a peach (*Prunus persica* L.) orchard. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **87**:115–125
- Vincent, C.; Rancourt, B. & Carisse, O. 2004. Apple leaf shredding as a non-chemical tool to manage apple scab and spotted tentiform leafminer. *Agriculture Ecosystems & Environment* **104 (3)**: 595-604
- Vincken, J.-P.; Heng, L.; de Groot, A. & Gruppen, H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **68**: 275-297
- Voříšková, J. & Baldrian, P. 2013. Fungal community on decomposing leaf litter undergoes rapid successional changes. *ISME Journal* **7 (3)**: 477-486
- Vukovits, G. 1980. Obstkrankheiten. Erkennung, Ursachen und Bekämpfung. Teil II. Kernobst. Leopold Stocker Verlag, Graz
- Waldner, W. 2013. Prognosefruit 2013 Prague, Czech Republic, 8-10 August 2013. *Obstbau Weinbau* **7/8**: 221-226
- Wallace, E. 1913. Scab disease of apples. Cornell University, *Agricultural Experiment Station Bulletin* **335**: 545-624
- Wassermann, O. 1969. Untersuchungen über den abiotischen Einfluss von Bakterien und Pilzen auf das Wachstum von *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. in vitro. *Zentralblatt für Bakteriologie* **123**:30-55
- Watzl, B. 2001. Saponine- Charakteristik, Vorkommen, Aufnahme, Stoffwechsel, Wirkungen. *Ernährung-Umschau* **48 (6)**: 251-253
- Whetzel, H.H. 1910. Report of the comitee on plant diseases. *New York State Fruit Growers Association Report*: 19-20
- Wickerham, L. J. & Burton, K. A. 1948. Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. *Journal of Bacteriology* **56**: 393–371
- Wiesmann, R. 1935. Untersuchungen ueber die Bedeutung der Ascosporen (Wintersporen) und der Konidien an den schorfigen Trieben fur die Entsteheung der Primärfektionen des Apfelschorfpilzes *Fusicladium dendriticum*. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz* **1935**: 147-175
- Wiesmann, R. 1932. Untersuchungen über die Überwinterung des Apfelschorfpilzes *Fusicladium dendriticum* (Wallr.) Fckl. im toten Blatt sowie die Ausbreitung der Sommersporen (Konidien) des Apfelschorfpilzes. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz* **36**: 620-679
- Wilson, E.E. 1928. Studies of the development of the ascigerous stage of *Venturia inaequalis* (Vke) Wint. in relation to certain factors of the environment. *Phytopathology* **18**: 375-417

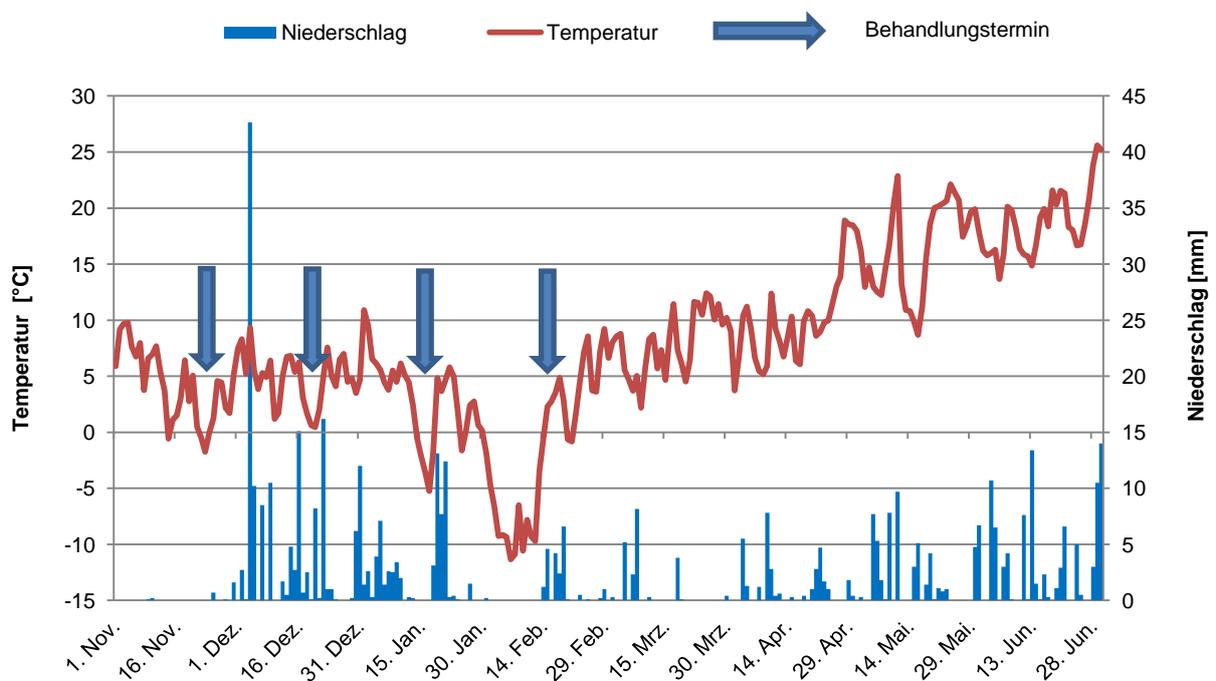
- Wittich, W. 1953. Untersuchungen über den Verlauf der Streuerersetzung auf einem Boden mit starker Regenwurm Tätigkeit. *Schriftreihe Forstwirtschaftliche Fakultät Göttingen* **9**: 5-33
- Wong, H.C. & Wang, P. 2004. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology* **96** (2): 359-366
- Wood, D.W.; Gong, F.; Daykin, M.M.; Williams, P. & Pierson, L.S. 1997. N-Acyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30–84 in the wheat rhizosphere. *Journal of Bacteriology* **179**: 7663–7670
- Wright, M.A. 1972. Factors governing ingestion by the earthworm *Lumbricus terrestris* with special reference to apple leaves. *Annals of Applied Biology* **70** (2): 175–188
- Yang, M.M.; Mavrodi, D.V.; Mavrodi, D.V.; Bonsall, R.F.; Parejko, J.A.; Paulitz, T.C.; Tomashow, L.S.; Yang, H.T.; Weller, D.M. & Guo, J.H. 2011. Biological control of take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields. *Phytopathology* **101** (12): 1481-1491
- Yashiro, E.; Spear, R.N. & McManus 2011. Culture-dependent and culture-independent assessment of bacteria in the apple phyllosphere. *Journal of Applied Microbiology* **110**: 1284-1296
- Young, C.S. & Andrews, J.H. 1990. Inhibition of pseudothecial development of *Venturia inaequalis* by the basidiomycete *Athelia bombacina* in apple leaf litter. *Phytopathology* **80**: 536-542
- Zhang, F., Yang, Y.; Su, P. & Guo, Z. 2009. Microwave-assisted extraction of rutin and quercetin from the stalks of *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Phytochemical Analysis* **20**: 33-37.
- Zhang, H. & Cheng, Y. 2006. Solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of saponins in a Chinese patent medicine of formulated *Salvia miltiorrhizae* and *Panax notoginseng*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40**: 429-432
- Zhang, J.-D.; Cao, Y.-B.; Xu, Z.; Sun, H.-H.; An, M.-M.; Yan, L.; Chen, H.-S.; Gao, P.-H.; Wang, Y.; Jia, X.-M. & Jiang, Y.-Y. 2005. In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **28**: 2211–2215.
- Zhou, P.; Mocek, U.; Seisel, B. & Floss, H.G. 1992. Biosynthesis of Pyrrolnitrin. Incorporation of <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N-double-labelled D- and L-tryptophan. *Journal of Basic Microbiology* **32**: 209-214
- Zirbes, L.; Mescher, M.; Vrancken, V.; Wathélet, J. P.; Verheggen, F. J.; Thonart, P. & Haubruge, E. 2011. Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil. *PLOS ONE* **6** (7): 1-7

