

Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Landwirtschaftliche Fakultät

USL

Lehr- und Forschungsschwerpunkt
„Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“

Forschungsbericht

Nr. 97

Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung

Verfasser:

Peter Blaeser, Ulrike Steiner, Heinz-W. Dehne

Institut für Pflanzenkrankheiten

Herausgeber: Lehr- und Forschungsschwerpunkt „Umweltverträgliche und Standortgerechte Landwirtschaft“, Landwirtschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Endenicher Allee 15, 53115 Bonn
Tel.: 0228 – 73 2297; Fax.: 0228 – 73 1776
www.usl.uni-bonn.de

Forschungsvorhaben im Auftrag des Ministeriums für Umwelt und Naturschutz, Landwirtschaft und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen
Bonn, November 2002

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. H.-W. Dehne
Priv.-Doz. Dr. U. Steiner

Projektbearbeiter: Dr. P. Blaeser

Institut für Pflanzenkrankheiten
Nussallee 9
53115 Bonn
Tel.: 0228 - 73 2444

Zitiervorschlag:

BLAESER, P., U. STEINER UND H.-W. DEHNE (2002): Pflanzeninhaltsstoffe mit fungizider Wirkung. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, 97, 143 Seiten.

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	8
2.1 Versuchspflanzen	8
2.1.1 Arten und Sorten	8
2.1.2 Pflanzenanzucht.....	8
2.2 Wirksubstanzen.....	9
2.2.1 Pflanzenschutzmittel	9
2.2.2 Resistenzinduktoren	9
2.3 Pflanzenextrakte	9
2.3.1 Pflanzenmaterial	9
2.3.2 Extraktionsverfahren	11
2.3.2.1 Herstellung von Rohextrakten.....	11
2.3.2.2 Herstellung von Extrakten mit der Soxhlet Apparatur.....	12
2.3.3 Ausbringung von Pflanzenextrakten	13
2.3.3.1 Applikationsverfahren	13
2.3.3.1.1 Spritzapplikation.....	13
2.3.3.1.2 Lokalapplikation auf Laubblätter und Pflanzenstengel.....	13
2.3.3.1.3 Wurzelapplikation	14
2.3.3.1.4 Saatgutapplikation	14
2.3.3.2 Formulierung	14
2.4 Pathogene.....	15
2.4.1 Erhaltung und Inokulation.....	16
2.4.1.1 <i>Phytophthora infestans</i>	16
2.4.1.2 <i>Plasmopara viticola</i>	17
2.4.1.3 <i>Uromyces phaseoli</i>	17
2.4.1.4 <i>Erysiphe graminis</i>	17
2.4.1.5 <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Microdochium nivale</i> , <i>Pythium</i> <i>ultimum</i> , <i>Cochliobolus sativus</i> und <i>Gaeumannomyces graminis</i>	18
2.4.2 Befallsbewertung.....	19

2.5 <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Wirksamkeit von Pflanzenextrakten	20
2.5.1 Myzelwachstumstest	20
2.5.1.1 Applikation der Extrakte auf Filterpapierscheiben	20
2.5.1.2 Applikation der Extrakte im Agar	21
2.5.2 Zoosporentlassung und indirekte Sporangienkeimung	21
2.5.3 Zoosporenbeweglichkeit	22
2.5.4 Zoosporenkeimung, Sporenkeimung.....	22
2.6 Pflanzenphysiologische Untersuchungen.....	23
2.6.1 Chlorophyllfluoreszenz	23
2.6.2 Gaswechsel.....	23
2.7 Mikroskopische Untersuchungen	24
2.7.1 Lichtmikroskopie.....	24
2.7.1.1 Herstellung von Totalpräparaten	24
2.7.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen	24
2.7.2.1 Herstellung von Schnittpräparaten	24
2.7.2.1.1 Probenaufbereitung.....	24
2.7.2.1.2 Herstellung der Ultradünnschnitte.....	26
2.7.2.1.3 Kontrastierung	26
2.7.3 Analytische Verfahren zur Isolierung und Identifizierung von Pflanzeninhalts- stoffen.....	26
2.7.4 Dünnschichtchromatographie.....	26
2.7.4.1 Biotest im Agardiffusionstest.....	27
2.7.4.2 Biochemische Detektionsmethoden	28
2.7.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	28
2.7.6 Gaschromatographie mit Massenspektroskopie (GC - MS).....	29
2.8 Freilandversuche.....	30
2.8.1 Kraut- und Braunfäule an Tomate.....	30
2.8.1.1 Versuchsanlage.....	30
2.8.1.2 Versuchsdurchführung	30
2.8.2 Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln	31
2.8.2.1 Versuchsanlage.....	31
2.8.2.2 Versuchsdurchführung	31

2.8.2.3 Ertragsermittlung.....	32
2.8.3 Grauschimmel an Erdbeere	32
2.8.3.1 Versuchsanlage.....	32
2.8.3.2 Versuchsdurchführung	32
2.8.4 Falscher Mehltau an Weinreben.....	33
2.8.4.1 Versuchsanlage.....	33
2.8.4.2 Versuchsdurchführung	33
2.9 Statistische Auswertung	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Vorkommen wirksamer Pflanzenextrakte	35
3.1.1 Einfluß von Pflanzenextrakten auf das Wachstum phytopathogener Pilze.....	35
3.1.1.1 Test mit Pflanzenextrakten auf Filterpapierscheiben	35
3.1.1.2 Tests mit Pflanzenextrakten in Agar	36
3.1.2 Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Entwicklung von pilzlichen Krankheiten	39
3.1.2.1 Kraut- und Braunfäule (<i>Phytophthora infestans</i>) an Tomate.....	39
3.1.2.2 Falscher Mehltau (<i>Plasmopara viticola</i>) an Weinreben	40
3.1.2.3 Bohnenrost (<i>Uromyces phaseoli</i>) an Bohne.....	41
3.1.2.4 Echter Mehltau (<i>Erysiphe graminis</i>) an Winterweizen.....	42
3.1.2.5 Grauschimmel (<i>Botrytis cinerea</i>) an Paprika	42
3.1.2.6 Dürrfleckenkrankheit (<i>Alternaria solani</i>) an Tomate	49
3.1.3 Vergleich der <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Wirksamkeit von Pflanzenextrakten	51
3.1.3.1 Wirksamkeit gegen <i>Alternaria solani</i>	51
3.1.3.2 Wirksamkeit gegen <i>Botrytis cinerea</i>	52
3.2 Wirksamkeit unter praktischen Anbaubedingungen.....	54
3.2.1 Kraut- und Braunfäule an Tomaten.....	54
3.2.2 Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln	55
3.2.3 Grauschimmel an Erdbeeren	57
3.2.4 Falscher Mehltau an Weinreben.....	58
3.3 Charakterisierung der Wirkung von Pflanzenextrakten.....	59
3.3.1 Protektive und kurative Wirkung	59

3.3.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung	66
3.3.3 Applikationsort und Systemizität	67
3.3.4 Fungizide bzw. fungistatische Wirkung	70
3.3.5 Einfluß der Formulierung auf die Wirksamkeit	71
3.3.6 Einfluß der Applikation auf den Stoffwechsel der Pflanzen	73
3.3.6.1 Einfluß von Pflanzenextrakten auf Photosyntheseleistung	73
3.3.6.2 Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Assimilation und Dissimilation ..	75
3.3.7 Einfluß auf die Entwicklungsstadien von pilzlichen Strukturen	75
3.3.7.1 Zoosporenentlassung	76
3.3.7.2 Zoosporenbeweglichkeit	78
3.3.7.3 Zoosporen- bzw. Sporenkeimung	79
3.3.7.4 Infektionsstrukturen auf der Blattoberfläche	84
3.3.7.5 Morphologische Veränderungen am Myzel	85
3.3.7.6 Cytologische Veränderungen am Myzel	88
3.4 Isolierung und Identifizierung wirksamer Substanzen	92
3.4.1 Optimierung des Extraktionsverfahrens	92
3.4.1.1 Einfluß des Extraktionsverfahrens auf die Wirksamkeit	92
3.4.1.2 Einfluß des Extraktionsmittels auf die Wirksamkeit	93
3.4.1.3 Einfluß der Extraktionstemperatur auf die Wirksamkeit	94
3.4.2 Überprüfung bekannter Inhaltsstoffe	95
3.4.3 Nachweis von wirksamen Fraktionen aus pflanzlichen Rohextrakten mittels	
Dünnschichtchromatographie und Biotest	98
3.4.4 Nachweis von Pflanzeninhaltsstoffen mittels Hochdruckflüssigkeits-	
chromatographie (HPLC)	101
3.4.5 Nachweis von Pflanzeninhaltsstoffen mittels Gaschromatographie und	
Massenspektroskopie (GC - MS)	102
4 Diskussion	105
5 Zusammenfassung	126
6 Literaturverzeichnis	129

1 Einleitung

Entscheidend für die Suche nach neuen Wirkstoffen sind neben der Bereicherung des Instrumentariums für den integrierten Pflanzenschutz auch die ständig steigenden Ansprüche an die aktiven Substanzen. Neben einem hohen Wirkniveau bei sehr geringen Aufwandsmengen erwartet man ein breites Wirkungsspektrum mit geringen bzw. keinen toxischen Nebenwirkungen auf die Kulturpflanze und 'Nicht-Zielorganismen'. Weiterhin soll ein hoher Sicherheitsgrad für Umwelt, Anwender und Endverbraucher gewährleistet sein (EVANS & LAWSON, 1992). Dies alles führt zu einem drastischen Anstieg der Entwicklungskosten für neue Produkte, die heute bis zu 250 Mio. DM pro Präparat betragen (OERKE *et al.* 1994).

Weiterhin machen die durch die Anwendung von Pflanzenschutzmitteln, vor allem durch die verstärkte Verwendung von systemischen Wirkstoffen, auftretenden Resistenzen eine Auffindung von Substanzen mit neuen Wirkmechanismen unumgänglich (EVANS & LAWSON, 1992). Neben dem Problem der Fungizidresistenzen bewirken auch die zunehmenden 'Lückenindikationen' eine steigende Nachfrage nach alternativen Problemlösungen. Ursachen für 'Lückenindikationen' sind unter anderem höhere Umweltauflagen und dadurch nicht mehr neu erteilte Zulassungen für Pflanzenschutzmittel (ZORNBACH, 1994). Weiterhin bewirken die ständig steigenden Produktionskosten von Pflanzenschutzmitteln, welche für Firmen eine Entwicklung neuer Präparate nur in großen Kulturen für Firmen lohnenswert machen, das Auftreten von Bekämpfungslücken.

Zu neuen Wirkstoffen führen grundsätzlich zwei Wege: die chemische Synthese und die Suche nach geeigneten Naturstoffen (PILLMOOR *et al.* 1993). Die chemische Synthese hat den Vorteil, daß sie meistens kostengünstiger ist und gut reproduzierbare Ergebnisse liefert. Weiterhin zeichnet sich die chemische Synthese durch ihre gute Zugänglichkeit von Derivaten aus. Ihre Nachteile liegen in der großen Anzahl von Syntheseprodukten, die geprüft werden müssen, um zu einem brauchbaren Pflanzenschutzmittel zu gelangen. Aber auch die schlechte Zugänglichkeit von komplexen Strukturen ist als Nachteil bekannt. Bei den Naturstoffen ist die Auffindungsrate geeigneter Substanzen etwas höher und die Zahl der möglichen Metabolite, wegen der Komplexität der Strukturen, praktisch unbegrenzt. Nachteile liegen in der oft schwierigen und teuren Herstellung, in der schlechten Zugänglichkeit von Derivaten sowie in der meist erschwerten Standardisierung des Ausgangsmaterials (ANKE & STEGLICH, 1988).

Auf der Welt gibt es mindestens 250 000 verschiedene Spezies von Pflanzen, von denen bis jetzt nur zehn Prozent ihrer Inhaltsstoffe auf eine Wirkung gegenüber Pflanzenkrankheiten und Schädlingen untersucht wurden. Einige dieser Substanzen, die aus Pflanzen isoliert wurden, können auch von Mikroorganismen produziert werden (BRENNER, 1993). Dennoch stellen die Inhaltsstoffe von Pflanzen eine ganz eigene Art an Substanzgruppen dar, welche ein wichtiges Argument für die Untersuchung von Pflanzeninhaltsstoffen sind (GORRIS & SMID, 1995). Nach ABELSON (1990) sind von den im Jahr 1985 3.500 weltweit neuentdeckten chemischen Strukturen über 70 Prozent der Substanzen aus höheren Pflanzen und Mikroorganismen isoliert. Hieraus wird deutlich, daß die in der Natur vorkommenden Pflanzeninhaltsstoffe eine noch weitgehend ungenutzte Quelle für wirksame Substanzen darstellen (FUGMANN *et al.* 1991, PILLMOOR *et al.* 1993, PLIMMER, 1993).

Die Diskrepanz zwischen der hohen Anzahl bekannter Naturstoffe und der geringen Anzahl kommerzieller Produkte auf Naturstoffbasis erklärt sich dadurch, daß Pflanzenmaterial häufig nicht in ausreichender Menge und meist nicht das ganze Jahr über verfügbar ist. Die Menge und Art pflanzlicher Inhaltsstoffe kann weiterhin stark von verschiedenen Umweltbedingungen beeinflußt werden. Außerdem ist die Isolierung der aktiven Reinsubstanzen in der Regel beträchtlich teurer als die Herstellung synthetischer Produkte. Darüber hinaus ist die biologische Aktivität und Stabilität von Naturstoffen im Freiland oft geringer. Bei der Verwendung von Rohextrakten als Pflanzenschutzmittel können Probleme hinsichtlich der Standardisierung und der Toxizität auftreten, so daß die geforderten Voraussetzungen für eine Registrierung oft schwer oder gar nicht zu erfüllen sind (KRAUSE, pers. Mitt.). Die häufig sehr komplexe Struktur der Moleküle aus Naturstoffen erschwert zudem eine chemische Synthese (JESPERS & DE WAARD, 1993). Dennoch stellt die Isolierung aktiver Substanzen aus Pflanzen eine vielversprechende Methode zur Auffindung von Molekülen dar, welche in der Lage sind, aufgrund ihrer neuartigen Wirkungsweise bzw. Molekülstruktur einen Weg zu neuen Leitstrukturen aufzuzeigen.

Naturstoffe können entweder direkt zur Bekämpfung von Schadorganismen verwendet werden oder als Leitstrukturen bei der Synthese von Wirkstoffen dienen. Auf dem Gebiet der Fungizide lassen sich die bisher kommerziell produzierten Naturstoffe in zwei Gruppen einteilen: die Aminoglycoside Validamycin und Kasugamycin sowie die Nukleoside Polyoxin B und D, Blasticidin S und Miltiomycin. Diese Verbindungen werden durch Fermentation von *Streptomyces* spp. gewonnen. Ihr Anteil am gesamten Fungizidmarkt ist mit weniger als

ein Prozent sehr niedrig (BUCHENAUER, 1996). Zu den Naturprodukten, die in den letzten Jahren als Leitstruktur für neue Fungizide dienten, gehören Pyrolnitrin, Methylacrylate, Strobilurin A und Oudemansin, Hadacidin, Thiolutin und Pisiferinsäure (BUCHENAUER, 1996). Der wohl erfolgreichste Naturstoff auf dem Gebiet der Fungizide ist der Wirkstoff Strobilurin. So berichten YPEMA & GOLD (1999), daß die Synthetisierung des Wirkstoffs Kresoximmethyl aus dem Naturstoff Strobilurin A des Kiefernzapfenrüblings (*Strobilurus tenacellus*) einen Höhepunkt der Leitstruktursuche aus Naturstoffen darstellt. Neben der fungiziden Wirkung von Naturstoffen könnte eine weitere Wirkungsweise auch die Resistenzinduktion sein. Diese Aktivierung der natürlichen Widerstandsfähigkeit der Pflanze kann neben der Applikation von synthetischen Substanzen, wie es am Beispiel an einer Reihe von Substanzen in der Literatur beschrieben wurde (METRAUX *et al.* 1991, STAUB *et al.* 1992, RUESS *et al.* 1996, GÖRLACH *et al.* 1996), auch durch die Applikation von Naturstoffen erfolgen. So wurden Extrakte von *Reynoutria sachalinensis* in der Literatur als Resistenzinduktoren beschrieben (HERGER 1991, KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS & SCHMITT 1998). Für die Auffindung solcher Substanzen ist die Untersuchung zur Wirksamkeit an der Pflanze zwingend notwendig.

Vor dem Beginn des chemischen Pflanzenschutzes verwendete man Naturstoffe meist in Form von Pflanzenextrakten zum Schutz vor Schädlingen und Krankheiten. Die alten 'Hausmittel', wie Knoblauch-, Brennessel- und Schachtelhalmbrühe gegen Pilze und Bakterien, Lavendel gegen Ameisen und Meerrettich gegen den Kartoffelkäfer finden heute vor allem in Kleingärten Verwendung (SCHMID & HENGELER, 1984). Aber auch in ackerbaulichen Kulturen nehmen Pflanzenextrakte eine wichtige Stellung ein. Dies ist vor allem in den Entwicklungsländern und im ökologischem Landbau der Fall. Hier hat sich in den letzten Jahren aufgrund einer neuen Gesetzgebung und dem Verbot von Kupferpräparaten zur Bekämpfung von Falschen Mehltäupilzen ein gesteigertes Interesse zur Auffindung alternativer Behandlungsmöglichkeiten ergeben.

Das wohl bekannteste Beispiel für die Verwendung von Pflanzenextrakten als Bekämpfungsmöglichkeit sind Extrakte aus *Azadirachta indica* (Neembaum). Bei ihnen sind insektizide, nematizide und fungizide Wirkungen bekannt. Eine fungizide Wirkung gegen *Rhizoctonia solani* an Baumwolle, *Macrophomina phaseolina* an Sojabohne und *Ganoderma lucidum* an Kokosnuß wurde von JEYARAJAN *et al.* (1986) beschrieben. ROVESTI *et al.* (1992) berichteten weiterhin über eine fungizide Wirkung der Extrakte gegenüber *Erysiphe graminis* und

Puccinia recondita an Getreide. Aber auch ein Extrakt aus der Rinde von *Quassia amara* (Quassiabaum) findet heute noch Anwendung im ökologischen Obstbau zur Bekämpfung von saugenden Insekten. Ein aus Quassiaholz - Auszügen hergestelltes Produkt der Firma Bionomic wird im Obstbau gegen die Kirschfruchtfliege, den Blütenstecher und gegen die Apfelsägewespe verwendet (Produktinformation der Firma Bionomic).

Die fungiziden Eigenschaften eines Blattextraktes aus *Allium sativum* (Knoblauch) beschreiben LAKSHMANAN *et al.* (1990). Die Applikation des Extraktes aus *A. sativum* reduzierte deutlich den Befall von Bohnen mit *Thanatephorus cucumeris*. SINGH *et al.* (1990); SINGH & CHAUHAN (1992) beobachteten eine Hemmung der Sporenkeimung bei *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Curvularia* spp. und *Phytophthora drechsleri* nach Applikation eines Extraktes aus *A. sativum*. Die guten fungiziden Eigenschaften von *A. sativum* konnten auch durch weitere Versuche bestätigt werden (MENON, 1994). Er zeigte, daß durch die Anwendung von Knoblauchextrakten sowohl im Gewächshaus als auch im Freiland ein guter Schutz gegen *Claviceps sorghi* an Hirse zu erreichen ist. Nach REIMERS *et al.* (1993) beruht die fungizide Wirkung von *A. sativum* auf dem Inhaltsstoff Ajoen, einer der Speichersubstanz Alliin abgeleiteten Verbindung. In Experimenten mit synthetisch hergestellten Ajoen ließ sich ein guter Bekämpfungserfolg des Erregers *Cladosporium fulvum* an Tomaten erzielen. Andererseits führte eine protektive Anwendung von Ajoen an Gurken gegen *Ulocladium cucurbitae* zu phytotoxischen Effekten, jedoch nicht zu einer Befallsminderung. Eine vollständige Bekämpfung der obligat biotrophen Erreger *Oidium lycopersicum* an Tomaten und *Sphaerotheca pannosa* an Rosen konnte durch die Applikation von 300 mg / l Ajoen erzielt werden. Nach REIMERS *et al.* (1993) beruht die Wirkungsweise des Ajoens auf einer Keimhemmung der Sporen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von Pflanzenextrakten als Pflanzenschutzmittel wurde von FAVARON *et al.* (1993) beschrieben. Es konnte gezeigt werden, daß Extrakte aus *Allium cepa* (Zwiebel) und *A. porrum* (Porree) Inhaltsstoffe enthalten, die *in vitro* produzierte Polygalacturonasen von *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Phoma terrestris*, *Sclerotium cepivorum*, *Macrophomina phaseolina* sowie *Phoma lycopersici* unterschiedlich effizient hemmten. SNOEK (1984) berichtet über die gute Wirkung von *Equisetum arvense* (Ackerschachtelhalm) gegen Falsche und Echte Mehltäupilze an Gemüse, *Alternaria solani* an Tomate und Kartoffel, *Botrytis cinerea* an Erdbeere sowie *Venturia inaequalis* an Apfel. Als wirksame Substanz nennt er die Kieselsäure, welche zu 10 Prozent in der Pflanze

enthalten ist. *E. arvense* ist auch Bestandteil des Produktes Myco-Sin[®] und hat eine protektive Wirkung gegenüber *Venturia inaequalis* und *Podosphaera leucotricha* an Apfel, *Plasmopara viticola*, *Uncinula necator* und *Botrytis cinerea* an Reben sowie *Phytophthora infestans* an Kartoffel (Fa. GEBRÜDER SCHAETTE KG).

Fungizide Wirkungen von ätherischen Ölen, welche laut HILDEBERT (1993) Stoffgemische sind, in denen die Hauptmenge der ätherischen Ölbestandteile aus Terpenverbindungen besteht (etwa 90 %), wurden durch mehrere Autoren beschrieben. So konnte die fungizide Wirkung des Öls aus *Pinus roxburghii* (800 ppm) gegen *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus* von MISRA *et al.* (1989) durch *in vitro* Experimente aufgezeigt werden. Weiterführende Versuche zeigten, daß die fungizide Wirkung weder durch die Extraktionstemperatur noch durch Autoklavieren zu beeinträchtigen ist. Phytotoxische Effekte nach Applikation von ätherischen Ölen auf Erdnußsamen konnten nicht festgestellt werden. PANDEY *et al.* (1996) zeigten, daß durch die Verwendung ätherischer Öle aus *Cymbopogon pendulus* mit einer Konzentration von 200 µg / ml in einem *in vitro* - Screening eine vollständige Hemmung des Mycelwachstums von *Microsporum gypseum* und *Trichophyton mentagrophytes* erzielt werden konnte. Eine ebenfalls erfolgreiche Bekämpfung phytopathogener Pilze durch die Anwendung ätherischer Öle konnte nach der Applikation der ätherischen Öle aus *Eucalyptus amygdalina* und *E. paniciflora* gegenüber *Erysiphe cichoracearum* beobachtet werden (SHAHI *et al.* 1996). Experimente zeigten, daß bei einer Konzentration von einem bzw. einem halben Prozent der ätherischen Öle ein deutlicher Effekt auf die Morphologie und Infektiosität der Konidien erreicht wurde, phytotoxische Effekte konnten dagegen nicht beobachtet werden. Über die fungiziden Effekte ätherischer Öle schreiben GRÄFF *et al.* (1990), daß deren Wirkung auf einer keimtötenden Eigenschaft beruht. In *in vivo* - Experimenten zeigten sie, daß die fungizide Wirkung des Senföls und des Trans-2-Hexenal in einer Konzentration ab 10 µl / l Substanz / l Luftraum eine vollständige Hemmung von *Botrytis cinerea* bewirkte. In weiteren *in vivo* Versuchen mit Zimtöl und Zimtaldehyd konnten bei einer Konzentration von 2 µl / l Luftvolumen sehr hohe Wirkungsgrade (95 - 100 %) gegen *Erysiphe graminis* an Getreide und *Erysiphe polyphaga* an Begonien erzielt werden. Neben der guten Wirkung gegen die Echten Mehlaupilze zeigte sich auch eine deutliche Wirksamkeit gegen den Bohnenrost *Uromyces phaseoli*. Als Nachteil nennen auch sie die z. T. starken phytotoxischen Effekte dieser pflanzlichen Metabolite. Nach MÜLLER-RIEBAU *et al.* (1994, 1996) zeigten *in vitro* - Versuche die fungiziden Wirkungen der ätherischen Öle aus *Thymbra spicata*, *Satureja thymbra*, *Salvia fruticosa*, *Eucalyptus* spp. und *Origanum minutiflorum* gegenüber den

bodenbürtigen Pilzen *Fusarium moniliformum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* und *Phytophthora capsici*. Die stärkste Wirkung auf das Mycelwachstum der untersuchten Pilze zeigten die Öle aus *T. spicata*, *S. thymbra* und *O. minitiflorum*. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen deuten darauf hin, daß es sich bei den fungiziden Komponenten hauptsächlich um Thymol und Carvacrol handelt (MÜLLER-RIEBAU *et al.* 1994). Nach PASTER *et al.* (1996) ist Thymol auch bei ätherischem Öl aus *Origanum vulgare* (Oregano) die wirksame Komponente. Durch die Verwendung von Thymol ist eine erfolgreiche Bekämpfung von Pilzen an Getreide im Lager zu erzielen.

Als gut wirksam gegen den im Lager auftretenden Pilz *Aspergillus flavus* beschreiben ASTHANA *et al.* (1988) Eugenol, welches mit 80 Prozent Hauptbestandteil des ätherischen Öls von *Caryophylli flos* (Nelke) ist, ohne das dieses phytotoxische Effekte gegen *Phaseolus radiatus* zeigte. Als die wirksame Komponente von Pflanzenextrakten aus *Taxus brevifolia* (Eibe) nennt WAGNER & FLORES (1994) das Taxol. In *in vitro* - Untersuchungen konnte er zeigen, daß das Mycelwachstum bei *Phytophthora* spp. und *Pythium* spp. durch die Verwendung von Taxol stark gehemmt wurde, was auch Versuche von ELMER *et al.* (1994) bestätigen.

Nach BIRATU *et al.* (1996) beeinflusst Koffein in einer Konzentration von 0,25 Prozent das Mycelwachstum von *Colletotrichum kahawae* (Kaffeekirschen - Krankheit). Vergleiche der Koffeingehalte in einzelnen Kaffeesorten und deren Anfälligkeit gegenüber *Colletotrichum kahawae* ergaben, daß die Variation in der Anfälligkeit der Sorten auf unterschiedliche Koffeingehalte zurückzuführen war. Sorten mit hohem Gehalt an Koffein zeigten eine höhere Resistenz gegenüber dem Erreger der Kaffeekirschen - Krankheit.

Daß Pflanzenextrakte auch breit wirksame fungizide Eigenschaften besitzen können, zeigen Versuche von MOHAMED *et al.* (1996). In einem *in vitro* - Screening von 58 malaiischen Pflanzenextrakten waren zwei äthanolische Extrakte aus *Piper betle* (Betelpfeffer) sehr gut wirksam gegen Pflanzenpathogene. Beide Extrakte hemmten das Wachstum von *Alternaria alternata*, *Botrydiplodia theobromae*, *Colletotrichum capsicii*, *Penicillium citrium*, *Phomopsis caricae-papayae*, *Fusarium pallidroseum* und *Aspergillus niger* bei einer Konzentration von 10 mg / ml fast vollständig. Ein *in vitro* Screening von 64 Pflanzenextrakten auf ihre fungizide Wirkung gegen *Alternaria solani*, *Helminthosporium sativum* und *Rhizoctonia solani* zeigte, daß der Extrakt aus *Ranunculus asiaticus* am wirkungsvollsten das Wachstum und die Sporulation der drei Pilze hemmte (QASEM & ABUBLAN 1996).

Obwohl die Untersuchung pflanzlicher Inhaltsstoffe schon eine lange Tradition hat, besitzen die in den letzten Jahren erfolgreich eingesetzten Substanzen ausschließlich insektizide Wirkung. Hier sind es vor allem die Inhaltsstoffe Pyrethrum aus den Blüten der Chrysanthemen (*Chrysanthemum cinerariifolium*) und das Azadirachtin aus dem Neembaum (*Azadirachta indica*), die im organischen Landbau eingesetzt werden. Die chemische Synthese dieser natürlichen Substanzen zur Entwicklung neuartiger Pflanzenschutzmittel, gelang nur am Beispiel des Pyrethrum, und führte zu der erfolgreichen Wirkstoffklasse der ‚Pyrethroide‘. Sie besitzen noch heute einen großen Marktanteil, der 1987 auf einen Prozentsatz von 25 des Insektizidmarkts geschätzt wurde (HIRANO 1989). Bei den Substanzen mit fungizider Wirkung stammen die bisher kommerziell produzierten Naturstoffe alle aus der Synthese von mikrobiellen Stoffwechselprodukten.

Aufgrund der deutlichen Diskrepanz zwischen aktiven Substanzen aus Pflanzen mit fungizider Wirkung und solcher mit insektizider Wirkung, ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Pflanzenextrakte zu selektieren, welche aufgrund ihrer fungiziden Wirkung zur Bekämpfung pflanzlicher Schadpilze genutzt werden können. Hierzu erfolgt ein Screening der pflanzlichen Rohextrakte gegenüber phytopathologisch relevanten Schadpilzen. Ein entscheidendes Kriterium zur Beurteilung der Wirksamkeit soll neben der Wirkung *in vitro* - auch die *in vivo* - Wirkung und die Befallsreduktion unter Freilandbedingungen sein. Von den Extrakten, die sich als besonders wirksam herausstellen, soll eine Charakterisierung der Wirkung vorgenommen werden, um so eine erste Einschätzung über den Wirkungsmechanismus der aktiven Substanzen zu erhalten. Das langfristige Ziel solcher Arbeiten ist die Suche nach interessanten Strukturen, welche sich möglicherweise als Leitstrukturen für die Entwicklung von Wirkstoffen mit neuartigen Wirkmechanismen eignen. Um diesem Ziel etwas näher zu kommen, soll neben der Auffindung aktiver pflanzlicher Rohextrakte auch eine Isolierung und der Versuch einer Identifizierung der aktiven Substanzen unternommen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchspflanzen

2.1.1 Arten und Sorten

Für die Untersuchungen zur Wirksamkeit von Pflanzenextrakten gegen phytopathogene Pilze wurden die folgenden Pflanzen verwendet:

Weinrebe	<i>Vitis vinifera</i> (L.), ‘Müller-Thurgau’
Tomate	<i>Lycopersicon lycopersicum</i> (L.), Farw., ‘Rheinlands Ruhm’
Paprika	<i>Capsicum annum</i> (L.), ‘Yolo Wonder B’
Bohne	<i>Phaseolus vulgaris</i> (L.), ‘Saxa’
Weizen	<i>Triticum aestivum</i> (L.), ‘Kanzler’; ‘Toronto’

2.1.2 Pflanzenanzucht

Alle Versuchspflanzen wurden im Gewächshaus bei einer Temperatur von 20 bis 30 °C und einer relativen Luftfeuchte von 60 bis 80 % angezogen. Um eine Tageslänge von 16 Stunden und eine Lichtversorgung von ca. 7000 lx zu gewährleisten, erfolgte eine Zusatzbeleuchtung mit Natriumdampfleuchten (Philips SGR 140).

Tomaten- und Paprikapflanzen wurden nach der Aussaat und Entfaltung der Primärblätter pikiert. Weinreben bewurzelten als Sproßstecklinge in ‘Oasis – growing - medium’ (Fa. Agri-media, Wachenheim) im Hydrokulturverfahren und wurden 28 Tage nach dem Bewurzeln getopft. Vor der Applikation von Substanzen wurden die Pflanzen auf vier voll entwickelte Blätter gestutzt. Bohnen und Winterweizen wurden direkt in Töpfen angesät.

Die Pflanzen wurden in Plastiktöpfen (Ø 10 cm) mit Einheitserde (Typ T) kultiviert und zweimal am Tag über Bewässerungsmatten mit Wasser versorgt. Zur Nährstoffversorgung wurden die Pflanzen einmal wöchentlich mit einer 0,2 %-igen ‘Flori 2’ - Düngerlösung (Fa. Eufloor, München) gedüngt.

2.2 Wirksubstanzen

2.2.1 Pflanzenschutzmittel

Einen Überblick über die in den Versuchen verwendeten Pflanzenschutzmittel gibt Tabelle 1. Durch die Zugabe von Aqua. dest. wurden die Wirkstoffe auf die entsprechenden Endkonzentrationen verdünnt.

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Pflanzenschutzmittel und deren Wirkstoffe.

Präparat	Wirkstoff
Euparen [®] WG	<i>Dichlofluanid (50%)</i>
Antracol [®] WG	<i>Propineb (70%)</i>
Dithane Ultra [®] WG	<i>Mancozeb (75%)</i>
Dorado [®] EC	<i>Pyrifenox (200g/l)</i>
Folicur E [®] WP	<i>Tebuconazole (10%); Dichlofluanid (40%)</i>
Aliette [®] WG	<i>Fosetyl (74,6%)</i>
Tattoo [®] EC	<i>Propamocarb-Hydrochlorid (248 g/l); Mancozeb (302 g/l)</i>
Bayfidan spezial [®] WG	<i>Triadimenol (5%)</i>

2.2.2 Resistenzinduktoren

Als Resistenzinduktor wurde das Präparat Bion[®] WG 50 (Wirkstoff *Benzothiadiazol*) eingesetzt. Für die einzelnen Versuche wurde das Präparat durch Zugabe von Aqua. dest. auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt.

2.3 Pflanzenextrakte

2.3.1 Pflanzenmaterial

Das verwendete Pflanzenmaterial wurde entweder über den Apothekenhandel in getrocknetem Zustand bzw. im Fall von Teebaumöl und Echinacin als Fertigextrakt (in der folgenden Liste mit „A“ gekennzeichnet) bezogen oder frisch gesammelt und im Trocken-

schränk bei 60 °C für 24 h getrocknet. Die Auswahl der Pflanzen erfolgte nach Angaben aus der Literatur oder zufällig nach jahreszeitlicher und örtlicher Verfügbarkeit. Die extrahierten Teile der jeweiligen Pflanzen sind in der nachfolgenden Tabelle 2 angegeben.

Tab. 2: Artenliste und verwendete Teile der extrahierten Pflanzen.

Familie *Asteraceae* (Korbblütengewächse)

Solidago serotina Ait. (Kanadische Goldrute) - Blatt

Calendula officinalis L. (Ringelblume) - Blatt u. Blüte (A)

Matricaria chamomilla L. (Kamille) - Blüte (A)

Tagetes erecta L. (Studentenblume) - Blatt u. Blüte

Echinaceae pupureae L. (Purpursonnenhut) - Kraut (A)

Familie *Brassicaceae* (Kreuzblütler)

Armoracia rusticana L. (Meerrettich) - Wurzel (A)

Familie *Fabaceae* (Leguminosen)

Wisteria floribunda L. (Glycine) - Blatt

Familie *Gentianaceae* (Enziangewächse)

Gentiana lutea L. (Enzian) - Wurzel (A)

Familie *Geraniaceae* (Geraniengewächse)

Pelargonium oderatissimum L. (Zitronengeranie) - Blatt u. Sproß

Familie *Ginkgoaceae* (Ginkgobaumgewächse)

Ginkgo biloba L. (Ginkgobaum) - Blatt

Familie *Hippocastanaceae* (Roßkastaniengewächse)

Aesculus hippocastanum L. (Roßkastanie) - Blatt, Frucht, Fruchtfleisch

Familie *Lauraceae* (Lorbeergewächse)

Cinnamomum camphora NEES et EBERM. (Ceylon - Zimt) - Rinde (A)

Familie *Lamiaceae* (Lippenblütler)

Origanum vulgare L. (Oregano) - Blatt (A)

Salvia officinalis L. (Salbei) - Blatt (A)

Satureja hortensis L. (Bohnenkraut) - Blatt und Sproß (A)

Familie *Myrtaceae* (Myrtengewächse)

Melaleuca alternifolia L. (Teebaum) - Öl (A)

Pimenta dioica L. (Nelkenpfeffer) - Samen (A)

Familie *Papilionaceae* (Schmetterlingsblütler)

Melilotus officinalis L. (Steinklee) - Blatt u. Sproß (A)

Trigonella foenum-graecum L. (Bockshornklee) - Samen (A)

Familie *Polygonaceae* (Knöterichgewächse)

Reynoutria sachalinensis (F. Schmidt) Nakai (Sachalin –
Staudenknöterich) - Blatt

Rheum rhabarbarum L. (Rhabarber) - Blatt u. Sproß

Familie *Rosaceae* (Rosengewächse)

Alchemilla vulgaris agg. (Frauenmantel) - Blatt u. Sproß (A)

Rosa canina L. (Hundsrose) - Fruchtfleisch, Samen (A)

Potentilla erecta L. (Tormentill) - Wurzel (A)

Potentilla anserina L. (Gänsefingerkraut) - Blatt u. Sproß (A)

Familie *Rubiaceae* (Rötegewächse)

Galium aparine L. (Klettenlabkraut) - Blatt u. Sproß (A)

Familie *Salicaceae* (Weidengewächse)

Salix spp. L.- (Weide) - Rinde (A)

Familie *Solanaceae* (Nachtschattengewächse)

Datura stramonium L. (Stechapfel) - Blatt

Datura suaveolens L. (Engelstrompete) - Blatt

Familie *Apiaceae* (Doldengewächse)

Carum carvi L. (Kümmel) - Samen (A)

Heracleum sphondylium L. (Bärenklau) - Blatt, Samen

Imperatoria ostruthium L. (Meisterwurz) - Wurzel (A)

Familie *Violaceae* (Veilchengewächse)

Viola tricolor L. (Stiefmütterchen) - Blatt u. Sproß (A)

2.3.2 Extraktionsverfahren

2.3.2.1 Herstellung von Rohextrakten

Jeweils 10 g des getrockneten Pflanzenmaterials wurden mit 100 ml 70 %-igem Äthanol versetzt und auf einem Magnetrührer im Wasserbad bei 20, 60 oder 90 °C für zwei Stunden extrahiert (Abb. 1). Anschließend wurde der Extrakt abgefiltert und bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Für weitere Versuchen wurde mit der oben beschriebenen Methode aus ausgewählten Pflanzenmaterialien Extrakte in unterschiedlichen Lösungsmitteln hergestellt. Untersucht wurde die Eignung der Lösungsmittel Äthanol, Essigsäureäthylester, Toluol und Hexan zur Gewinnung wirksamer Extrakte. Die so hergestellten Pflanzenextrakte wiesen alle dieselbe Konzentration bezogen auf die Trockenmasse auf (10 % TS) und wurden je nach Verwendung mit Wasser verdünnt.