## 7. Anhang

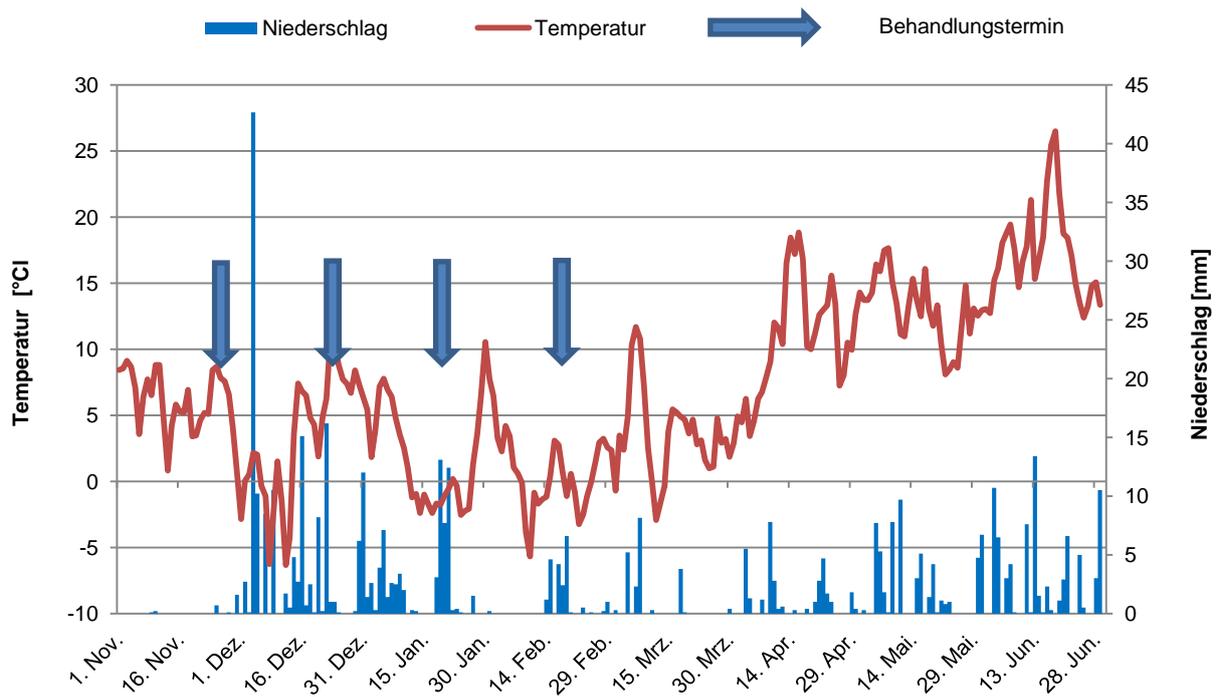
### 7.1. Wetterdaten



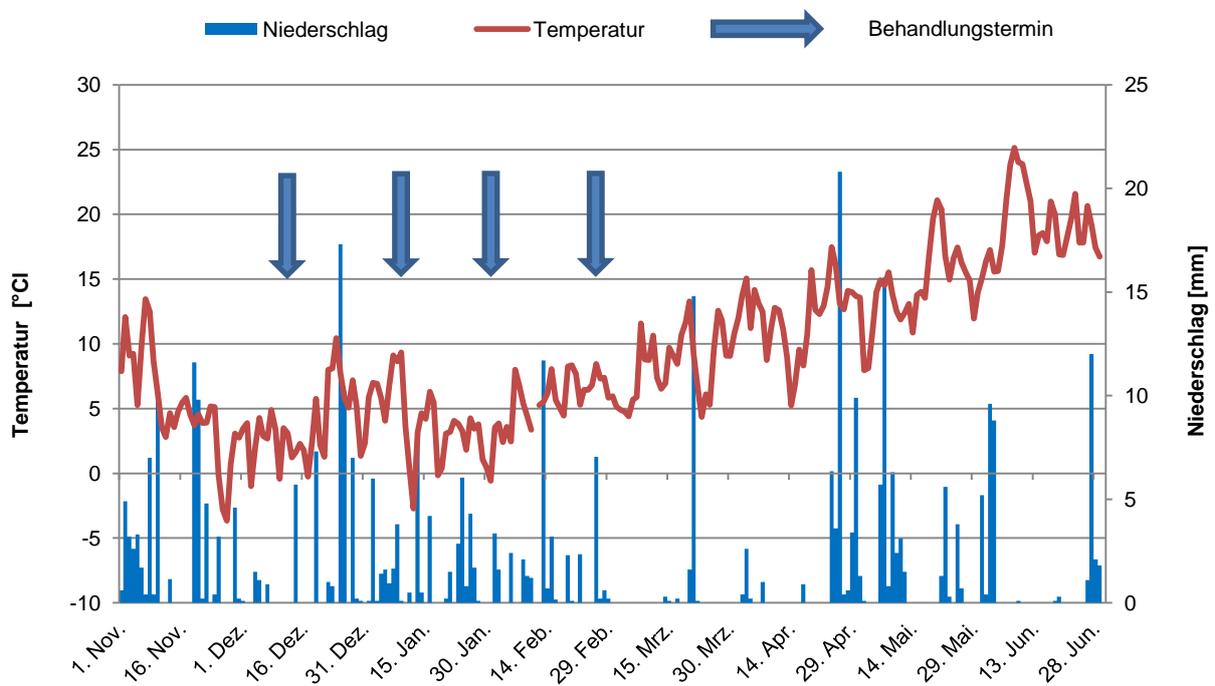
**Abb. 7.1.1:** Temperatur-Niederschlagsdiagramm für den Zeitraum der Falllaubbehandlung und die Schorfprimärsaison 2010/2011



**Abb. 