2.3.2.2 Herstellung von Extrakten mit der Soxhlet Apparatur

Je 20 g getrocknetes Pflanzenmaterial wurden in einer Soxhlet - Apparatur eingewogen und mit 200 ml 70 %-igem Äthanol über vier Stunden extrahiert (Abb. 1). Bis zur Verwendung der Extrakte wurden diese im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Auch die mit der Soxhlet-Appa-

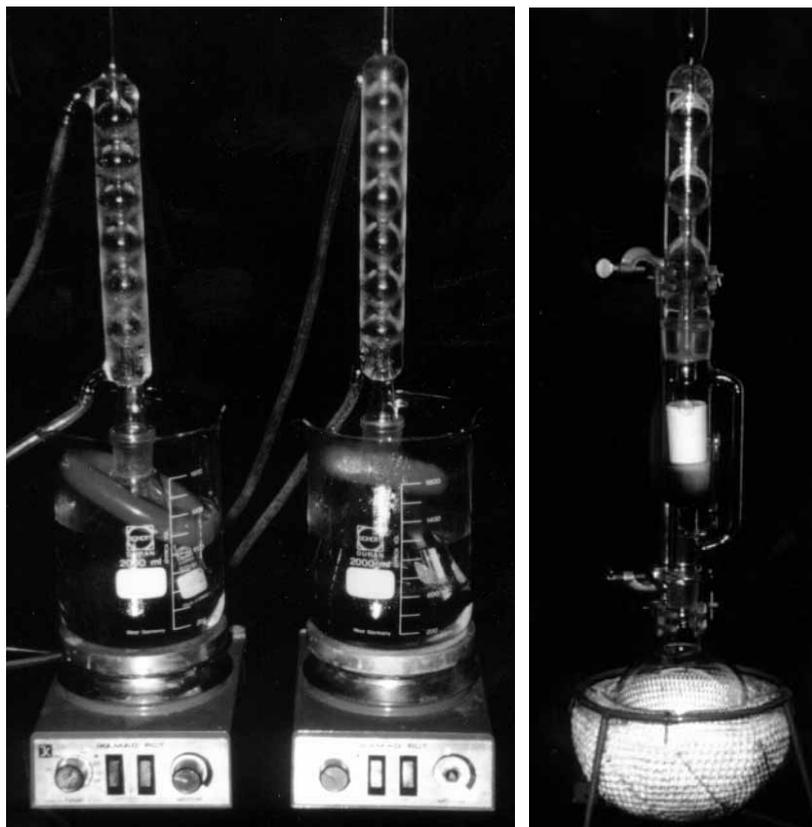


Abb. 1: Extraktionsverfahren auf dem Magnetrührer mit Wasserbad (links) und Soxhlet Extraktionsverfahren (rechts) zur Herstellung von Pflanzenextrakten.

ratur hergestellten Extrakte wiesen alle dieselbe Konzentration auf (10 % TS) und wurden je nach Gebrauch mit Wasser verdünnt.

2.3.3 Ausbringung von Pflanzenextrakten

2.3.3.1 Applikationsverfahren

Zur Untersuchung des Einflusses der Applikationstechnik und einer möglichen Verlagerbarkeit der Wirkung in der Pflanze wurde ein Biotest in verschiedenen Wirt – Pathogen – Modellen mit ausgewählten Pflanzenextrakten durchgeführt.

2.3.3.1.1 Spritzapplikation

Die Ausbringung der Pflanzenextrakte erfolgte unter Verwendung einer Spritzpistole (Düsendurchmesser 0,5 mm) bei einem Luftdruck von 1,5 bar. Appliziert wurden die Extrakte bis zur Tropfnässe der Versuchspflanzen. In den Screeningversuchen erfolgte die Behandlung protektiv 24 Stunden vor der Inokulation unter Zugabe des Netzmittels Tween[®] 20.

Für weitere Versuche erfolgte die Applikation der Extrakte protektiv oder kurativ. Die protektiven Applikationen erfolgten fünf bzw. zwei Tage oder vier Stunden vor der Inokulation. Die kurativen Behandlungen wurden acht Stunden bzw. ein bis drei Tage oder eine, zwei, vier und fünf Stunden nach der Inokulation vorgenommen.

Um festzustellen, ob eine Verlagerung der Extraktwirkung aus der unteren in die obere Blattetage stattfindet (akropedale Verlagerung), wurden Blätter der unteren Blattetage beidseitig nach der oben beschriebenen Methode behandelt. Alle übrigen Pflanzenteile wurden während der Applikation abgedeckt. Zur Untersuchung der Verlagerbarkeit vom Blattgrund zur Blattspitze wurden nur die Unterseiten der Blattbasis bzw. die obere Blatthälfte während der Applikation behandelt. Eine mögliche Verlagerung von der Blattoberseite zur Blattunterseite (translaminare Verlagerung) wurde durch eine Applikation der Blattoberseite untersucht. Nach einer Inkubation für zwei Tage im Gewächshaus erfolgte die Inokulation der Pflanzen (siehe 2.3.2.).

2.3.3.1.2 Lokalapplikation auf Laubblätter und Pflanzenstengel

Zur Untersuchung des Effekts der Applikationstechnik auf die Verlagerung der Extraktwirkung vom Blattansatz zur Blattspitze und von der unteren in die oberen Blattetagen erfolgte eine Formulierung der Pflanzenextrakte mit dem Gelbildner Kelzan[®] (Tab. 3). Die Ausbringung der Extrakte erfolgte als Stammapplikation und Blattapplikation. Behandelt

wurde an der Stammbasis, ca. 6 - 7 cm oberhalb des Kultursubstrats und am Blattansatz der Versuchspflanzen. Als Kontrolle diente die Leerformulierung der Extrakte. Inokuliert wurde nach einer Inkubation von zwei Tagen im Gewächshaus.

2.3.3.1.3 Wurzelapplikation

Weinreben wurden mit je 50 ml eines 5 bzw. 1 %-igen Extraktes angegossen. Die unbehandelte Kontrolle erhielt die gleiche Menge Wasser und die Leerformulierung (50 ml der jeweiligen Äthanolkonzentration). Nach der Applikation der Extrakte erfolgte eine Inkubation der Pflanzen für vier Tage im Gewächshaus.

2.3.3.1.4 Saatgutapplikation

Anhand ausgewählter Pflanzenextrakte sollte die Wirksamkeit gegenüber den bodenbürtigen Pathogenen *Microdochium nivale* und *Pythium ultimum* ermittelt werden.

Den Extrakten (10 % TS) wurden 75 ml einer 15 %-igen Saccharoselösung zugesetzt, und diese auf eine Temperatur von 35 – 40 °C erhitzt. Weizenkörner wurden vier mal für je eine Minute in dieser Lösung inkubiert. Im Anschluß an die Behandlung erfolgte eine Rücktrocknung der Samen für ca. zehn Minuten unter Verwendung einer Wärmelampe (80 Watt). Die Versuchsdurchführung erfolgte mit der unter Punkt 2.2.5.4 beschriebenen Methode.

2.3.3.2 Formulierung

Für die Spritzapplikation von Pflanzenextrakten wurden fünf Formulierhilfsstoffe verwendet (Tab. 3). Die einzelnen Substanzen wurden den Extrakten vor der Applikation in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt und ihre Wirksamkeit in unterschiedlichen Wirt – Pathogen - Modellen bestimmt.

Für Versuche zur Untersuchung der Abwaschfestigkeit von Pflanzenextrakten erfolgte die Applikation der Extrakte unter Zugabe des Haftmittels BOND[®] (Tab. 3). Nach einer Inkubation der Pflanzen für 24 Stunden in Gewächshaus, wurden die Pflanzen vorsichtig mit einer Handbrause abgespült und nach dem Abtrocknen inokuliert.

Tab. 3: Liste der Formulierhilfsstoffe und ihrer verwendeten Konzentrationen.

Substanzen	Bezugsadresse	Konzentrationen
TWEEN [®] 20 (Netzmittel)	Fa. Merck, Hohenbrunn	125 ppm
RENEX [®] 36 (Netzmittel)	Fa. Surfactants, Cleveland,UK	125 ppm
CITOWETT [®] (Netzmittel)	Fa. Bayer, Leverkusen	125 ppm
BOND [®] (Haftmittel)	Fa. Newman, Cambridge, UK	1000 ppm
LINOLSÄURE (Penetrationsförderer)	Fa. Aldrich, Steinheim	1000 ppm
KELZAN [®] (Gelbildner)	Fa. Kelco, Hamburg	30000ppm

Untersuchungen zur Lokalapplikation der Pflanzenextrakte erfolgten mit Hilfe von Hydrogelen. Hierzu wurden die Pflanzenextrakte mit Aqua. dest. auf die jeweilige Behandlungskonzentration verdünnt. Der Behandlungsflüssigkeit wurden anschließend drei Gewichtsanteile KELZAN[®] zugesetzt (Tab. 3) und mit dem Magnetrührer gerührt. Nach ca. 30 Minuten hatte sich ein cremeartiges Hydrogel gebildet.

2.4 Pathogene

<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary	Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln
<i>Plasmopara viticola</i> (Berk. & M.A. Curtis) berl. & De Toni in Sacc.	Erreger des Falschen Mehltaus an Weinreben
<i>Uromyces phaseoli</i> (Pers.) Wint.	Erreger des Bohnenrosts
<i>Erysiphe graminis</i> DC f.sp. <i>tritici</i> (Em. Marchal)	Erreger des Echten Mehltaus an Getreide
<i>Botrytis cinerea</i> (Pers.) ex Fr.	Erreger des Grauschimmels an Paprika und Erdbeeren
<i>Alternaria solani</i> (Ellis et Martin) Sorauer	Erreger der Dürrfleckenkrankheit an Tomaten und Kartoffeln
<i>Microdochium nivale</i> (Fries) Casati	Erreger des Schneesimmels an Getreide
<i>Pythium ultimum</i> Trow	Erreger der Umfallkrankheit an vielen Pflanzenarten

<i>Cochliobolus sativus</i> (Ito & Kuribayashi) Drechs. ex Dastur	Erreger einer Wurzel-, Halm- und Blatt- fleckenkrankheit an Getreide
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> Walker	Erreger der Schwarzbeinigkeit an Getreide

Alle Organismen entstammen der Mikroorganismensammlung und der Pathogenerhaltung des Institutes.

2.4.1 Erhaltung und Inokulation

2.4.1.1 *Phytophthora infestans*

Das Pathogen wurde im Klimaschrank bei 18 °C im Dunkeln auf Gemüsesaft-Agar kultiviert. Die Überimpfung fand in wöchentlichen Abständen statt. Nach jeder dritten bis vierten Passage erfolgte eine Überimpfung auf Kartoffelscheiben ('Bio-Kartoffeln') in Petrischalen, um die Pathogenität des Erregers zu erhalten. Hierzu wurden die Kartoffeln in 75 %-igem Äthanol für ca. fünf Minuten oberflächensterilisiert und anschließend unter der Impfbank abgeflammt. Die so behandelten Kartoffeln wurden mit einem sterilen Messer in ca. 1 cm dicke Scheiben geschnitten und mit je einem Agarstück von einer mit *P. infestans* bewachsenen Platte beimpft. Nach Inkubation bei 18 °C im Dunkeln wurde das durch die Kartoffelscheibe gewachsene Myzel auf neue Agar-Platten übertragen.

<u>Gemüsesaft-Agar:</u>	200 ml Gemüsesaft
	3 g CaCO ₃
	16 g Agar
	800 ml Aqua dest.
	pH - Wert auf 6,4 einstellen
	30 min. bei 121 °C autoklavieren

Zur Inokulumgewinnung wurden stark sporulierende Kulturen des Pathogens mit Aqua dest. vom Nährmedium abgewaschen und zur Entfernung von Mycelresten durch ein Mulltuch filtriert. Die Sporendichte wurde auf ca. 1×10^5 Sporangien / ml eingestellt und das Inokulum zur Schlupfinduktion der Zoosporen für vier Stunden bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Durch eine nochmalige Untersuchung der Sporensuspension nach vier Stunden erfolgte eine Qualitätskontrolle des Inokulums. Es wurden zur Inokulation nur solche Sporensuspensionen verwendet, die eine 90 %-ige Schlupfrate der Zoosporen aufwiesen.

Die Pflanzen wurden nach der Inokulation im Feuchteschrank bei einer rel. Luftfeuchte von 95 - 98 % für 48 Stunden inkubiert.

2.4.1.2 *Plasmopara viticola*

Die Erhaltung von *Plasmopara viticola* erfolgte durch Inokulation von Weinreben mit eingefrorenen Konidien aus infiziertem Blattmaterial. Nach erfolgreicher Inokulation wurden gut sporulierende Blätter zur Gewinnung des für die Versuche benötigten Inokulums und zur Erhaltung wieder bei -20 °C eingefroren.

Zur Inokulumgewinnung wurden von gut sporulierenden Rebenblättern mit dem Pinsel Konidien in Wasser abgebürstet und die Inokulumlösungen anschließend auf eine Sporendichte von 8×10^4 Sporangien / ml eingestellt.

Die Inokulation erfolgte 24 Stunden nach der Behandlung auf der Blattunterseite der Versuchspflanzen. Nach einer Inkubation für 48 Stunden im Feuchteschrank (95 - 98 % rel. Luftfeuchte) wurden die Pflanzen im Gewächshaus aufgestellt und bis zum Auftreten der für eine Infektion mit *P. viticola* typischen 'Ölflecken' (ca. 6 bis 7 Tage) dort belassen. Zur Auslösung der Sporulation erfolgte eine nochmalige Inkubation für 24 Stunden im Feuchteschrank.

2.4.1.3 *Uromyces phaseoli*

Uredosporen des Bohnenrostes wurden von befallenen Blättern abgeklopft und bei -18 °C zur Erhaltung eingefroren. Frische oder eingefrorene Uredosporen wurden zur Herstellung des Inokulums in 300 ml Wasser gegeben. Anschließendes Schütteln sowie die Zugabe von einem Tropfen TWEEN[®] 20 bewirkten eine gute Verteilung der Sporen im Wasser.

Inokuliert wurden die Primärblätter 24 Stunden nach der Applikation mit der oben beschriebenen Sporensuspension. Die Inkubation erfolgte 48 Stunden in einer Feuchtekammer bei 95 - 98 % rel. Luftfeuchtigkeit und 25 °C im Dunklen. Nach dieser Inkubation wurden die Pflanzen für 7 bis 8 Tage im Gewächshaus aufgestellt und anschließend bonitiert.

2.4.1.4 *Erysiphe graminis*

Die Erhaltung und Inokulumgewinnung von *E. graminis* erfolgte durch Abschütteln von Konidien befallener Pflanzen auf unbefallene Pflanzen. Hierzu wurden in wöchentlichen Abständen unbefallene Pflanzen zwischen die infizierten Pflanzen gestellt.

Um zu gewährleisten, daß die Konidien ungefähr die gleiche Infektiosität aufwiesen, wurden die befallenen Pflanzen 24 Stunden vor der geplanten Inokulation abgeschüttelt und die neu gebildeten Konidien als Inokulum verwendet.

Die Inokulation erfolgte im 'settling tower', durch Abschütteln von Konidien befallener Pflanzen, auf dessen Grundfläche sich die zu inokulierenden Pflanzen befanden. Im Anschluß an die Inokulation erfolgte eine Inkubation der Pflanzen im Gewächshaus für ca. acht Tage.

2.4.1.5 *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Microdochium nivale*, *Pythium ultimum*, *Cochliobolus sativus* und *Gaeumannomyces graminis*

Die Pathogene wurden bei Zimmertemperatur ohne zusätzliche Beleuchtung in Petrischalen auf Kartoffel-Dextrose-Agar kultiviert.

Kartoffel-Dextrose-Agar: 32 g Kartoffel-Dextrose-Agar
 1000 ml Aqua dest.
 20 min. autoklavieren bei 121 °C

Die Inokulumgewinnung von *B. cinerea* und *A. solani* erfolgte unter Einsatz acht Tage alten, stark sporulierenden Kulturen. Zur Förderung der Sporulation von *A. solani* erfolgte nach dem fünften Kulturtag eine Inkubation für drei Tage unter UV - Licht. Der Sporenrasen der Pathogene wurde mit 2 %-iger Malzextraktlösung bei *B. cinerea* bzw. Aqua. dest. bei *A. solani* abgewaschen und zur Entfernung der Myzelreste durch Gaze filtriert. Das Inokulum wurde in einer Sporendichte von 1×10^6 Konidien / ml bzw. $1,5 \times 10^4$ Konidien / ml verwendet. Zur Inokulumgewinnung der drei bodenbürtigen Pathogene wurden je 50 g Weizenkörner mit 80 ml Aqua. dest. zweimal für 20 min. autoklaviert und nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur mit vier Impfstücken (\varnothing 15mm) des jeweiligen Pathogens beimpft. Nach einer Inkubation der Weizenkörner für 14 Tage bei 30 °C im Dunklen wurden die gut durchwachsenen Körner für zwei Tage bei 35 °C getrocknet und anschließend mit einer Messermühle fein vermahlen. Das so hergestellte Pulver diente als Inokulum für weitere Versuche.

Die Inokulation der Pflanzen mit den Erregern *B. cinerea* und *A. solani* erfolgte 24 Stunden nach Applikation der Substanzen. Die anschließende Inkubation erfolgte im Feuchteschrank bei einer rel. Luftfeuchte von 95 - 98 % für 48 Stunden.

Zur Inokulation des Kultursubstrats mit den bodenbürtigen Pathogenen *M. nivale* und *P. ultimum* wurde die oben beschriebenen bewachsenen Körner eingesetzt. Hierzu wurden die Versuchsgefäße (\varnothing 10cm) wie folgt gefüllt:

- 2/3 mit Kultursubstrat (1/3 Sand und 2/3 B-Horizont)
- 1 g Inokulum des jeweiligen Pathogens
- 1 cm Deckschicht des Kultursubstrats
- je zehn Körner der jeweiligen Variante
- 1 cm Deckschicht des Kultursubstrats

Die Inkubation der Versuche erfolgte in Klimakabinen bei 15 °C und einem Tag - Nacht - Rhythmus von 16 Stunden für sieben bis neun Tage.

2.4.2 Befallsbewertung

Die Befallsauswertung der Versuchspflanzen erfolgte nach Ausprägung der jeweiligen Symptome. Tabelle 4 enthält eine über die verwendeten Boniturverfahren.

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Boniturverfahren zur Befallsbewertung in verschiedenen Wirt-Pathogen-Modellen.

Wirtspflanze	Pathogen	Bonitur
Bohne	<i>Uromyces phaseoli</i>	Sporenlager / cm ²
Paprika	<i>Botrytis cinerea</i>	befallene Blattfläche (%)
Tomate	<i>Alternaria solani</i>	befallene Blattfläche (%)
	<i>Phytophthora infestans</i>	befallene Blattfläche (%)
Weinrebe	<i>Plasmopara viticola</i>	sporulierende Blattfläche (%)
Weizen	<i>Erysiphe graminis</i>	sporulierende Blattfläche (%)
	<i>Microdochium nivale</i>	aufgelaufene Pflanzen
	<i>Pythium ultimum</i>	aufgelaufene Pflanzen

Ermittelt wurde die nekrotisierte Blattfläche nach Befall mit den Pathogenen *P. infestans*, *A. solani* und *B. cinerea* durch visuelle Schätzung pro Blatt. Die Auswertung erfolgte in der Regel ein bis zwei Tage nach der Inokulation. Die Bonitur der Erreger *P. viticola* und *E. graminis* erfolgte durch Schätzung der sporulierenden Fläche pro Blatt ca. acht bis neun Tage nach Inokulation. Der Befall von Bohnen mit dem Erreger *U. phaseoli* wurde durch Auszählen der Sporenlager auf einer Fläche von 4 cm² pro Blatt bonitiert. Befallsauswertungen in den Versuchen mit den bodenbürtigen Pathogenen *M. nivale* und *P. ultimum* erfolgten durch Ermittlung der Auflauftrate der im inokuliertem Substrat ausgesäten Körner.