7.1.2:** Temperatur-Niederschlagsdiagramm für den Zeitraum der Falllaubbehandlung und die Schorfprimärsaison 2011/2012

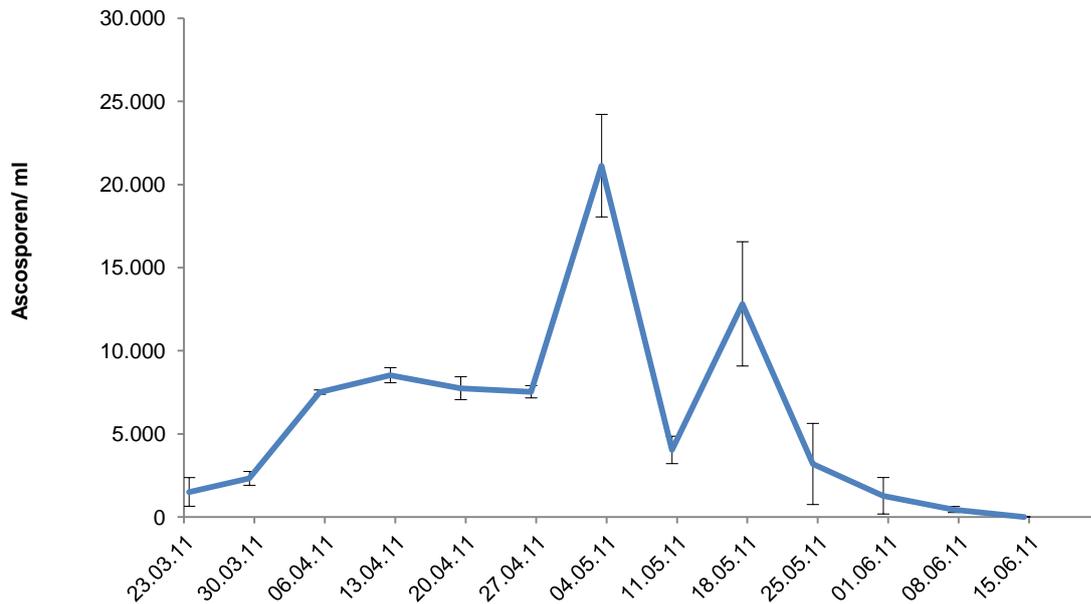


**Abb. 7.1.3:** Temperatur-Niederschlagsdiagramm für den Zeitraum der Falllaubbehandlung und die Schorfprimärsaison 2012/2013

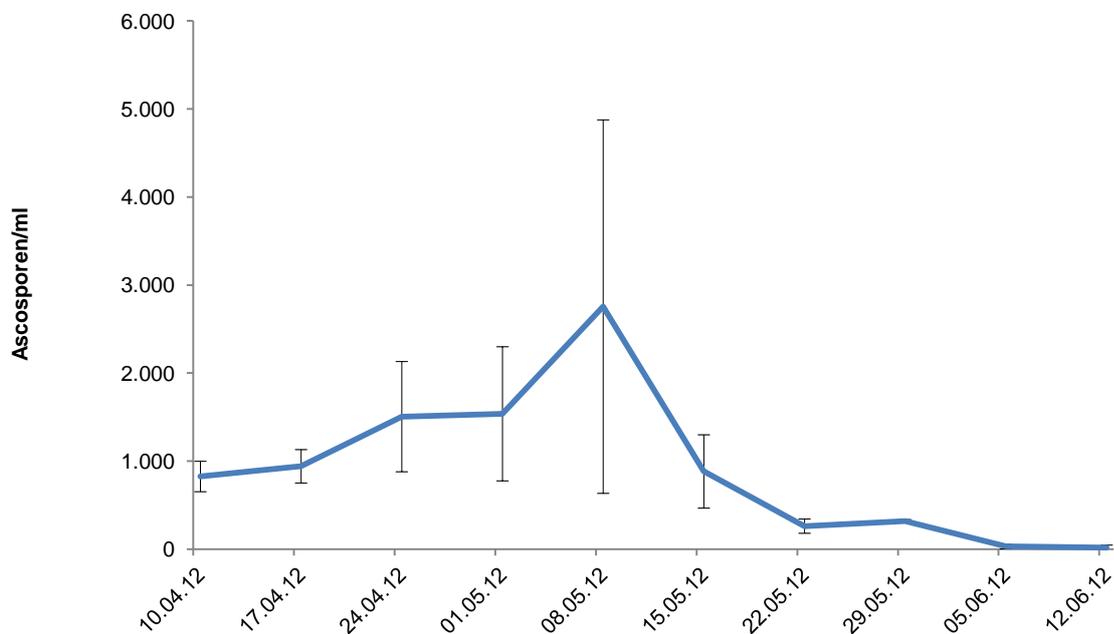


**Abb. 7.1.4:** Temperatur-Niederschlagsdiagramm für den Zeitraum der Falllaubbehandlung und die Schorfprimärsaison 2013/2014

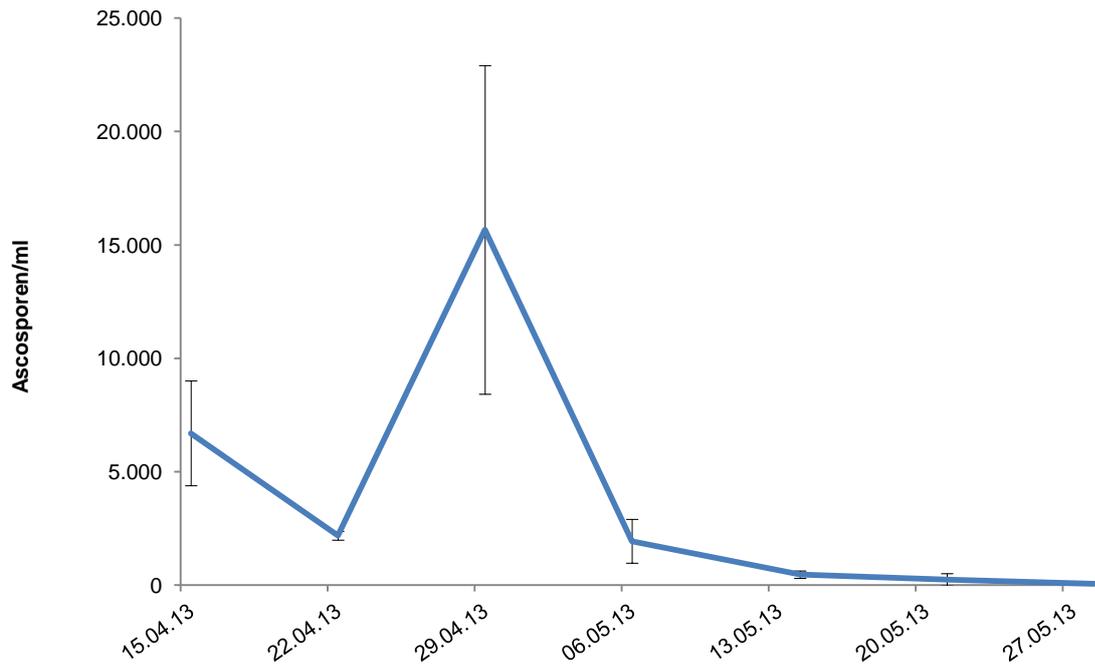
## 7.2. Ascosporenpotenzial 2011-2014 in Dossenheim



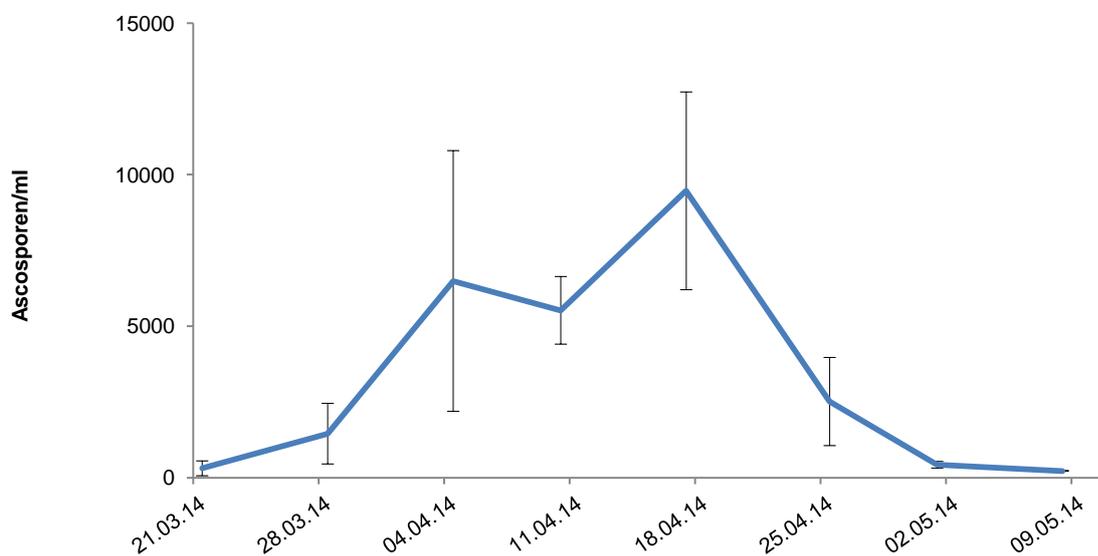
**Abb. 7.2.1:** Entwicklung des Ascosporenpotenzials der unbehandelten Kontrolle in 2011