Der Mittelwert aus dem Befall bzw. der Auflaufrate der Versuchspflanzen pro Variante, wurde in den Ergebnissen als prozentualer Anteil befallener Blattfläche an der Gesamtfläche angegeben oder diente für die Berechnung des Wirkungsgrades (WG) in Prozent nach ABBOTT (1925).

2.5 *In vitro* - Untersuchungen zur Wirksamkeit von Pflanzenextrakten

2.5.1 Myzelwachstumstest

2.5.1.1 Applikation der Extrakte auf Filterpapierscheiben

Zur Prüfung der Pflanzenextrakte auf ihre fungiziden Eigenschaften wurde ein Petrischalen-Test durchgeführt. Als Maß für die fungizide Wirkung der Extrakte diente das Myzelwachstum der Pilze. Als phytopathologisch relevante Pilze wurden *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Cochliobolus sativus*, *Phytophthora infestans* und die bodenbürtigen Pathogene *Microdochium nivale*, *Pythium ultimum* und *Gaeumannomyces graminis* ausgewählt.

Die Untersuchung der Wirksamkeit der Extrakte erfolgte auf Kartoffel-Dextrose-Agar bzw. bei *P. infestans* auf Gemüsesaft-Agar. Hierfür wurden die Agar-Platten durch Übertragung einer Myzelscheibe des jeweiligen Pathogens (15 mm Durchmesser) in die Mitte der Petrischale beimpft. Anschließend wurden auf jede Petrischale kreisförmig sechs Filterpapierscheiben (Antibiotikatestblättchen) mit 1 cm Durchmesser ausgelegt (Abb. 2) und jede Scheibe mit 50 µl der Prüfsubstanz behandelt (GÄRTEL 1967; DAY & HARBORNE 1991). Die Inkubation der Pathogene erfolgte bei Zimmertemperatur bzw. die von *P. infestans* bei 18 °C im Dunkeln. In jeder Petrischale wurde je ein Extrakt in vier verschiedenen Konzentrationen (10, 5, 2,5 und 1 %) geprüft. Als Kontrolle dienten Varianten mit Äthanol (70 %) bzw. Wasser. Desweiteren wurde als Standard der fungizide Wirkstoff *Dichlofluanid* (Präparat Euparen®) mitgeprüft. Der Versuch wurde in vier Wiederholungen angelegt und die Bonitur fünf Tage nach Versuchsansatz mit folgendem Boniturschema durchgeführt:

<u>Boniturnote:</u>	<u>Pilzwachstum:</u>
1	keine Hemmung (Filterpapier völlig überwachsen)
2	leichte Hemmung (Filterpapier frei von Myzel)
3	mittlere Hemmung (Hemmhof ≤ 1 mm)
4	starke Hemmung (Hemmhof ≤ 2 mm)

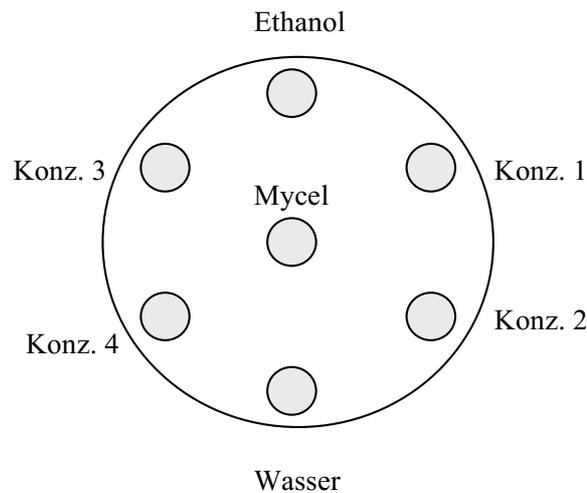


Abb. 2: Versuchsanordnung des Myzelwachstumstest mit Pflanzenextrakten auf Filterpapierscheiben.

2.5.1.2 Applikation der Extrakte im Agar

In einem weiteren Myzelwachstumstest wurden zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Verteilung der Extrakte im Agar dem Medium (Kartoffel – Dextrose - Agar) nach dem Abkühlen auf 60 °C die Extrakte in einer Endkonzentration von 0,5 % TS zugesetzt (verändert nach ONKAR & DHINGRA, 1985). Die Inokulation erfolgte durch Aufsetzen einer Myzelscheibe des jeweiligen Pathogens (\varnothing 15 mm) in die Mitte der Petrischale.

Die Bonitur des Myzelwachstums erfolgte in Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Pathogene mit Hilfe eines Planimeters (Fa. Kontron). Jede Variante wurde in fünf Wiederholungen durchgeführt und das Wachstum mit dem der unbehandelten bzw. mit dem der Leerformulierung verrechnet. Als Fungizidstandard diente der Wirkstoff *Dichlofluanid* (Präparat Euparen[®]).

2.5.2 Zoosporentlassung und indirekte Sporangienkeimung

Von einer Sporensuspension wurden je 50 μ l auf einen Objektträger mit Vertiefung pipettiert und mit je einem Aliquot des zu untersuchenden Pflanzenextraktes versetzt. Zur Induktion der Zoosporentlassung wurden die Objektträger für 8 Stunden bei 4 °C in einer Feuchtekammer inkubiert. Die Zoosporentlassung wurde nach diesem Zeitintervall durch Zugabe von Bengalrosa abgestoppt und die Zoosporentlassung durch vierfaches Auszählen von je 100

Sporangien mikroskopisch bestimmt. Als gekeimt (indirekte Keimung) wurden diejenigen Sporangien gewertet, die alle Zoosporen entlassen hatten.

2.5.3 Zoosporenbeweglichkeit

Von dem Überstand einer Zoosporensuspension wurden je 50 µl auf einen Objektträger mit Vertiefung pipettiert und mit je einem Aliquot des zu prüfenden Pflanzenextraktes versetzt. Nach einer Inkubation von drei Minuten wurde die Zoosporenbeweglichkeit durch visuelle Bonitur von je vier Objektträgern pro Konzentration mikroskopisch bestimmt. Erfasst wurde die Beweglichkeit der Zoosporen nach folgendem Boniturschema.

<u>Boniturnote:</u>	<u>Zoosporenbeweglichkeit:</u>
0	Keine Bewegung
1	Kaum noch Beweglichkeit
2	Starke Beeinträchtigung der Bewegung (Zoosporen bewegen sich nur noch im Kreis)
3	Beweglichkeit deutlich vermindert
4	Leiche Beeinträchtigung der Beweglichkeit
5	Bewegung unbeeinflusst

2.5.4 Zoosporenkeimung, Sporenkeimung

Um den Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Keimung und das Keimschlauchwachstum von Zoosporen bzw. Sporen zu bewerten, wurde eine Sporensuspension hergestellt. Je 50 µl dieser Zoosporen- bzw. Sporensuspension wurden auf einen Objektträger mit Vertiefung pipettiert, und mit dem entsprechendem Aliquot des zu untersuchenden Pflanzenextrakt versetzt. Zur Inkubation der Keimung wurden die Objektträger für 24 Stunden in einer Feuchtekammer bei Raumtemperatur belassen, und nach diesem Zeitintervall durch Zugabe von Bengalrosa abgestoppt. Je Wiederholung (n = 4) wurde die Keimung bzw. die Keimschlauchlänge von 25 Zoosporen bzw. Sporen mittels Okularmikrometer mikroskopisch bestimmt.

2.6 Pflanzenphysiologische Untersuchungen

Zur Untersuchung des Stoffwechsels der Versuchspflanzen nach Applikation von Pflanzenextrakten wurde die Chlorophyllfluoreszenz- und die Gaswechselformung eingesetzt. Um tageszeitliche Schwankungen in der Photosynthese der Pflanzen zu berücksichtigen, wurden die Messungen in regelmäßigen Abständen über den Tag verteilt an den Pflanzen der verschiedenen Varianten vorgenommen.

2.6.1 Chlorophyllfluoreszenz

Die Messungen zur Chlorophyllfluoreszenz erfolgten mit dem Chlorophyllfluoreszenz-Meßgerät der Firma Walz, Typ PAM 101. Gemessen wurde nach der Dunkeladaptation der Pflanzen die Chlorophyllfluoreszenz in einem Zeitraum von 15 Minuten. Untersucht wurde die Wirkung von ausgesuchten Pflanzenextrakten sowie der Leerformulierung auf die Chlorophyllfluoreszenz von Weinreben. Die Applikation der Extrakte sowie die der Leerformulierung, erfolgte zwei Tage vor der Messung durch die unter Punkt 2.3.3 beschriebene Methode. Als Kontrolle dienten unbehandelte Pflanzen.

2.6.2 Gaswechsel

Die Messungen des Gaswechsels der Versuchspflanzen erfolgten mit einem Miniküvetten-system, Typ CMS - 400 (Fa. Walz). An dunkeladaptierten Pflanzen wurde der Gaswechsel unter Lichtbedingungen (Assimilation) für 15 Minuten und der Gaswechsel in Dunkelheit (Dissimilation) für 10 Minuten gemessen. Die Meßwerte dienten zur Berechnung der Photosyntheserate und der stomatären Leitfähigkeit der Versuchspflanzen. Untersucht wurde die Wirkung von Pflanzenextrakten nach protektiver Applikation auf den Gaswechsel von Reben der Sorte 'Müller-Thurgau'. Als Vergleich dienten Pflanzen, die mit der Leerformulierung behandelt wurden und Pflanzen, die unbehandelt blieben. Die Applikation der Substanzen erfolgte zwei Tage vor den Messungen.

2.7 Mikroskopische Untersuchungen

2.7.1 Lichtmikroskopie

2.7.1.1 Herstellung von Totalpräparaten

Untersucht wurde die Pathogenentwicklung auf Blattscheiben, die mit ausgesuchten Extrakten behandelt wurden. Von je vier Pflanzen pro Variante erfolgte die Entnahme von 20 Blattscheiben 24 Stunden nach Applikation. Diese wurden anschließend durch Aufsetzen eines 20 µl Tropfens einer Zoosporensuspension von *P. infestans* inokuliert. Nach einer Inkubation für 24 Stunden in Feuchteschalen wurden die Pilzstrukturen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 'Blankophor' angefärbt und anschließend die Keimrate fluoreszenzmikroskopisch (Fa. Leitz, Typ DMRB) bestimmt. Erfasst wurde die Keimrate von je 30 Zoosporen pro Blattscheibe.

Zur Anfertigung von Totalpräparaten aus Myzel wurden 8 mm² große Myzelstücke (aus dem Neuzuwachs des Myzels) mit einem Skalpell aus der zu untersuchenden Agar-Platte herauspräpariert. Diese wurden mit einem Konfokalen Laser – Scan - Mikroskop (Fa. Zeiss, Typ 410) direkt im frischen Zustand ohne zusätzliche Färbung untersucht.

2.7.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen wurden Ultradünnschnitte des Myzels von *Alternaria solani* und *Phytophthora infestans* angefertigt und im Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

2.7.2.1 Herstellung von Schnittpräparaten

2.7.2.1.1 Probenaufbereitung

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurde Pilzmyzel aus dem Randbereich von Agar-Platten verwendet, die den zu untersuchenden Extrakt enthielten. Als Kontrolle diente Myzel, welches auf Platten gewachsen war, die die entsprechende Äthanolkonzentration enthielten. Für die Entnahme der Proben wurden aus den Randbereich der Agar-Platten (Neuzuwachs des Myzels) mit einem Skalpell ca. 8 mm² große Myzelstücke entnommen und in KARNOVSKY - Fixiergemisch fixiert. Hierzu wurden die Proben für ca. 30 Minuten unter Vakuum mit häufigem Druckwechsel im Fixiergemisch infiltriert und nach dem Absinken für

weitere zwei Stunden unter Normaldruck bei Zimmertemperatur belassen. Nach der Fixierung wurden die Proben fünf mal für 10 Minuten mit 0,2 M Natriumcacodylatpuffer gewaschen und für mindestens 12 Stunden bei 4 °C im Natriumcacodylatpuffer infiltriert. Im Anschluß erfolgte eine Nachfixierung bzw. Kontrastierung der Proben in einer Osmiumtetroxidlösung (OsO₄) nach DALTON (1955), modifiziert nach WOHLFAHRT - BOTTERMANN (1957). Nach dieser Fixierung bzw. Kontrastierung wurden die Proben wiederum für je 10 Minuten in Natriumcacodylatpuffer gewaschen (4 Wiederholungen) und in einer aufsteigenden Äthanol - Reihe dehydriert (je 15 min in 30 %, 50 %, 70 % Äthanol und im Anschluß für 20 min in 90% Äthanol sowie zwei mal für je 15 Minuten in 100 % Äthanol). Nach dem Dehydrieren erfolgte ein zweimaliges Infiltrieren der Proben für jeweils 10 Minuten in Propylenoxid sowie anschließend in einer aufsteigenden ERL-Harz / Propylenoxid - Reihe. Hierzu wurden die Proben für mindestens 12 Stunden bei 4 °C einer Lösung in Verhältnis 1 : 3 (ERL-Harz / Propylenoxid) und anschließend für vier Stunden einer Lösung im Verhältnis 1 : 1 und 3 : 1 zugesetzt. Danach erfolgte ein nochmaliges Infiltrieren der Proben für mindestens 12 Stunden bei 4 °C in 100 % ERL-Harz und zum Abschluß ein Überführen der Proben in Flacheinbettungsschalen. Diese wurden zum Polymerisieren für acht Stunden bei 70 °C inkubiert.

Fixierlösung nach KARNOVSKY (1965):

1 Teil 8 % Formaldehydlösung
 1 Teil 8 % Glutaraldehydlösung
 2 Teile 0,2 M Natriumcacodylat -
 Puffer

Natriumcacodylatpuffer:

0,2 M Natriumcacodylat + 4 mM
 CaCl₂. pH 7,3 mit 1 M HCl einstellen

Osmiumtetroxid-Lösung:

1 Teil 4 % OsO₄ in Aqua. dest.
 1 Teil 0,2 M Natriumcacodylatpuffer

ERL-Harz nach SPURR (1969):

10 g ERL-4206 (= Harz)
 6 g DER (= Weichmacher)
 26 g NSA (= Härter)
 0,4 g S-1 (= Beschleuniger)

2.7.2.1.2 Herstellung der Ultradünnschnitte

Nach dem Antrimmen der Harzblöcke wurden auf einem Ultramikrotom mit einem Diamantmesser Ultradünnschnitte in einer Dicke von 60 bis 100 nm angefertigt (SITTE, 1982; 1985). Nach dem Schneiden wurden die Schnitte durch Chloroformdämpfe gestreckt und anschließend auf Pioloform befilmte Kupferschlitzblenden übertragen.

2.7.2.1.3 Kontrastierung

Zur Kontrastierung wurde Uranylacetat, ein gut wasserlösliches Schwermetallsalz, verwendet (BURCK, 1973). Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte durch das Auflegen der Blenden auf einen Tropfen 2 % Uranylacetat in einer dunklen Kammer (ca. 10 Minuten). Danach wurden die Blenden zweimal mit Aqua. dest. gespült und anschließend zur Nachkontrastierung für eine Minute auf einen Tropfen Bleicitratlösung gelegt (REYNOLDS, 1963). Die Schnitte wurden in Grid-Boxen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die Auswertung der Ultradünnschnitte erfolgte mit einem Transmissionselektronenmikroskop Typ EM 109 (Fa. Zeiss, Jena). Für die Potographie wurden 'Agfaorto' Filme mit 25 ASA benutzt.

Bleicitratlösung nach REYNOLDS (1963): 1.33 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + 1,76 g $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$
x 2 H_2O in 30 ml Aqua. dest. pH - Wert
stellen auf 12 mit ca. 8 ml 1N NaOH,
und auf 50 ml mit Aqua. dest. auffüllen.

2.7.3 Analytische Verfahren zur Isolierung und Identifizierung von Pflanzeninhaltsstoffen

2.7.4 Dünnschichtchromatographie

Zur Aufreinigung der Rohextrakte und zum Einengen der wirksamen Substanzen wurden Kieselgelplatten (20 x 20 cm, DC-Alufolien Kieselgel 60 und 60₂₅₄, Fa. Merck, Darmstadt) verwendet. Aufgetragen wurden die Pflanzenextrakte punktuell oder linear (je zehn 100 μl) auf der Startlinie der DC - Platte. Zum Entwickeln der Chromatogramme wurden folgende Laufmittel / -systeme angewandt.

L1	Methanol	100
L2	Äthanol	100
L3	Essigsäureäthylester / Methanol	1 : 4
L4	Essigsäureäthylester / Methanol	1 : 1
L5	Essigsäureäthylester / Methanol	4 : 1
L6	Essigsäureäthylester / Methanol	95 : 5
L7	Essigsäureäthylester	100
L8	Chloroform	100
L9	Benzol	100
L10	Isopropanol	100
L11	Hexan	100
L12	Toluol / Essigsäureäthylester	93 : 7
L13	Essigsäureäthylester / Ameisensäure / Eisessigsäure / Wasser	100 : 11 : 11 : 26

Die Lokalisierung der Substanzen auf den DC - Platten erfolgte mittels Biotest bzw. optischer Detektion.

2.7.4.1 Biotest im Agardiffusionstest

Hierzu wurden die DC - Platten nach dem Entwickeln in der Impfbank aufgestellt, um die Fließmittelreste abdampfen zu lassen und Kontaminationen durch die Luft zu vermeiden.

Anschließend wurden die DC - Platten quer zur Laufstrecke in 1 cm breite Streifen geschnitten. Jeder Streifen wurde nochmals in zwei Stücke geteilt und für je drei Stunden auf einer Kartoffel – Dextrose - Agar Platte inkubiert. Die Inokulation mit *Alternaria solani* erfolgte durch Aufsetzen einer Myzelscheibe (\varnothing 15 mm) auf beiden Seiten der Inkubationsstelle. Desweiteren es erfolgten Bioautographien. Hierzu wurden die DC - Platten nach dem Abdampfen des Laufmittels mit einer dünnen Schicht PDA besprüht und nach dem Antrocknen des Nährmediums mit einer Sporensuspension von *A. solani* inokuliert.

Bonitiert wurden entweder die Hemmung des Myzelwachstums nach sechs bis sieben Tagen oder die Hemmung der Sporenkeimung auf der DC - Platte nach ca. vier bis fünf Tagen. Aus dem Verhältnis der Laufstrecke der Wirksubstanzen (Hemmung des Myzelwachstums bzw. Sporenkeimung) zur Laufstrecke des Fließmittels erfolgte die Berechnung der R_f - Werte.

2.7.4.2 Biochemische Detektionsmethoden

Zur Detektion der Substanzen auf den DC - Platten mittels optischer Methoden wurde neben den oben beschriebenen Biotests gleichzeitig eine Untersuchung der Platten mit den folgenden Methoden vorgenommen. Hierzu wurden DC - Platten verwendet, die zur selben Zeit mit dem für den Biotest eingesetzten Platten entwickelt wurden.

- Fluoreszenzlöschung bei 254 nm
- Fluoreszenz bei 366 nm
- Anfärben mit Sprühreagenzien (Fa. Merck, Darmstadt)

Rhodamin B

Molybdatophosphorsäure

Ninhydrin

Vanillin - Schwefelsäure

Naturstoffreagenz (WAGNER & BLADT, 1997)

Die Färbung der Substanzen durch Molybdatophosphorsäure und Vanillin - Schwefelsäure wurde nach Erhitzen der DC - Platte auf 80 bis 100 °C bestimmt.