**Abb. 7.2.2:** Entwicklung des Ascosporenpotenzials der unbehandelten Kontrolle in 2012

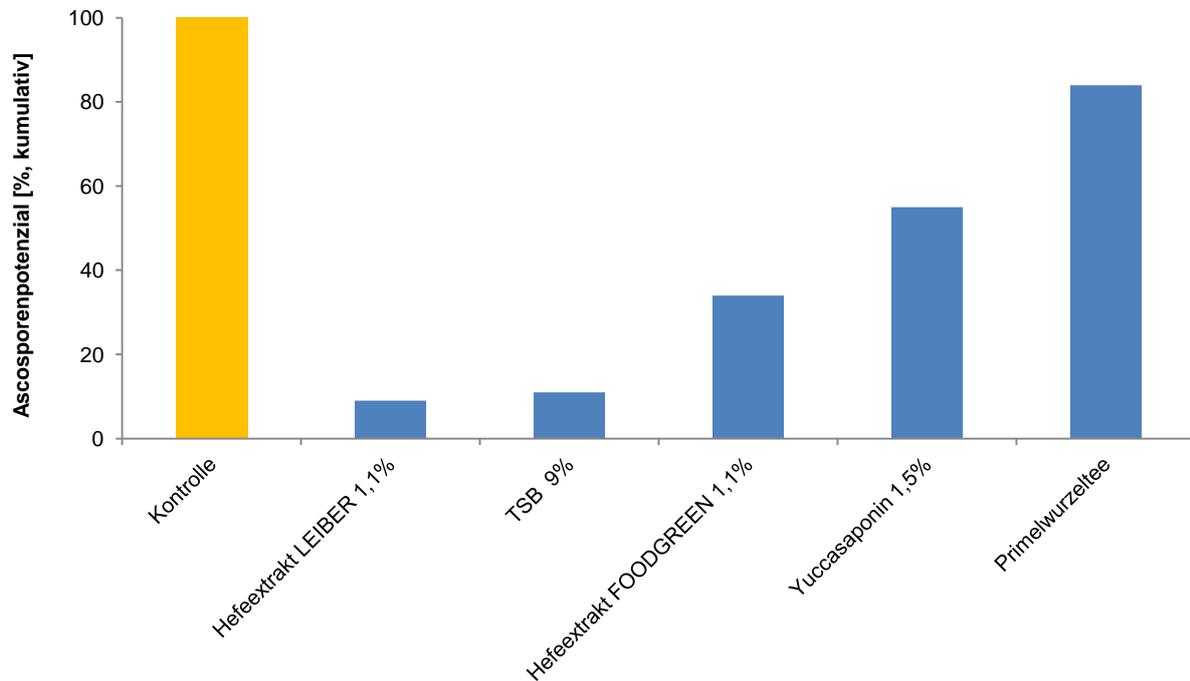


**Abb. 7.2.3.:** Entwicklung des Ascosporenpotenzials der unbehandelten Kontrolle in 2013

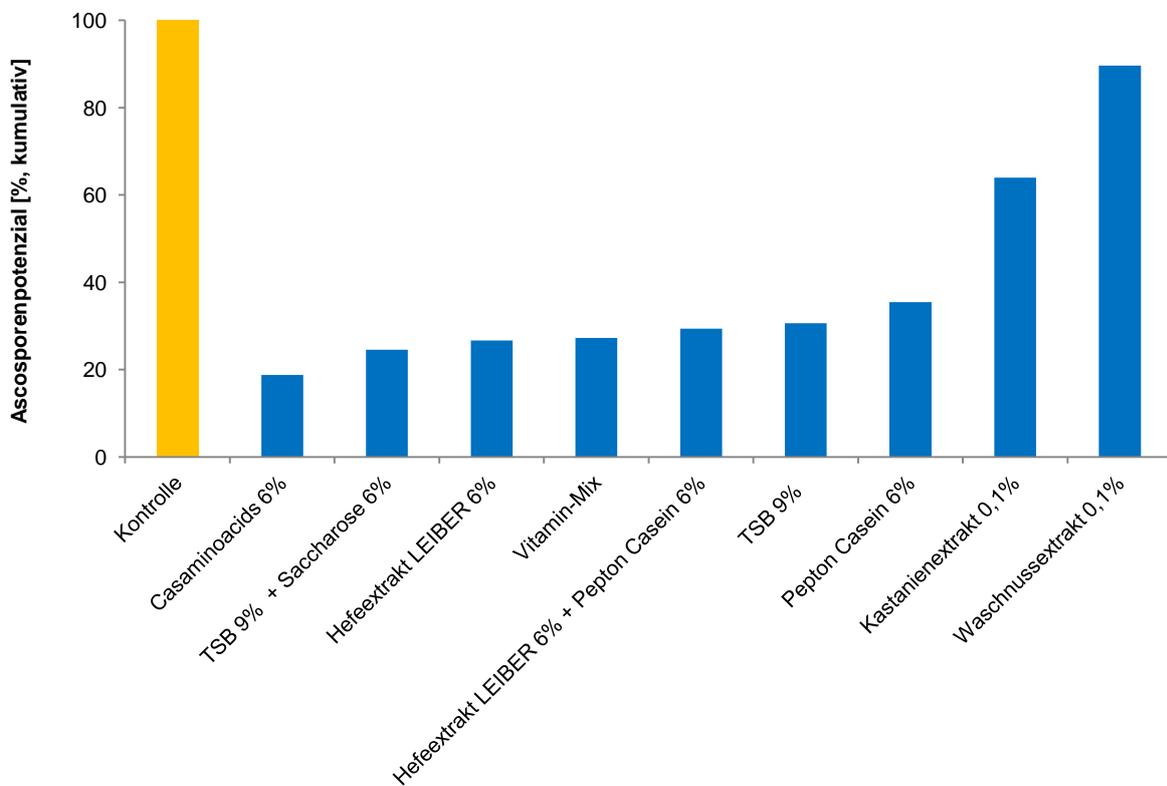