2.7.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Auffindung und Isolierung der wirksamen Substanzen in ausgesuchten Pflanzenextrakten wurde ein Hochdruckflüssigkeitschromatograph ('Serie HP 1050' der Firma Hewlett Packard, Bad Homburg) eingesetzt (Tab. 5).

Tab 5: Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) Betriebsdaten (Serie HP 1050, Fa. Hewlett Packard) für die Auffindung und Isolierung wirksamer Substanzen aus Pflanzenextrakten.

System-Komponenten	System-Kennziffern
Detektor	Dioden-Array-Detektor Messung bei 210 bis 500 nm
Mobile Phase	Demineralisiertes Wasser / Acetonitril (Abb. 3)
Stationäre Phase	RP18 Fa. Merk, Darmstadt
Säulenheizung	45 °C
Injektor	5 – 100 µl
Pumpe	Quaternäres Pumpensystem Fluß: 0,75 ml / min.

Die Steuerung der HPLC erfolgte über die Software HP Chem. 3.21 (Fa. Hewlett Packard, Bad Homburg). Die in der Dünnschichtchromatographie identifizierten Fraktionen wurden aus den Kieselgelplatten herausgelöst und in 1ml Äthanol aufgenommen. Vor dem HPLC - Lauf wurden die Lösungsmittel Sterilfiltriert.

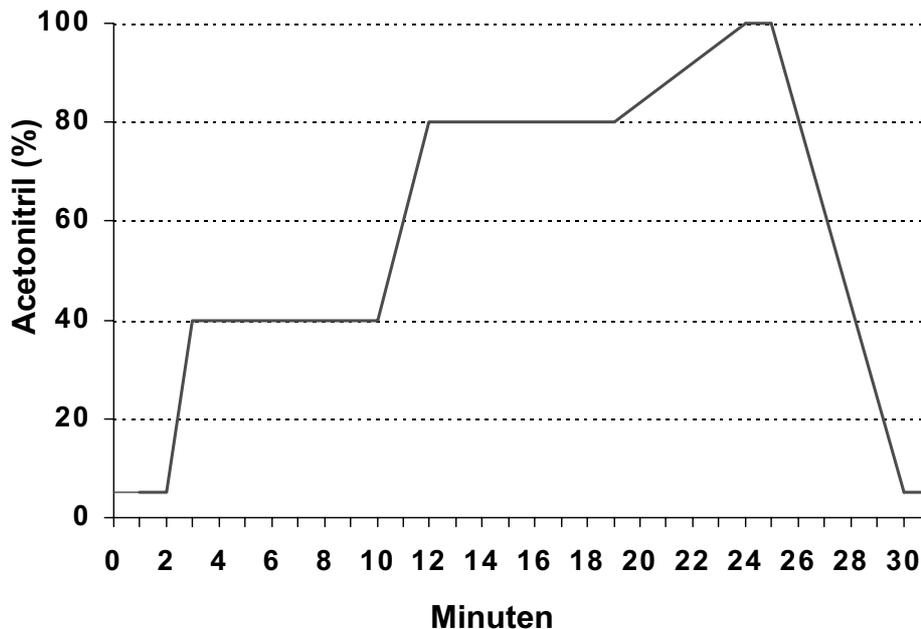


Abb. 3: Laufmittel Mischungsverhältnis über die Zeit des HPLC - Laufs.

2.7.6 Gaschromatographie mit Massenspektroskopie (GC - MS)

Die Identifikation der wirksamen Substanzen aus dem Extrakt von *Salvia officinalis* erfolgten mittels GC - MS Technik. Zur besseren Detektion der Substanzen wurde eine Derivatisierung der Proben durch Zugabe von N,O - Trimethylsilyl - trifluor - acetamid (BSTFA; Fa. Supelco) durchgeführt. Hierzu wurden je 100 µl der Probe unter Stickstoff eingedampft und anschließend mit 40 µl BSTFA versetzt. Nach einer Inkubation von einer Stunde in Trockenschrank bei 70 °C wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Die Messung erfolgte mit einem Delsi Nermag - GC (Fa. Unicam) in Verbindung mit einem Automass 100 - Massenspektrometer. Injiziert wurden 2 µl der derivatisierten Probe unter Einsatz eines Splitmodus (1 : 20). Als Trägergas wurde Helium (1 bar) und als Säule eine Ultra-2-Kapillarsäule der Fa. Hewlett Packard (5 % Phenyyl - Methylpolysiloxan, Länge 25 m, Durchmesser 0,2 mm) verwendet. Die Ionisationsenergie betrug 70 eV. Das Temperaturprogramm (nach SCHULZ *et al.* 1994) lautete wie folgt:

00 – 02 min	100 °C	
02 – 27 min	auf 200 °C	in 4 °C / min
27 – 31 min	200 °C	
31 – 51 min	auf 280 °C	in 4 °C / min
51 – 61 min	280 °C	

Die Massenspektren wurden mit der NSR-base – Bibliothek in dem Programm LUCY 2.1 verglichen. Eine Substanz galt als identifiziert, wenn Massenspektrum und Retentionszeit übereinstimmten.

2.8 Freilandversuche

Während der Vegetationsperiode 1996 und 1997 wurden Freilandversuche auf den Versuchsfeldern des Instituts für Pflanzenkrankheiten in Bonn - Poppelsdorf und Meckenheim durchgeführt. Weiterhin erfolgte 1997 ein Freilandversuch in einer Rebanlage der Staatlichen Weinbaudomäne Marienthal an der Ahr.

2.8.1 Kraut- und Braunfäule an Tomate

2.8.1.1 Versuchsanlage

Der Freilandversuch an Tomaten der Sorte 'Rheinlands Ruhm' wurde in der Vegetationsperiode 1996 als Blockanlage von 24 Kleinparzellen zu je sechs Pflanzen angelegt (Abb. 4). Der Pflanzabstand der Tomaten betrug 50 cm, der Reihenabstand 1 m. Die Extrakte wurden in einer Konzentration von 2 % (TS) unter Zugabe von TWEEN® 20 (0,0125 %) als Netzmittel ausgebracht. Als Standard diente der Wirkstoff *Dichlofluanid* in einer Konzentration von 1000 ppm a.i. Untersucht wurde die Wirkung der Pflanzenextrakte aus *Potentilla erecta*, *Salvia officinalis*, *Cinnamomum camphora* und *Origanum vulgare* in vier Wiederholungen.

2.8.1.2 Versuchsdurchführung

Die Applikation der Extrakte erfolgte als protektive Spritzung im wöchentlichen Abstand mit einer Wasseraufwandmenge von 500 ml pro Parzelle. Die Ausbringung der Extrakte erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Rückenspritze der Fa. Gloria, Wadersloh, Typ 141 T bei einem Spritzdruck von 1,5 bar. Die Inokulation des Versuchs erfolgte einen Tag nach der ersten Applikation mit einer Zoosporensuspension von *Phytophthora infestans* (8×10^4 Zoosporen / ml).

Im Abstand von sieben Tagen wurden acht Bonituren durchgeführt, bei denen der jeweilige prozentuale Befall der Parzellen geschätzt wurde. Aus dem Mittelwert der vier Parzellen pro Variante erfolgte die Berechnung des Wirkungsgrads nach ABBOTT (1925).

K	1	2	3	4	5
5	3	4	1	2	K
1	2	3	5	3	1
4	K	5	2	1	3

Abb. 4: Versuchsanlage für den Freilandversuch zur Wirkung von Pflanzenextrakten gegen *Phytophthora infestans* an Tomaten ‘Rheinlands Ruhm’ (jedes Rechteck entspricht einer Kleinparzelle von sechs Pflanzen; K = Kontrolle, 1 = *Potentilla erecta*, 2 = *Salvia officinalis*, 3 = *Cinnamomum camphora*, 4 = *Origanum vulgare* und 5 = *Dichlofluamid*).

2.8.2 Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln

2.8.2.1 Versuchsanlage

Der Freilandversuch (1997) an Kartoffeln der Sorte ‘Cilena’ erfolgte in einer Blockanlage von 36 Kleinparzellen zu je 4 Reihen à 10 Pflanzen pro Parzelle (Abb. 5). Der Pflanzabstand der Kartoffeln betrug 60 cm und der Reihenabstand 1 m. Die Applikation der Extrakte erfolgte in einer Konzentration von 1 % (TS) unter Zusatz von TWEEN® 20 (0,0125 %) als Netzmittel. Als Standard diente eine Fungizidvariante, welche viermal mit unterschiedlichen Fungiziden in der üblichen Aufwandmenge behandelt wurde.

2.8.2.2 Versuchsdurchführung

Die Applikation der Extrakte erfolgte als protektive Spritzung im wöchentlichen Abstand mit einer Wasseraufwandmenge von 2,5 l pro Parzelle. Die Ausbringung der Extrakte erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Rückenspritze (Fa. Gloria) bei einem Spritzdruck von 3 bar. Die Infektion mit *Phytophthora infestans* erfolgte durch das im Freiland vorhandene Inokulum. Im Abstand von sieben Tagen wurden vier Bonituren durchgeführt, bei denen der jeweilige prozentuale Befall der Parzellen geschätzt wurde. Aus dem Mittelwert der vier Parzellen pro Variante erfolgte die Berechnung des Wirkungsgrades nach ABBOTT (1925).

1	2						8	9
		9	8	2		1		
			8	1	9	2		
9	8						2	1

Abb. 5: Versuchsanlage des Freilandversuches zur Wirkung von Pflanzenextrakten gegen *Phytophthora infestans* an Kartoffeln ‘Cilena’ (jedes Rechteck entspricht einer Kleinparzelle von vier Reihen à 10 Pflanzen; Nr. 1 = unbehandelt, 2 = Fungizidvariante, 8 = *Salvia officinalis*, 9 = *Potentilla erecta*).

2.8.2.3 Ertragsermittlung

Die Freilandversuche auf den Standorten ‘Poppelsdorf’ und ‘Meckenheim’ wurden beerntet. Die Ernte der Knollen erfolgte mit praxisüblichen Maschinen. Ermittelt wurden die Erträge pro Parzelle einer Variante.

2.8.3 Grauschimmel an Erdbeere

2.8.3.1 Versuchsanlage

Der Freilandversuch an Erdbeeren der Sorte ‘Korona’ in der Vegetationsperiode 1996 wurde in einer Blockanlage von 25 Kleinparzellen zu je 20 Pflanzen in zwei Reihen angelegt (Abb. 6). Der Pflanzabstand der Erdbeeren betrug 30 cm, der Reihenabstand 80 cm. Die Extrakte wurden in einer Konzentration von 2 % (TS) unter Zugabe von TWEEN® 20 (0,0125 %) als Netzmittel ausgebracht. Eine Fungizidbehandlung wurde nicht durchgeführt, da das Feldstück ökologisch bewirtschaftet wurde. Untersucht wurde die Wirkung der Pflanzenextrakte aus *Galium aparine* und *Salvia officinalis* in je fünf Wiederholungen.

2.8.3.2 Versuchsdurchführung

Mit Beginn der Blüte (10 % Blüten geöffnet) erfolgten vier Applikationen der Extrakte in wöchentlichem Abstand. Die Ausbringung erfolgte mit einer modifizierten Rückenspritze der Fa. Gloria, bei einem Druck von 3 bar. Ausgebracht wurden je 500 ml der 2 %-igen Pflanzenextrakte pro Parzelle. Bonitiert wurde mit Beginn der Fruchtreife im Abstand von vier bis sieben Tagen je nach Witterung.

1	K	2		2
		K	1	
K		2		K
	1		K	
2		1	2	1

Abb. 6: Versuchsanlage für den Freilandversuch zur Wirkung von Pflanzenextrakten gegen *Botrytis cinerea* an Erdbeeren ‘Korona’ (Jedes Rechteck entspricht einer Kleinparzelle von 20 Pflanzen in zwei Reihen; K = Kontrolle, 1 = *Galium aparine*, 2 = *Salvia officinalis*). Erfasst wurden die Zahl und das Gewicht der gesunden sowie der kranken Erdbeeren pro Variante. Aus dem Mittelwert der Boniturnwerte sowie den Mittelwerten von fünf Parzellen pro Variante erfolgte die Berechnung des Wirkungsgrads nach ABBOTT (1925).

2.8.4 Falscher Mehltau an Weinreben

2.8.4.1 Versuchsanlage

Der Freilandversuch (1997) an Weinreben der Sorte ‘Müller-Thurgau’ wurde in einer Blockanlage von 16 Kleinparzellen zu je 12 Pflanzen angelegt (Abbildung. 7). Der Pflanzabstand der Reben betrug 1 m, der der Pflanzreihe 1,8 m. Die Erziehung erfolgte als Rundbogen an Drahtrahmen. Die Extrakte wurden in einer Konzentration von 2 % (TS) unter Zugabe von TWEEN[®] 20 (0,0125 %) als Netzmittel ausgebracht. Als Standard diente eine konventionelle Fungizidvariante (Netzschwefel und Dithane Ultra[®], Dorado[®] und Folicur[®], Aliette[®] und Dorado[®]) in der üblichen 14 - tägigen Spritzfolge.

2.8.4.2 Versuchsdurchführung

Die Applikation der Extrakte erfolgte als protektive Spritzung im siebentägigen Abstand mit einer Wasseraufwandmenge von 2,5 Liter pro Parzelle. Die Ausbringung der Pflanzenextrakte erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Rückenspritze der Fa. Gloria bei einem Spritzdruck von 3 bar. Im Abstand von sieben Tagen wurden acht Bonituren durchgeführt, bei denen der jeweilige prozentuale Befall der Parzellen geschätzt wurde. Aus dem Mittelwert der vier Parzellen pro Variante erfolgte die Berechnung des Wirkungsgrads nach ABBOTT (1925).

1	3	2	3		K	1
		1	K	2	3	2
K	2	3		1		K

Abb. 7: Versuchsanlage des Freilandversuches zur Wirkung von Pflanzenextrakten gegen *Plasmopara viticola* an Weinreben ‘Müller-Thurgau’ (Jedes Rechteck entspricht einer Kleinparzelle von 12 Pflanzen; K = Kontrolle, 1 = *Potentilla erecta*, 2 = *Salvia officinalis* 3 = *Potentilla erecta* und *Salvia officinalis*).

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem SigmaStat - Programm, Version 2.2 (Fa. Jandel Scientific Software, San Rafael, USA) durchgeführt. Die Meßwerte wurden durch multifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verrechnet. Signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden mit dem TUKEY - Test (Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$) bestimmt und durch entsprechende Buchstaben in den Tabellen und Diagrammen kenntlich gemacht.

Die Berechnung der Dosis – Wirkungs - Beziehungen erfolgte durch eine nicht lineare Regression mit der Formel $Y=[1-EXP(-(\log(X)/X_c)^b)] \times 100$ (ORTEGA *et al.* 1997). Die Regressionen wurden mit dem Programm ‘BFIT’ (Mathematisches Seminar, Universität Bonn) berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Vorkommen wirksamer Pflanzenextrakte

Die Suche nach Naturstoffen mit fungizider Wirkung kann grundsätzlich mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt werden. Erstens besteht die Möglichkeit, die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten *in vitro* zu untersuchen und zweitens, ihre Wirkung an der Pflanze zu erheben.

3.1.1 Einfluß von Pflanzenextrakten auf das Wachstum phytopathogener Pilze

In vitro - Untersuchungen stellen eine geeignete Methode dar, effizient eine große Anzahl von Substanzen auf ihre Wirksamkeit gegen pflanzenpathogene Pilze zu untersuchen. Ermittelt wurde der Einfluß der unter Punkt 2.3.1 beschriebenen Pflanzenextrakte auf das Myzelwachstum von ausgewählten phytopathologisch relevanten Pilzen.

3.1.1.1 Test mit Pflanzenextrakten auf Filterpapierscheiben

Der Einfluß der Pflanzenextrakte auf das Myzelwachstum der Erreger wurde *in vitro* mit einer Untersuchungsmethode auf Filterpapierscheiben in vierfacher Wiederholung überprüft. In jeder der vier Petrischalen pro Variante wurde der Extrakt in den Verdünnungsstufen 1; 2,5; 5 und 10 % bezogen auf die Trockensubstanz des Pflanzenmaterials getestet.

Die mit Wasser behandelten Kontrollen wurden mit Boniturnoten von 1,0 bis 1,5 bonitiert, d.h. sie waren fast vollständig mit Myzel überwachsen. Die Lösungsmittelkontrollen unterschieden sich nicht von den mit Wasser behandelten. Der Wirkstoff *Dichlofluamid* (Euparen[®] WG 50) führte, in der Konzentration von 50 ppm a.i., zu einer starken Hemmung des Myzelwachstums. Die behandelten Filterpapierscheiben blieben frei von Myzel und es bildete sich ein ca. 1-2 mm breiter Hemmhof. Die Applikation der Pflanzenextrakte führte zu keiner Beeinträchtigung des Myzelwachstums der Pathogene *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Microdochium nivale*, *Pythium ultimum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Cochliobolus sativus* und *Phytophthora infestans*.

3.1.1.2 Tests mit Pflanzenextrakten in Agar

Zur Überprüfung der im ersten Test gewonnenen Ergebnisse erfolgte ein weiterer *in vitro*-Test. Hierzu wurden die Pflanzenextrakte dem Nährmedium (Kartoffel-Dextrose-Agar) in einer Endkonzentration von 0,5 % TS zugesetzt. Nach 24 Stunden wurde der Test durch Aufsetzen eines Impfstückes (Ø 15 mm) des jeweiligen Pathogens inokuliert.

Als besonders wirksam gegen *A. solani* erwiesen sich Extrakte aus *Cinnamomum camphora*, *Rosa canina* (Frucht), *Potentilla anserina*, *Viola tricolor* und *Potentilla erecta* (Abb. 8). Sie verminderten das Myzelwachstum zu über 90 %. Gegen *B. cinerea* zeigten über die Hälfte der getesteten Pflanzenextrakte eine deutliche Hemmung des Myzelwachstums von mehr als 90 % (Tab. 6). Durch die Applikation des Extraktes aus *Solidago serotina* konnte das Myzelwachstum vollständig unterbunden werden. Eine Wirksamkeit von über 80 % gegen das Myzelwachstum von *C. sativus* zeigten Extrakte aus *Aesculus hippocastanum* (Frucht und Fruchtfleisch), *Armoracia rusticana*, *Rosa canina* (Frucht), *Gentiana lutea* und *Heracleum sphondylium* (Samen). Einige der untersuchten Extrakte zeigten andererseits eine deutlich fördernde Wirkung auf des Myzelwachstum (Tab. 6).

Eine Verminderung vom Myzelwachstum des bodenbürtigen Erregers *M. nivale* zu über 90 % zeigte sich bei über einen Drittel der untersuchten Extrakte. Zwölf weitere Extrakte vermochten das Wachstum um mehr als 70 % zu reduzieren (Tab. 7). Untersuchungen zur Wirkung der Pflanzenextrakte gegen *P. ultimum* erbrachten, daß mehr als ein Drittel der Extrakte das Myzelwachstum zu mehr als 90 % verminderten (Tab. 7). Durch die Applikation des Extraktes aus *Melaleuca alternifolia* konnte eine vollständige Unterdrückung des Myzelwachstum erzielt werden.