**Abb. 7.2.4:** Entwicklung des Ascosporenpotenzials der unbehandelten Kontrolle in 2014

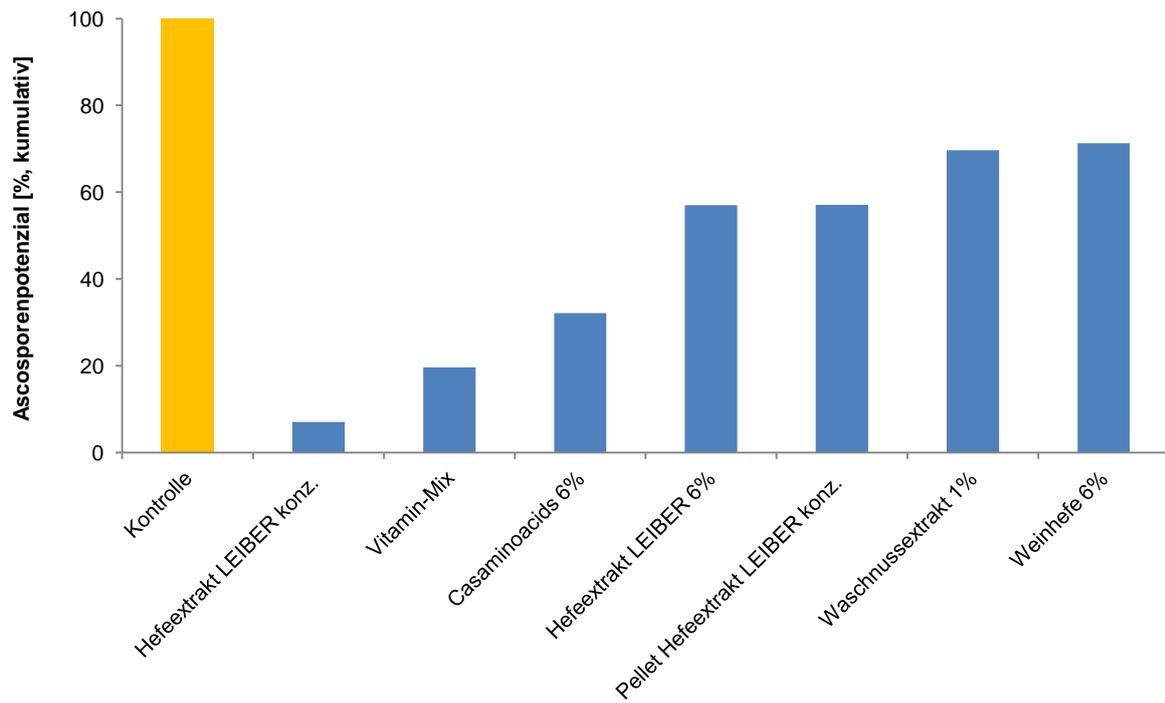
### 7.3. Ascosporenpotenzial der Falllaubdepots 2011-2013 in Weinsberg