Gegen *R. solani* zeigten eine Vielzahl der untersuchten Extrakte wachstumsfördernde Eigenschaften. Nur die Extrakte aus *Melaleuca alternifolia*, *Heracleum sphondylium* (Samen) und *Wisteria floribunda* verursachten eine deutliche Hemmung des Myzelwachstums (Tab. 7). Über ein Viertel der Extrakte bewirkte eine Hemmung des Erregers *G. graminis* zu über 90 % (Tab. 7). Eine vollständige Hemmung des Myzelwachstums konnte nach Applikation der Extrakte aus *Calendula officinalis*, *Heracleum sphondylium* (Samen), *Imperatoria ostruthium*, *Pimenta dioica* und *Solidago serotina* ermittelt werden.

Eine Hemmung des Myzelwachstums von allen sieben geprüften Pathogenen konnte nur durch die Applikation des Extraktes aus *Heracleum sphondylium* (Samen) beobachtet werden.

Tab. 6: Wirksamkeit äthanolischer Pflanzenextrakte im Myzelwachstumstest gegenüber *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* und *Cochliobolus sativus* *in vitro* (0,5 % Extrakt in Kartoffel-Dextrose-Agar; grau hinterlegte Zeilen kennzeichnen eine Wirkung > 70 %; wf. = wachstumsfördernd).

Pflanzenextrakt	Hemmung des Myzelwachstums (%)		
	<i>A. solani</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>C. sativus</i>
Leerformulierung	0	0	0
<i>Aesculus hippocastanum</i> - Blatt	70	92	52
<i>Aesculus hippocastanum</i> - Frucht	85	82	95
<i>Aesculus hippocastanum</i> - Fruchtfleisch	86	95	94
<i>Alchemilla vulgaris</i>	88	30	49
<i>Armoracia rusticana</i>	70	0	85
<i>Calendula officinalis</i>	62	91	79
<i>Carum carivi</i>	56	96	wf.
<i>Cinnamomum camphora</i>	96	95	16
<i>Datura stramonium</i>	55	99	25
<i>Datura suavenolens</i>	43	82	wf.
<i>Echinaceae pupureae</i>	7	0	wf.
<i>Rosa canina</i> - Frucht	93	0	84
<i>Rosa canina</i> - Samen	36	0	25
<i>Galium aparine</i>	35	98	wf.
<i>Gentiana lutea</i>	76	98	92
<i>Ginkgo biloba</i>	89	95	59
<i>Heracleum sphondylium</i> - Blatt	21	0	wf.
<i>Heracleum sphondylium</i> - Samen	78	99	94
<i>Imperatoria ostruthium</i>	83	99	52
<i>Matricaria chamomille</i>	76	98	20
<i>Melaleuca alternifolia</i>	88	99	wf.
<i>Melilotus officinalis</i>	74	98	wf.
<i>Origanum vulgare</i>	86	99	52
<i>Pelargonium oderatissimum</i>	86	73	wf.
<i>Pimenta dioica</i>	89	97	wf.
<i>Potentilla anserina</i>	91	99	wf.
<i>Potentilla erecta</i>	95	87	77
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	83	85	69
<i>Rheum rhabarbarum</i>	36	81	19
<i>Salvia officinalis</i>	88	99	48
<i>Satureja hortensis</i>	64	93	wf.
<i>Solidago serotina</i>	70	100	65
<i>Tagetes erecta</i>	44	70	41
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	31	0	wf.
<i>Viola tricolor</i>	91	96	14
<i>Wisteria floribunda</i>	66	99	28
Dichlofluanid 100 ppm a.i.	100	98	100

Tab. 7: Wirksamkeit von äthanolischen Pflanzenextrakten im Myzelwachstumstest gegenüber den bodenbürtigen Schadpilzen *Microdochium nivale*, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* und *Gaeumannomyces graminis* (0,5 % Extrakt im Kartoffel-Dextrose-Agar; grau hinterlegte Zeilen kennzeichnen eine Wirkung > 70 %; wf. = wachstumsfördernd).

Pflanzenextrakte	Hemmung des Myzelwachstums (%)			
	<i>M. nivale</i>	<i>P.ultimum</i>	<i>R. solani</i>	<i>G. graminis</i>
Leerformulierung	0	0	0	0
<i>Aesculus hippocastanum</i> - Blatt	97	94	71	99
<i>Aesculus hippocastanum</i> - Frucht	99	84	49	74
<i>Aesculus hippocastanum</i> -Frucht- fleisch	97	0	50	99
<i>Alchemilla vulgaris</i>	97	93	12	20
<i>Armoracia rusticana</i>	66	7	wf.	28
<i>Calendula officinalis</i>	74	53	wf.	100
<i>Carum carivi</i>	71	0	wf.	51
<i>Cinnamomum camphora</i>	95	0	18	61
<i>Datura stramonium</i>	30	99	27	71
<i>Datura suavevolens</i>	80	28	wf.	67
<i>Echinaceae pupureae</i>	0	0	wf.	Wf.
<i>Rosa canina</i> -Frucht	82	44	wf.	45
<i>Rosa canina</i> -Samen	77	0	wf.	2
<i>Galium aparine</i>	42	68	wf.	49
<i>Gentiana lutea</i>	92	55	wf.	57
<i>Ginkgo biloba</i>	87	74	wf.	81
<i>Heracleum sphondylium</i> - Blatt	92	14	wf.	93
<i>Heracleum sphondylium</i> - Samen	99	84	97	100
<i>Imperatoria ostruthium</i>	94	80	48	100
<i>Matricaria chamomille</i>	74	94	79	86
<i>Melaleuca alternifolia</i>	87	100	100	48
<i>Melilotus officinalis</i>	76	0	wf.	48
<i>Origanum vulgare</i>	94	0	73	84
<i>Pelargonium oderatissimum</i>	90	99	10	65
<i>Pimenta dioica</i>	95	6	43	100
<i>Potentilla anserina</i>	92	97	26	93
<i>Potentilla erecta</i>	98	97	wf.	90
<i>Reynoutria sachalinensis</i>	97	92	37	27
<i>Rheum rhabarbarum</i>	59	99	43	70
<i>Salvia officinalis</i>	88	83	54	88
<i>Satureja hortensis</i>	87	6	6	89
<i>Solidago serotina</i>	81	96	73	100
<i>Tagetes erecta</i>	62	77	44	71
<i>Trigonella foenum-graecum</i>	93	17	13	64
<i>Viola tricolor</i>	81	9	wf.	63
<i>Wisteria floribunda</i>	39	92	88	99
Dichlofluanid 100 ppm a.i.	58	100	100	100

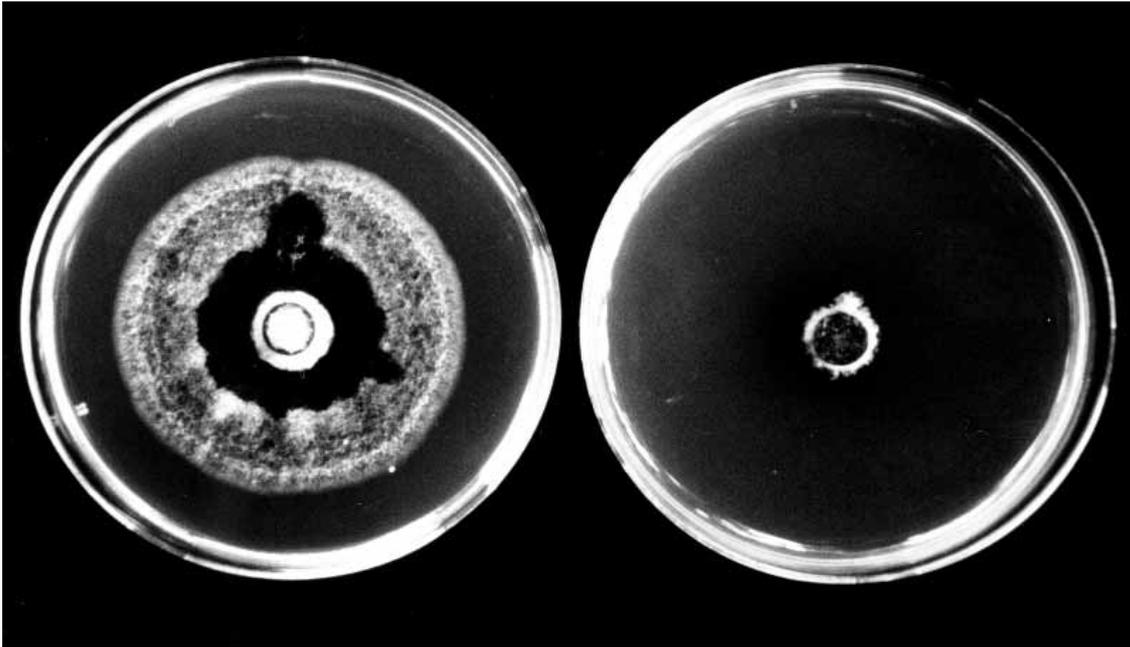


Abb. 8: Einfluß eines 0,5 %-igen Pflanzenextraktes aus *Potentilla erecta* auf das Myzelwachstum von *Alternaria solani* (rechts behandelt, links Leerformulierung).

Die Extrakte aus der Frucht und dem Fruchtfleisch von *Aesculus hippocastanum* hemmten deutlich das Wachstums von *A. solani*, *B. cinerea*, *C. sativus* und *M. nivale*, jedoch nicht das von *P. ultimum*. Der Extrakt aus *E. pupureae* zeigte bei keinem der getesteten Pathogene eine Hemmung des Myzelwachstums (Tab. 6 und 7).

3.1.2 Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Entwicklung von pilzlichen Krankheiten

Um die Wirksamkeit der Extrakte an der Pflanze zu verifizieren und um ihre Wirkung auch gegen obligat biotrophe Schadpilze zu untersuchen, wurde der Einfluß der Extrakte in unterschiedlichen Wirt-Pathogen-Modellen untersucht. Die Applikation erfolgte in allen Prüfsystemen protektiv mit 1 %-igen Extrakten unter Zugabe von TWEEN[®] 20 als Netzmittel (siehe 2.3.3.1.1). Nach einer Inkubation von 24 Stunden erfolgte die Inokulation mit den jeweiligen Pathogenen.

3.1.2.1 Kraut- und Braunfäule (*Phytophthora infestans*) an Tomate

Die unter Punkt 2.3.1 aufgeführten Pflanzenextrakte wurden auf ihre Wirkung gegen die Kraut- und Braunfäule an Jungpflanzen der Tomatensorte 'Rheinlands Ruhm' untersucht.

Der Befall der unbehandelten Tomaten lag im Mittel der vier Wiederholungen bei 93 % und der der fungizidbehandelten bei 5 %. Wie aus Tabelle 8 ersichtlich, zeigten die Pflanzenextrakte eine sehr unterschiedliche Wirksamkeit gegen *P. infestans*. Acht der untersuchten Pflanzenextrakte erreichten im Mittel der Versuche einen Wirkungsgrad von über 70 %. Als besonders wirksam erwiesen sich Extrakte aus *Potentilla erecta*, *Salix* spp. und *Salvia officinalis*. Die Applikation des Extraktes aus *Potentilla erecta* minderte den Befall im Vergleich zu unbehandelt um 90 % und zeigte eine ähnlich gute Wirksamkeit wie der als Standard mitgeprüfte Wirkstoff *Dichlofluanid* (50 ppm a.i; Abb. 9). Behandlungen mit den Extrakten aus *Heracleum sphondylium* (Samen und Blatt) zeigten in allen Versuchen deutliche phytotoxische Effekte. Dies äußerte sich in starken nekrotischen Blattflecken 24 Stunden nach der Applikation.

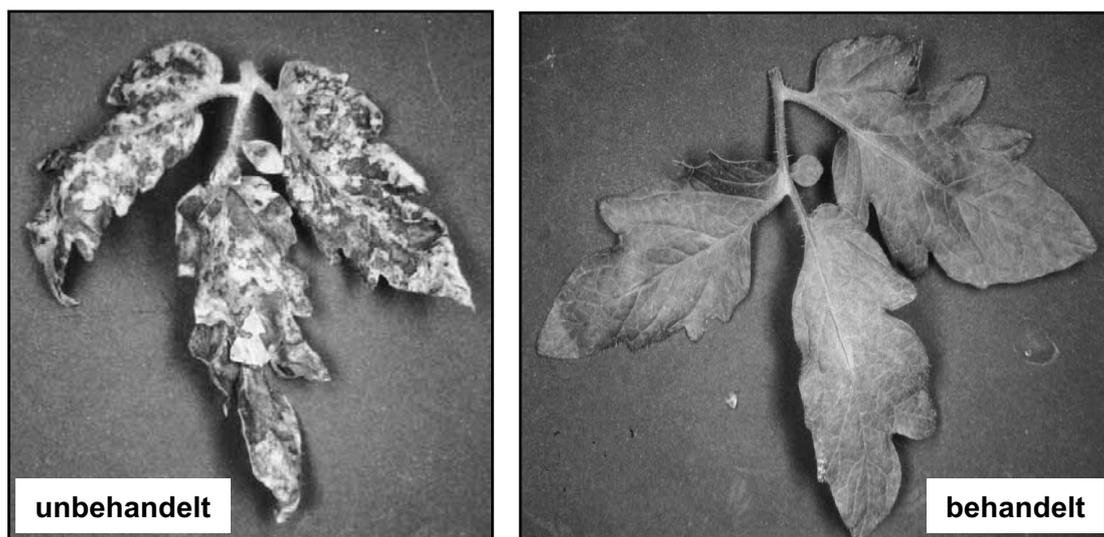


Abb. 9: Einfluß einer protektiven Spritzapplikation des Extraktes aus *Potentilla erecta* (1 % TS) auf den Befall von Tomaten mit *Phytophthora infestans*.

3.1.2.2 Falscher Mehltau (*Plasmopara viticola*) an Weinreben

Untersuchungen zur Wirksamkeit der Pflanzenextrakte im Wirt-Pathogen-Modell *P. viticola* an Weinreben zeigten, daß über ein Drittel der untersuchten Pflanzenextrakte den Befall der Pflanzen verminderten. Achtzehn der getesteten Extrakte reduzierten den Befall zu über 70 % (Tabelle 9). Die höchste Wirksamkeit in diesem Wirt-Pathogen-Modell zeigten Extrakte aus *Salvia officinalis*, *Potentilla erecta* (Abb. 10) und *Aesculus hippocastanum* (Fruchtfleisch).



Abb. 10: Einfluß einer protektiven Spritzapplikation von Pflanzenextrakten (1 % TS) auf den Befall von Weinreben mit *Plasmopara viticola* (links Leerformulierung, Mitte *Potentilla erecta*, rechts *Trigonella foenum-graecum*).

Sie reduzierten den Befall im Mittel der vier Versuche um mindestens 90 %. Durch die Applikation des Extraktes aus *Salvia officinalis* konnte ein ähnlich hoher Wirkungsgrad erzielt werden (95 %) wie der des fungiziden Wirkstoffes *Dichlofluanid* in einer Konzentration von 50 ppm a.i. (96 %).

Die Behandlung der Pflanzen mit dem Extrakt aus *Heracleum sphondylium* (Samen) führte in allen Versuchen zu starken phytotoxischen Nebenwirkungen. Dies hatte in manchen Fällen einen vollständigen Blattverlust der Pflanzen zur Folge.

3.1.2.3 Bohnenrost (*Uromyces phaseoli*) an Bohne

Die Applikation der unter 2.3.1. beschriebenen Pflanzenextrakte gegen den Erreger des Bohnenrosts zeigte, daß nur ein Viertel der untersuchten Extrakte zu einer Befallsreduktion an Bohnen führte (Tab. 10). Fünf der untersuchten Extrakte erreichten Wirkungsgrade von über 60 % gegenüber unbehandelt. Die deutlichste Wirkung konnte durch die Applikation der Extrakte aus *Potentilla erecta* und *Salvia officinalis* erzielt werden (Abb. 11). Sie erreichten im Mittel der Versuche einen Wirkungsgrad von 76 %. Der Befall der unbehandelten Pflanzen lag im Durchschnitt der Versuche bei 112 Pusteln pro cm², die Befallsreduktion durch den als Standard mit geprüften Wirkstoff *Propineb* (50 ppm a.i.) bei 95 %. Die Behandlung der Versuchspflanzen mit dem Extrakt aus *Heracleum sphondylium* führte auch in diesem Wirt-Pathogen-Modell zu deutlichen phytotoxischen Reaktionen.

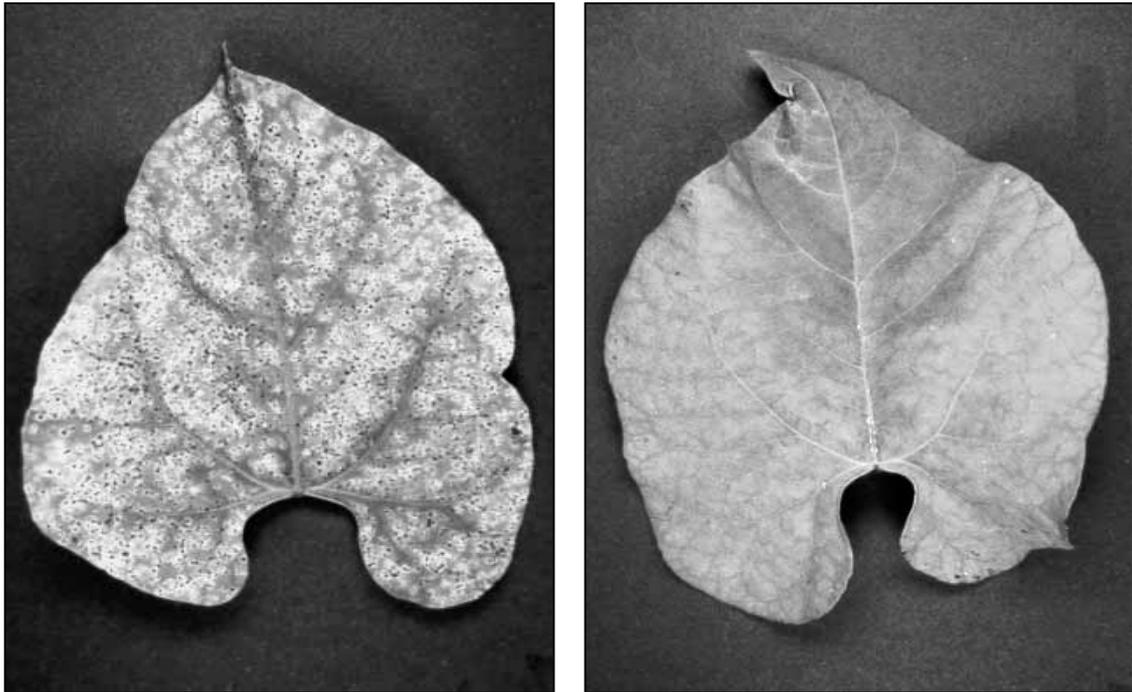


Abb. 11: Einfluß einer protektiven Spritzapplikation von Pflanzenextrakten (1 % TS) auf den Befall von Bohnen mit *Uromyces phaseoli* (links Leerformulierung, rechts *Potentilla erecta*).

3.1.2.4 Echter Mehltau (*Erysiphe graminis*) an Winterweizen

Untersuchungen zur Wirksamkeit der unter Punkt 2.3.1. aufgeführten Pflanzenextrakte gegen den obligat biotrophen Erreger *Erysiphe graminis* erfolgten an Primärblättern von Winterweizen. Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, erreichte nur die Applikation des Extraktes aus *Reynoutria sachalinensis* (eigene Präparation) eine Befallsminderung von 80 %. Die Extrakte aus *Reynoutria sachalinensis* (Milsana[®]; Fa. Compo) und *Rheum rhabarbarum* führten zwar auch im Mittel der Versuche zu deutlichen Befallsreduktionen, zeigten aber mit 68 und 60 % deutlich niedrigere Wirkungsgrade. Die Wirksamkeit der übrigen Pflanzenextrakte lag in einem Bereich von 4 - 25 %. Nach Applikation des Extraktes aus *Heracleum sphondylium* (Samen) konnte ein deutlicher phytotoxischer Effekt beobachtet werden.