**Abb. 7.3.1:** Kumulatives Ascosporenpotenzial der behandelten Falllaubdepots in Weinsberg 2011

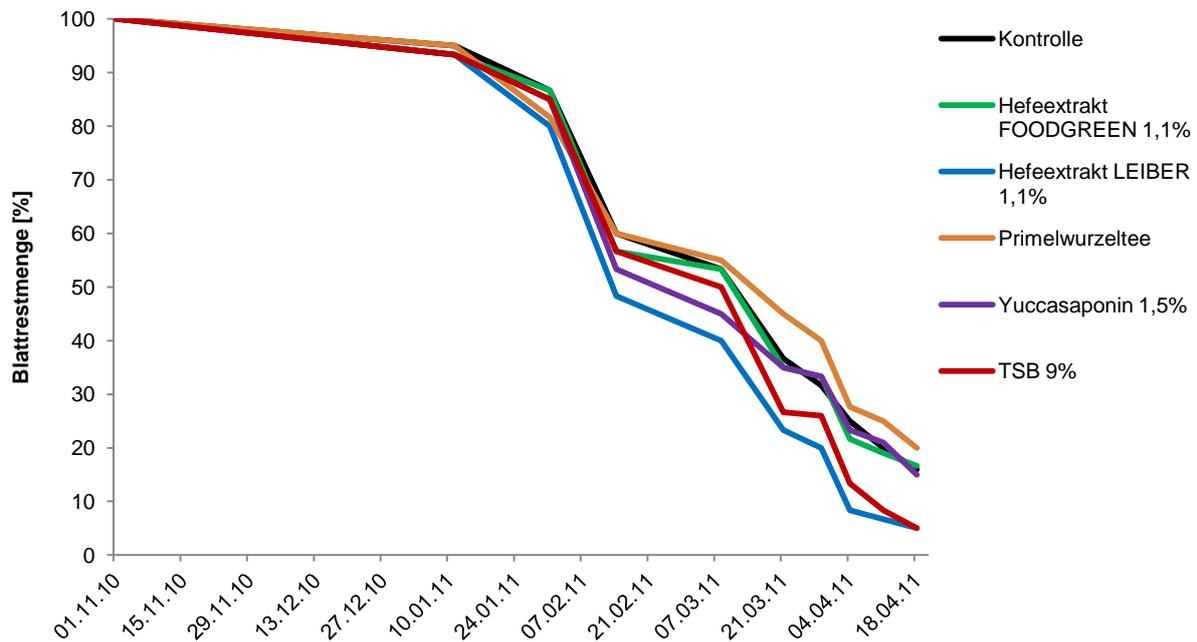


**Abb. 7.3.2:** Kumulatives Ascosporenpotenzial der behandelten Falllaubdepots in Weinsberg 2012

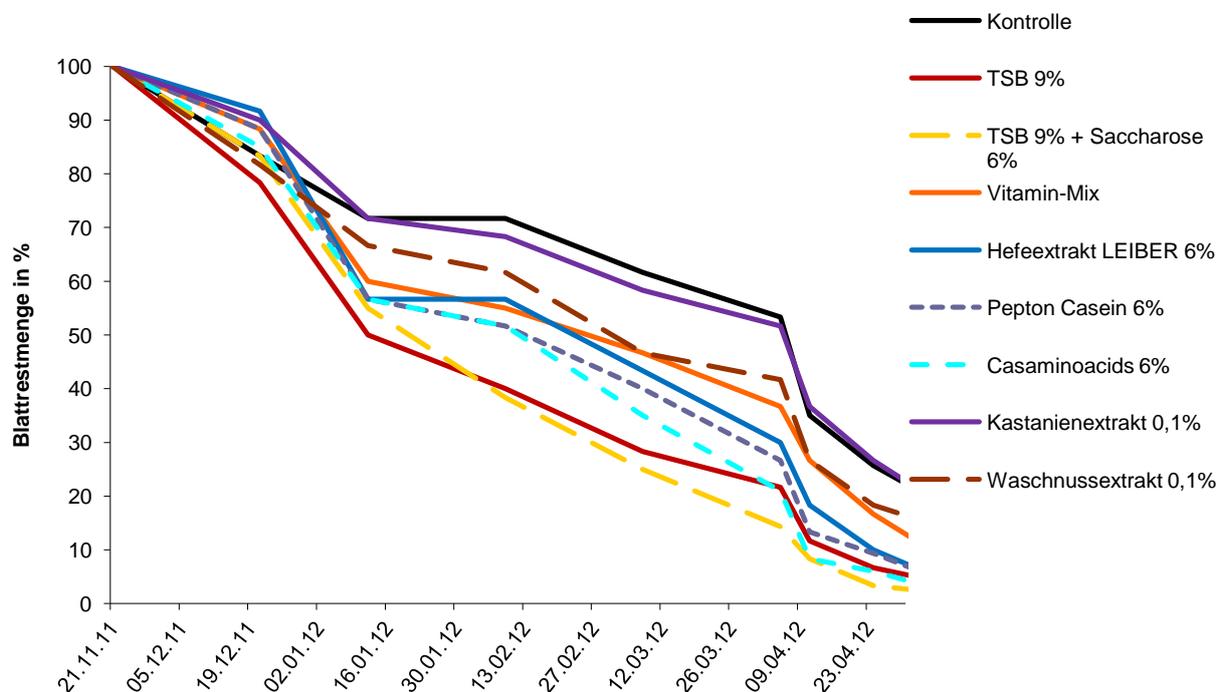


**Abb. 7.3.3:** Kumulatives Ascosporenpotenzial der behandelten Falllaubdepots in Weinsberg 2013

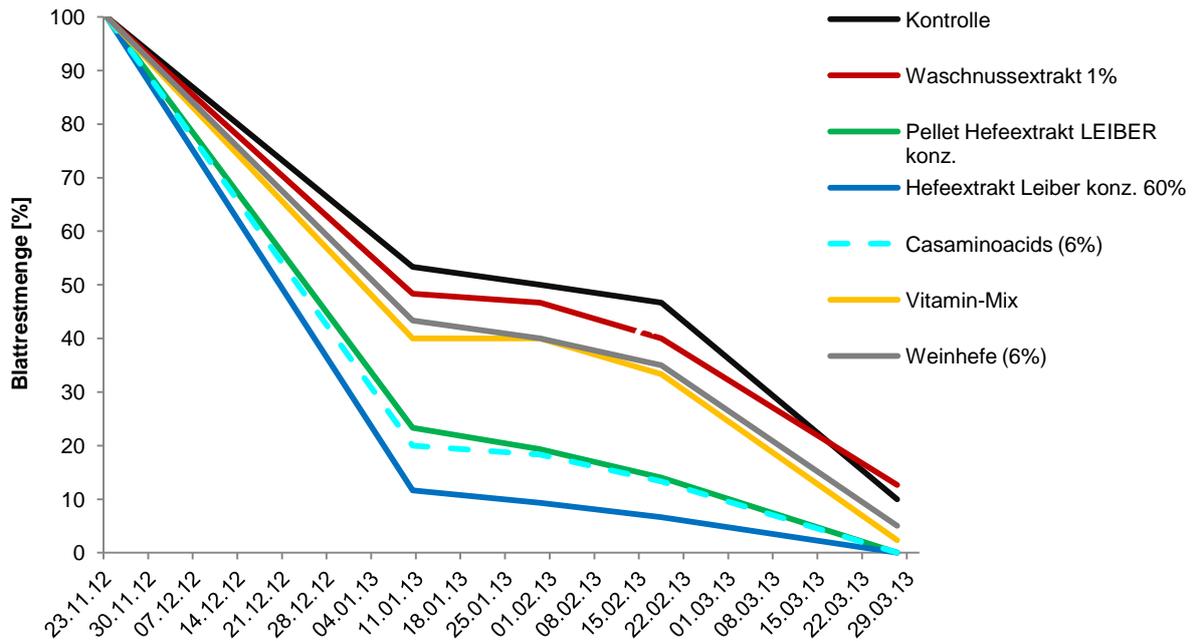
#### 7.4. Falllaubabbau 2011-2014 in Weinsberg