3.1.2.5 Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) an Paprika

An Paprika der Sorte 'Yolo Wonder B' wurden die unter 2.3.1 beschriebenen Pflanzenextrakte auf ihre Wirksamkeit gegen *B. cinerea* überprüft.

Der Befall der unbehandelten Pflanzen lag im Mittel der vier Versuche bei 84 %, der Wirkungsgrad des Vergleichsfungizids *Dichlofluanid* in einer Konzentration von 50 ppm a.i. bei

95 %. Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, führten 16 der geprüften Extrakte zu einer Befallsreduktion von über 50 %. Durch die Applikation der Extrakte aus *Salvia officinalis*, *Potentilla erecta*, *Pimenta dioica* und *Salix* spp. konnte der Befall der Paprikapflanzen mit *B. cinerea* zu über 80 % vermindert werden. Am wirksamsten waren Behandlungen mit den Extrakten aus *S. officinalis* (Abb. 12) und *P. erecta*. Sie erreichten Wirkungsgrade von 95 bzw. 90 % und zeigten somit ähnlich gute Befallsreduktionen wie der Wirkstoff *Dichlofluanid* (95 %).

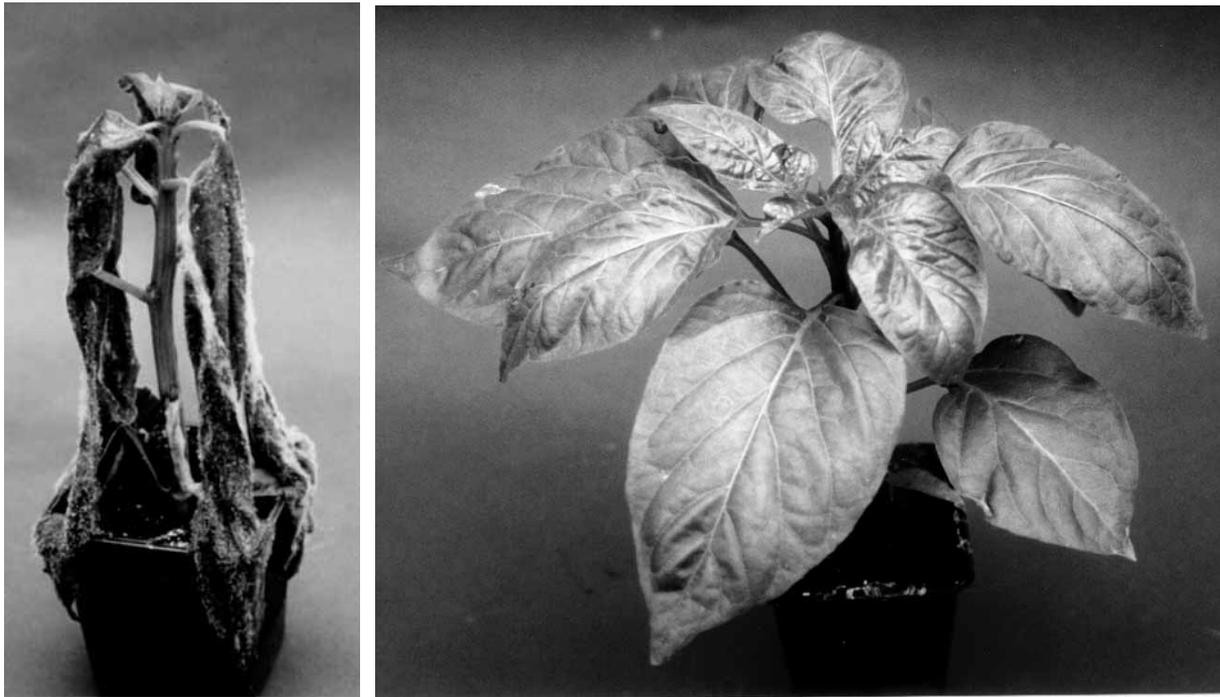
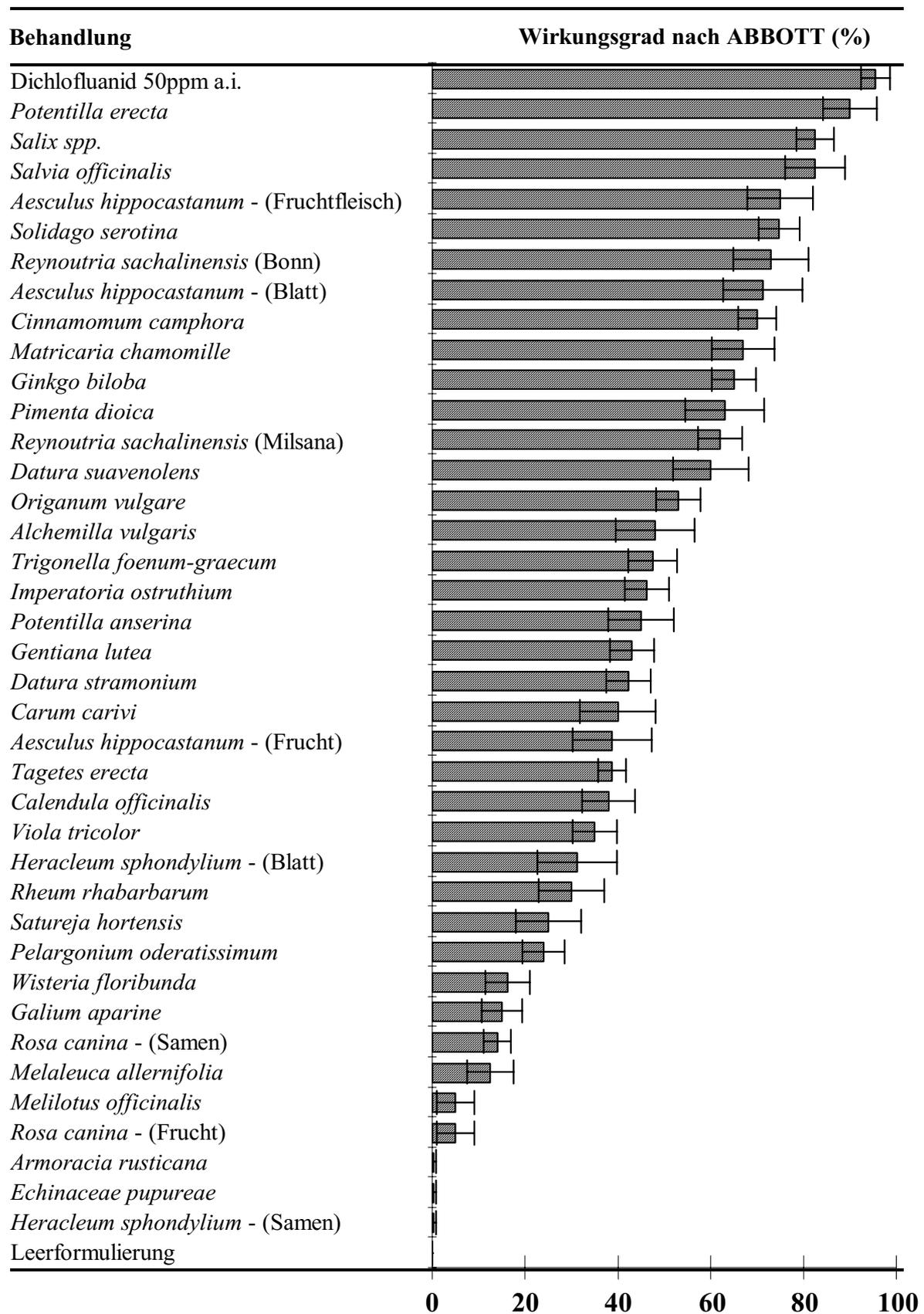
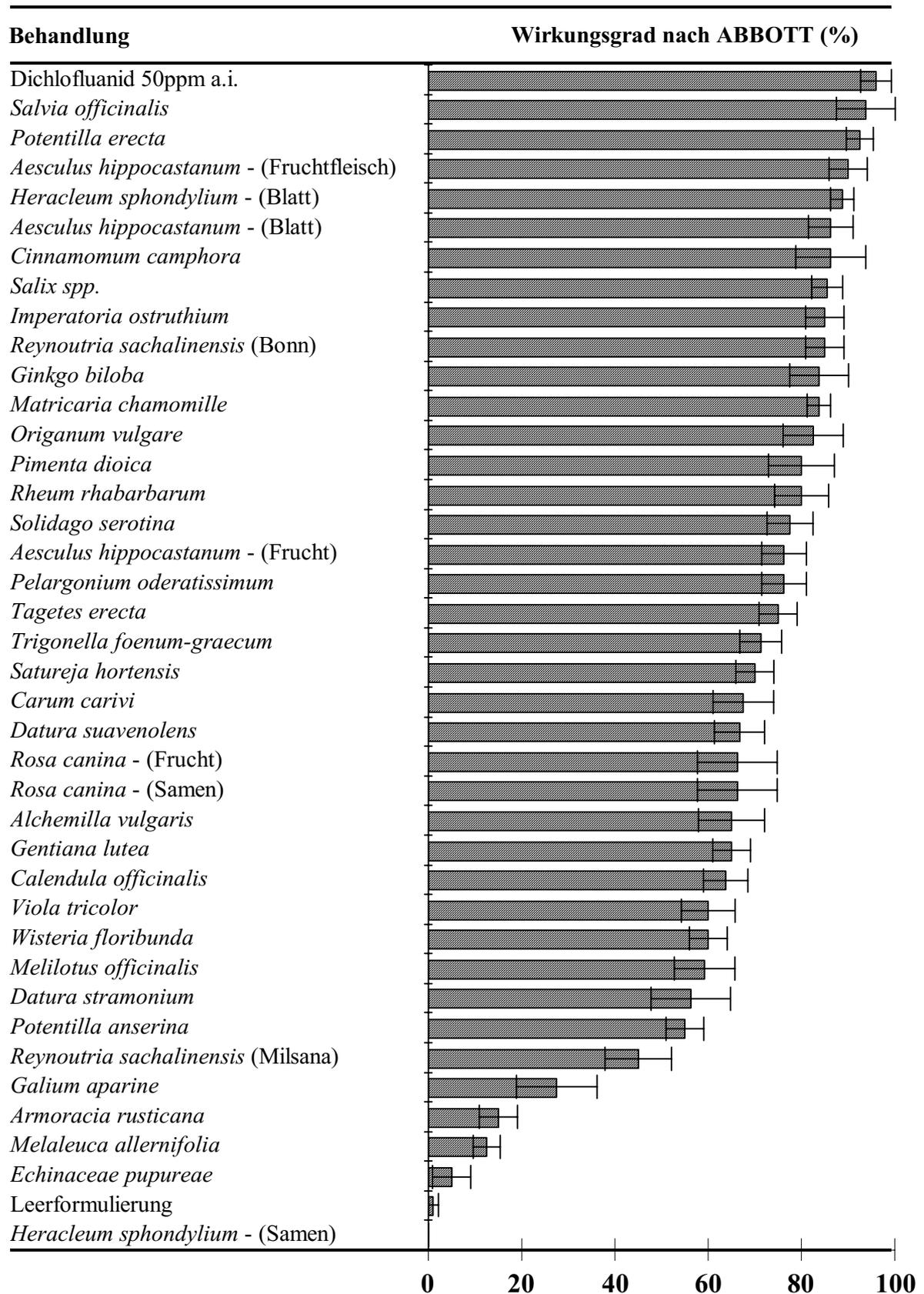


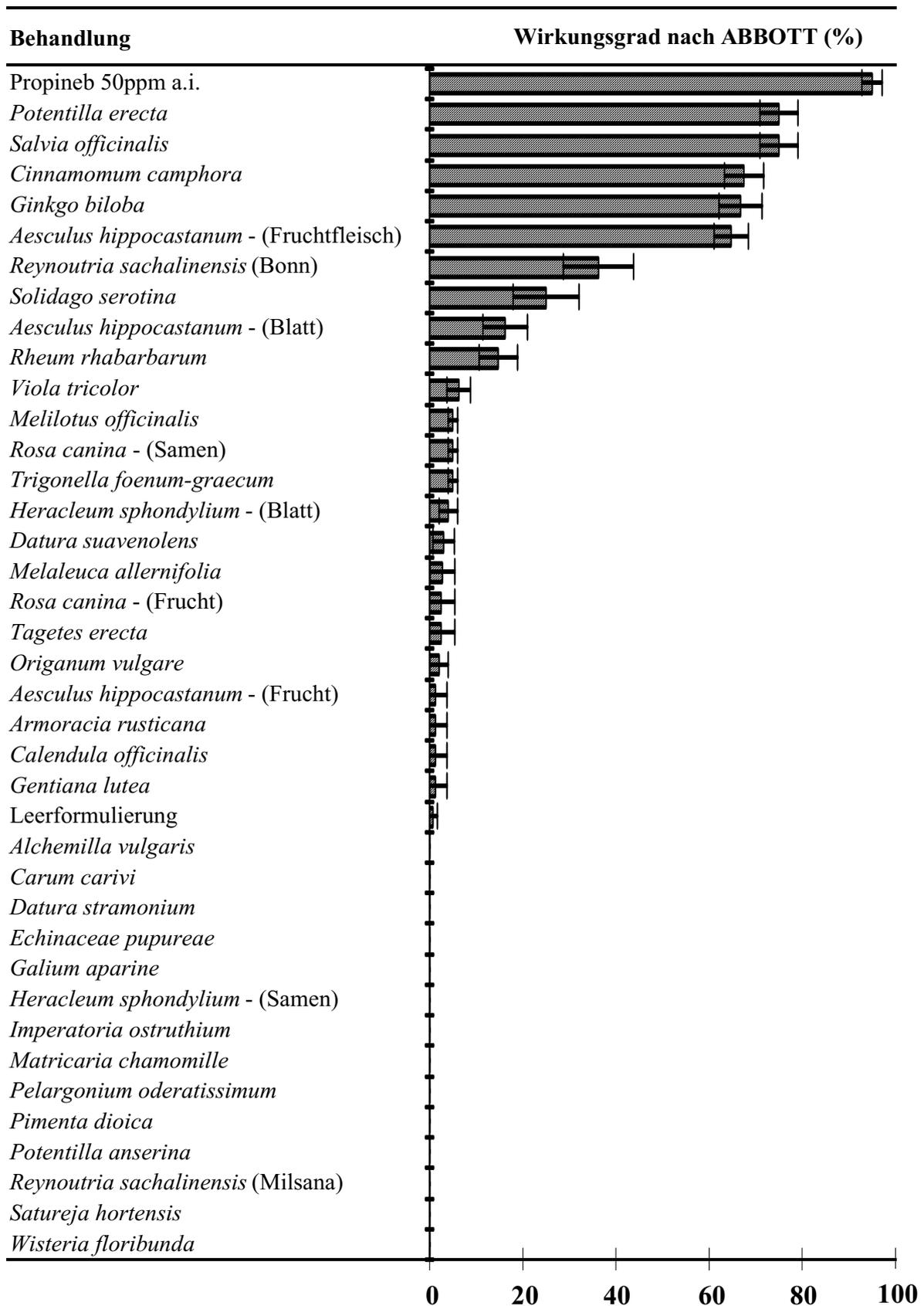
Abb. 12: Einfluß einer protektiven Spritzapplikation eines Pflanzenextraktes (1 % TS) aus *Salvia officinalis* auf den Befall von Paprika ‘Yolo Wonder B’ mit *Botrytis cinerea* (rechts behandelt, links unbehandelt).

Tab. 8: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 1 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Tomaten ‘Rheinlands Ruhm’ mit *Phytophthora infestans* (n = 4).

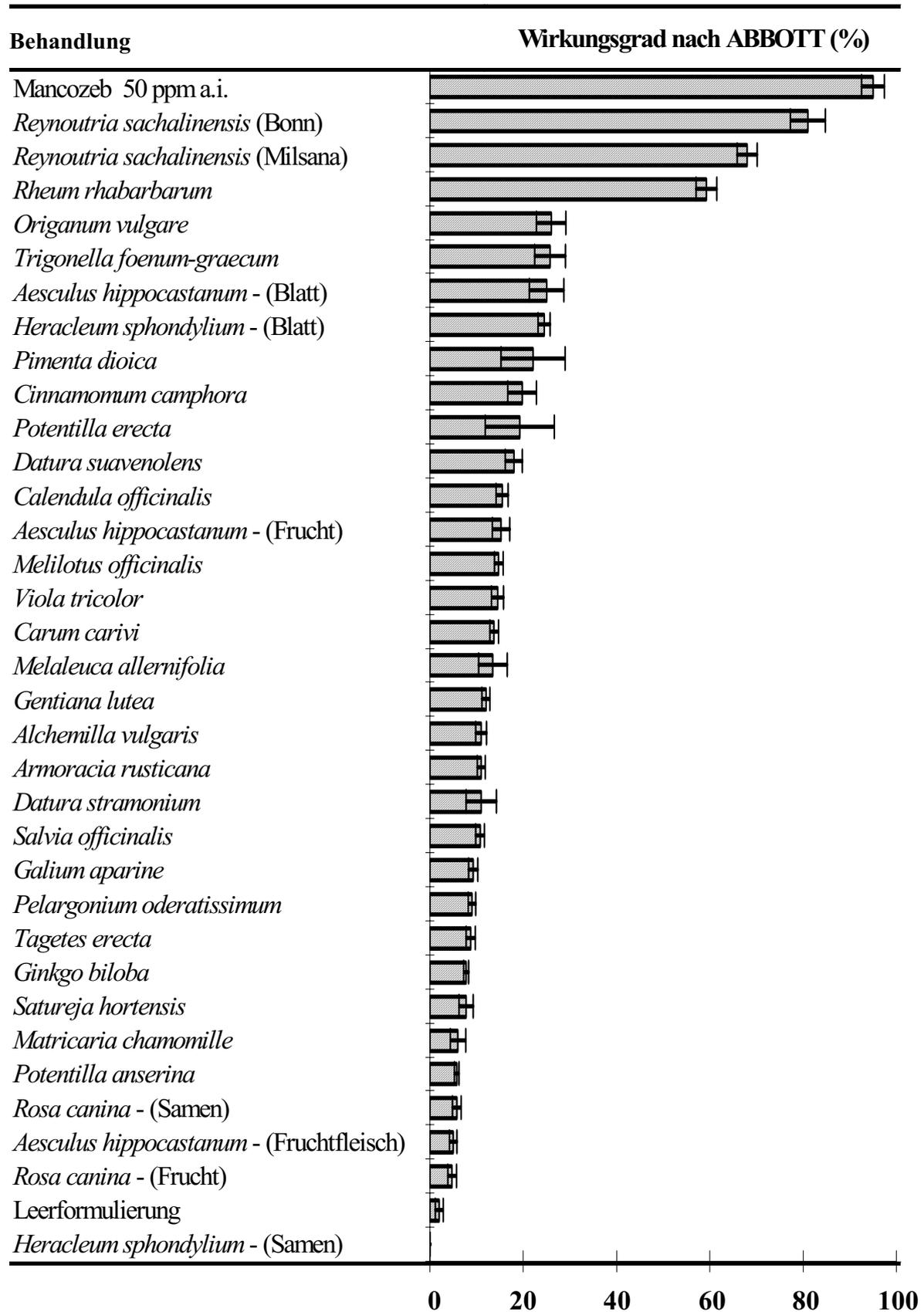


Tab. 9: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 1 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Weinreben ‘Müller-Thurgau’ mit *Plasmopara viticola* (n = 4).