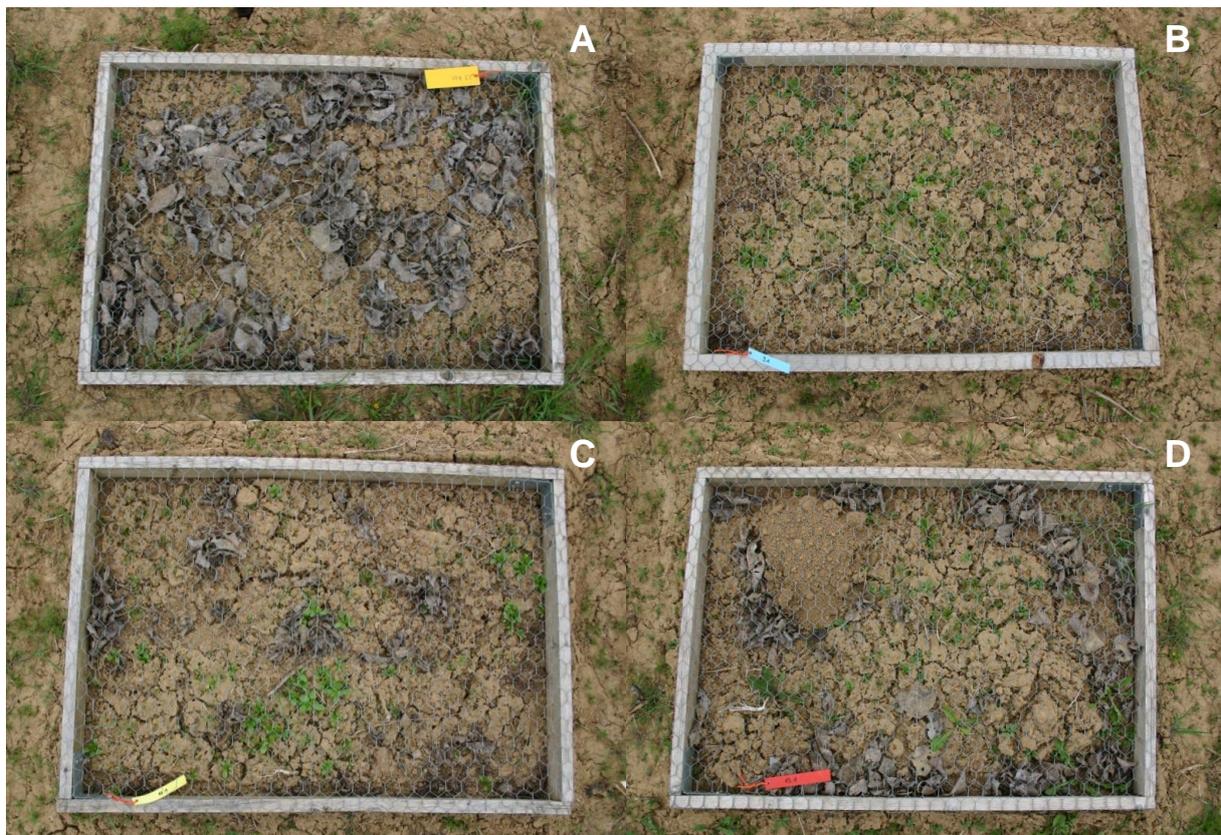
**Abb. 7.4.1:** Falllaubabbau in Weinsberg in 2011, Behandlungen erfolgten am 17.01.2011, 23.02.2012 und 25.03.2011



**Abb. 7.4.2:** Falllaubabbau in Weinsberg in 2012, Behandlungen erfolgten am 25.11.2011, 12.01./16.01.2011, 05.03.2012 und 22.03.2012



**Abb. 7.4.3:** Falllaubabbau in Weinsberg in 2013, Behandlungen erfolgten am 23.11.2012; 08.01.2013; 13.2.2013 und 22.3.13



**Abb. 7.5.1:** Blattabbau in Weinsberg am 16.04.2012, Behandlungen des Falllaubs erfolgten am 25.11.2011, 12.01./16.01.2011, 05.03.2012 und 22.03.2012  
 A) Kontrolle, B) Hefeextrakt Leiber 6%, C) Casaminoacids 6% und D) Waschnussextrakt 0,1%

Variante/Termin	30.01.13	18.02.13	08.03.13	22.03.13
<b>Kontrolle</b>				
<b>Waschnuss- extrakt 1%</b>				
<b>Pellet Hefeextrakt LEIBER konz.</b>				
<b>Hefeextrakt LEIBER 6 %</b>				
<b>Hefeextrakt LEIBER konz.</b>				
<b>Casaminoacids 6%</b>				
<b>Vitamin-Mix</b>				

**Abb. 7.5.2:** Blattabbau in Weinsberg über den Zeitraum vom 30.01.13 bis 22.03.13, Behandlungen erfolgten am 23.11.2012, 08.01.2013, 13.2.2013

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

Dr. Andreas Kollar danke ich für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen. Seine fachliche Unterstützung und die anregenden Diskussionen waren eine große Hilfe für den Fortgang meines Projektes. Ich danke Ihm für die motivierende und professionelle Anleitung, für das Vertrauen, das er mir entgegenbrachte, sowie für seine offene Art, Lebensfreude und unendliche Geduld.

Prof. Dr. Dieter Treutter danke ich für seine Bereitschaft zur Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit meine Ergebnisse in seiner Vorlesung zu präsentieren.

Dr. Michael Fischer danke ich für die Übernahme des Koreferats und die Unterstützung in allen Fragen zur ITS-Sequenzierung.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Wilhelm Jelkmann, Institutsleiter am Julius Kühn-Institut für Obst-und Weinbau in Dossenheim, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Katja Ehlert, Tobias Mayer, Julian-Pascal Petras, Viola Greulich und Dorothee van Aken für die praktische Hilfe im Laboralltag, ein wunderschönes Arbeitsklima und die tolle Zeit, die ich mit euch erleben durfte.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen vom Julius Kühn-Institut Dossenheim für die freundliche Arbeitsatmosphäre und den wissenschaftlichen Austausch. Ein besonderer Dank gilt Dr. Annette Wensing für die Hilfe bei den MALDI-TOF-Messungen, Felix Hergenahn für die hingebungsvolle Pflege der Apfelsämlinge, sowie Dagmar d´Aguiar und Cornelia Dubois für die Unterstützung bei den Arbeiten zur ITS-Sequenzierung.

Dieter Loose danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für seine ideenreiche Diskussionsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann, meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Promotion unterstützt haben und meinen Stimmungsschwankungen in dieser Zeit tapfer stand gehalten haben.