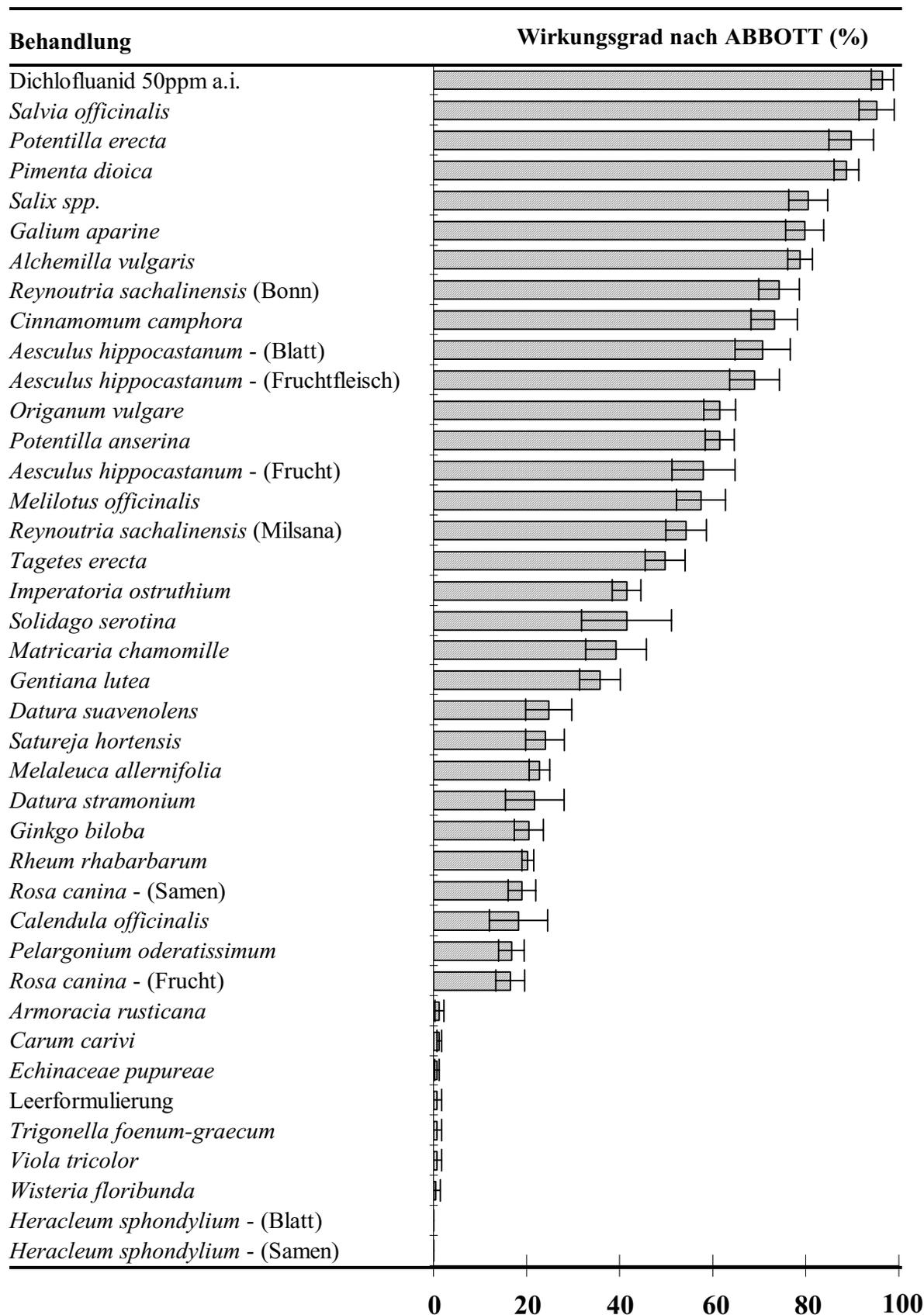
Tab. 10: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 1 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Bohnen ‘Saxa’ mit *Uromyces phaseoli* (n = 4).



Tab. 11: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 1 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall der Primärblätter von Winterweizen ‘Kanzler’ mit *Erysiphe graminis* (n = 4).



Tab. 12: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 1 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Paprika ‘Yolo Wonder B’ mit *Botrytis cinerea* (n = 4).



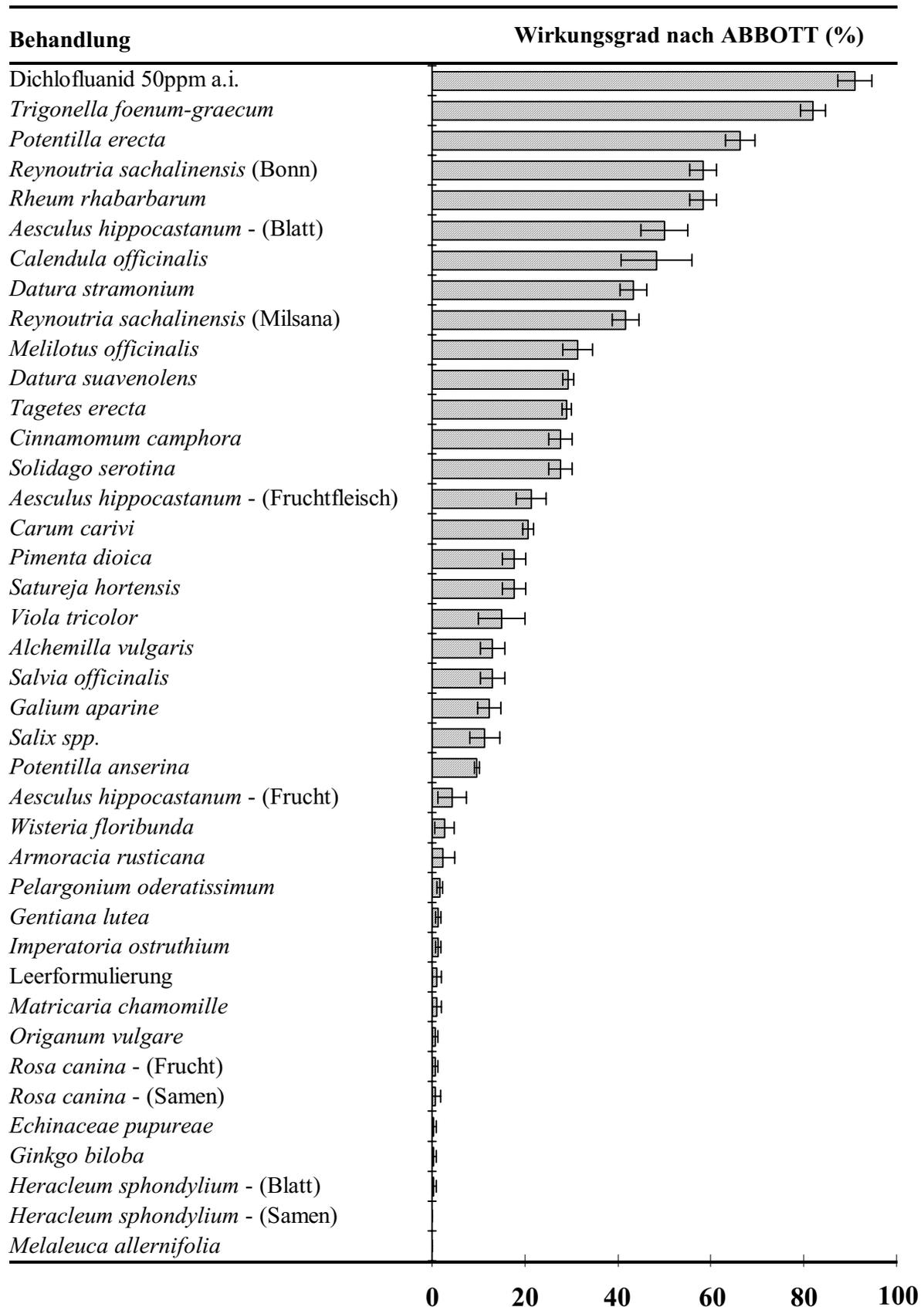
3.1.2.6 Dürrfleckenkrankheit (*Alternaria solani*) an Tomate

Untersuchungen zur Wirksamkeit von Pflanzenextrakten (siehe Punkt 2.3.1) gegenüber der Dürrfleckenkrankheit erfolgten an Tomatenjungpflanzen der Sorte 'Rheinlands Ruhm'. Der Befall der unbehandelten Kontrolle lag im Mittel der vier Versuche bei 95 %, die Wirkung des Vergleichsfungizids *Dichlofluamid* (50 ppm a.i.) bei 91 %. Wie in Tabelle 13 dargestellt, zeigten die Pflanzenextrakte große Unterschiede in ihrer Wirksamkeit. Lediglich die Extrakte aus *Aesculus hippocastanum* (Blatt), *Rheum rhabarbarum*, *Reynoutria sachalinensis* (eigene Präparation), *Potentilla erecta* und *Trigonella foenum-graecum* zeigten im Mittel der Versuche Wirkungsgrade von über 50 %. Durch die Applikation des Extraktes *Trigonella foenum-graecum* konnte eine Befallsreduktion von 81 % gegenüber unbehandelt bonitiert werden (Abb. 13).



Abb. 13: Einfluß einer protektiven Spritzapplikation eines 1 %-igen Pflanzenextraktes aus *Trigonella foenum-graecum* auf den Befall von Tomaten mit *Alternaria solani* (rechts Leerformulierung, links behandelt).

Tab. 13: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 1 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Tomaten ‘Rheinlands Ruhm’ mit *Alternaria solani* (n = 4).



3.1.3 Vergleich der *in vitro*- und *in vivo*-Wirksamkeit von Pflanzenextrakten

Zur Bewertung der verwendeten Prüfmethode im Hinblick auf ihre Eignung zur Auffindung wirksamer Pflanzenextrakte erfolgte ein Vergleich der *in vitro* und *in vivo* gewonnenen Ergebnisse. Verglichen wurde die Wirksamkeit der Extrakte gegenüber den beiden perothrophen Erregern *Alternaria solani* und *Botrytis cinerea*.

3.1.3.1 Wirksamkeit gegen *Alternaria solani*

Ein Vergleich der *in vitro* beobachteten Wirksamkeit (Tab. 6) der unter 2.1.1 aufgeführten Pflanzenextrakte mit ihrer Wirkung *in vivo* (Tab. 13) zeigte, daß wesentlich mehr Extrakte einen Einfluß auf das Myzelwachstum von *A. solani* bewirkten als eine Befallsreduktionen des Erregers an der Pflanze erbrachten. Wie in Abbildung 14 ersichtlich, zeigten über zwei Drittel der untersuchten Pflanzenextrakte eine Hemmung des Myzelwachstums von über 60 %, während *in vivo* nur zwei der Extrakte den Befall von Tomaten um mehr als 60 % reduzierten.

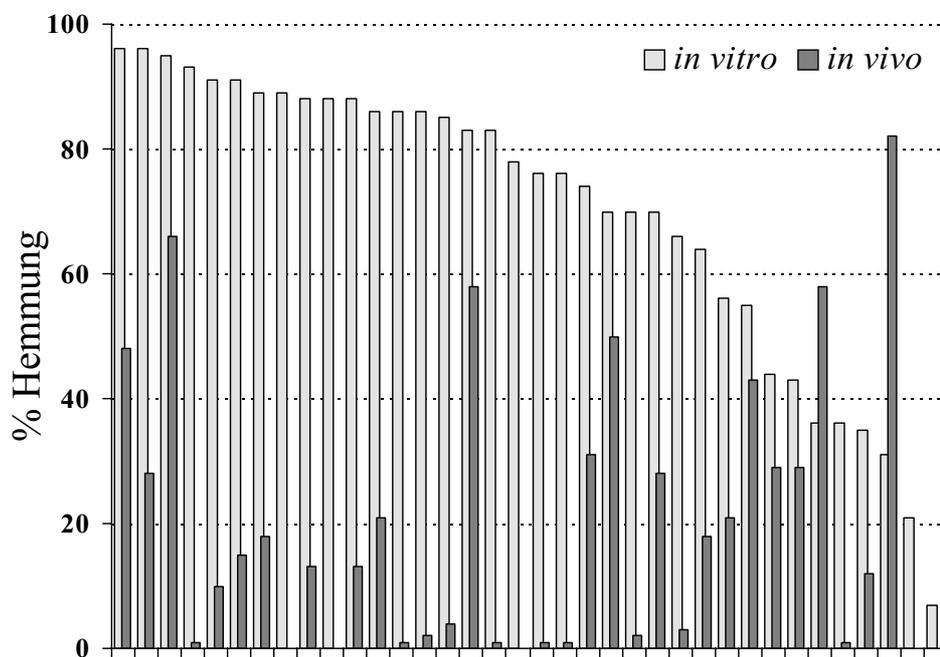


Abb. 14: Wirkungsprofil von Pflanzenextrakten *in vitro* (0,5 %) auf das Myzelwachstum und *in vivo* (1 %) auf den Befall von Tomaten mit *Alternaria solani*.

Die *in vivo* Wirkung der einzelnen Pflanzenextrakte lag in den meisten Fällen deutlich unter der *in vitro* Wirkung. Lediglich die Extrakte aus *Trigonella foenum-graecum* und *Rheum rhabarbarum* zeigten *in vivo* eine wesentlich höhere Wirkung als *in vitro* (Abb. 15).

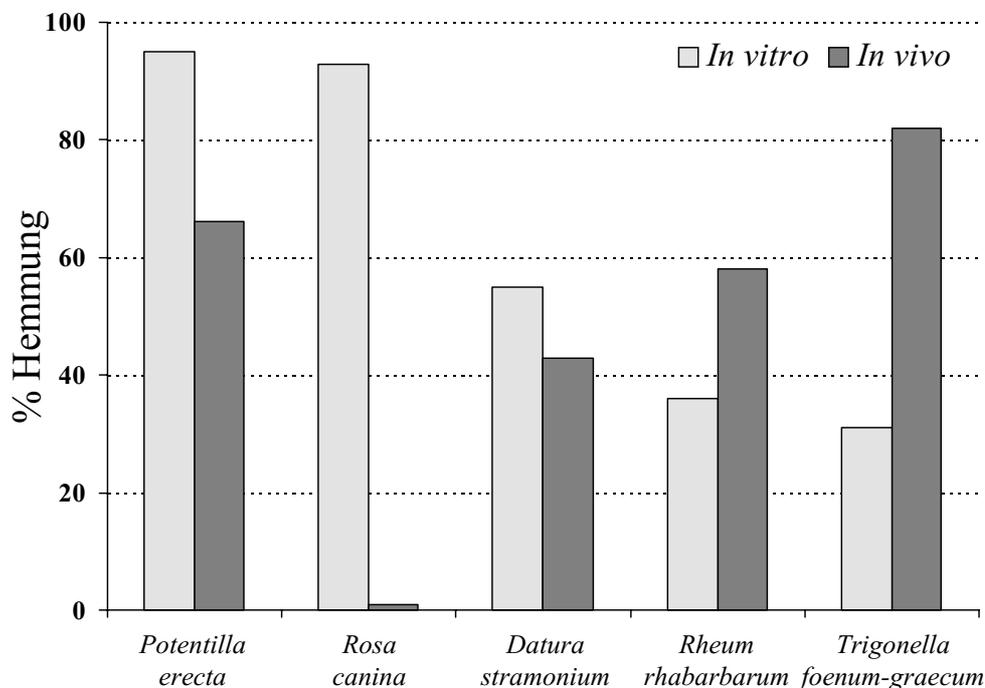


Abb. 15: Vergleich der *in vitro* (0,5 %-ige Extrakte in Agar) und der *in vivo* (Applikation 1 %-iger Extrakte) Wirkung von Pflanzenextrakten gegenüber *Alternaria solani*.

Einige Extrakte, wie zum Beispiel der Extrakt aus *Rosa canina*, bewirkten *in vitro* eine Hemmung des Myzelwachstums zu mehr als 90 %, *in vivo* an der Pflanze aber keine Befallsreduktion. Andere Pflanzenextrakte wie zum Beispiel die Extrakte aus *Potentilla erecta* und *Datura stramonium* zeigten *in vitro* und *in vivo* eine deutliche Wirkung.

3.1.3.2 Wirksamkeit gegen *Botrytis cinerea*

Ähnlich wie den Ergebnissen zur Wirksamkeit gegenüber *A. solani*, ließ sich auch beim Vergleich der *in vitro* (Tab. 6) und *in vivo* Wirkung (Tab. 12) der Extrakte gegen *B. cinerea* keine deutliche Korrelation der Ergebnisse erkennen. *In vitro* zeigten wesentlich mehr Extrakte eine gute Wirksamkeit als *in vivo* an Paprikapflanzen.

Drei Viertel der Extrakte zeigten *in vivo* eine deutliche Hemmung des Myzelwachstums (> 80 %). *In vivo* bewirkten aber nur vier der untersuchten Extrakte eine Befallsreduktion von 80 % und sechs weitere eine von über 70 % (Abb. 16).

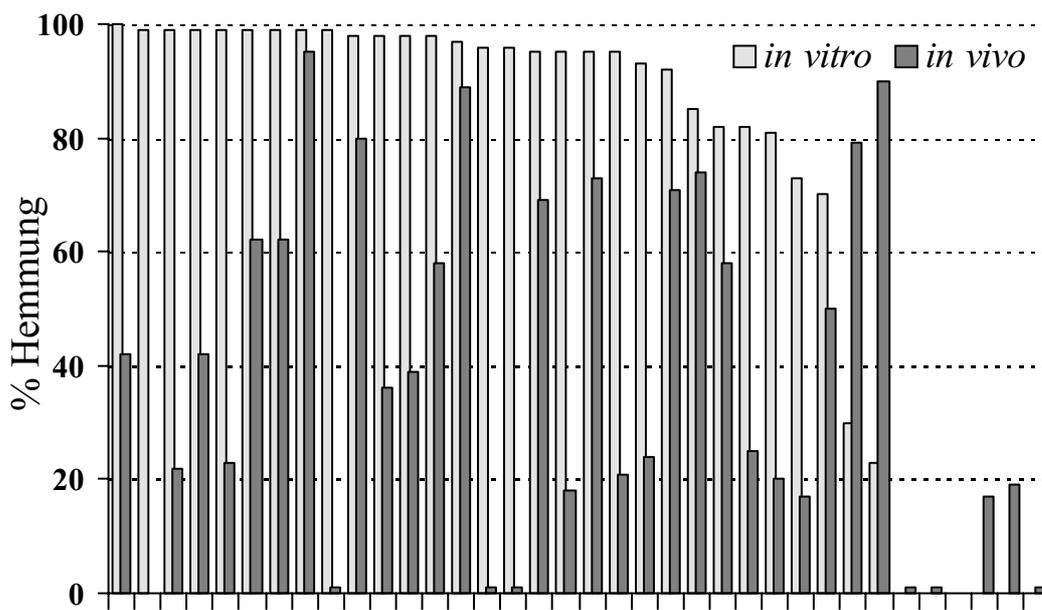


Abb. 16: Wirkungsprofil von Pflanzenextrakten *in vitro* (0,5 %) auf das Myzelwachstum und *in vivo* (1 %) auf den Befall von Paprika mit *Botrytis cinerea*.

Durch die Applikation des Extraktes aus *Salvia officinalis* konnte *in vitro* und *in vivo* eine ähnlich gute Wirksamkeit (99 % / 93 % WG) beobachtet werden (Abb. 17).

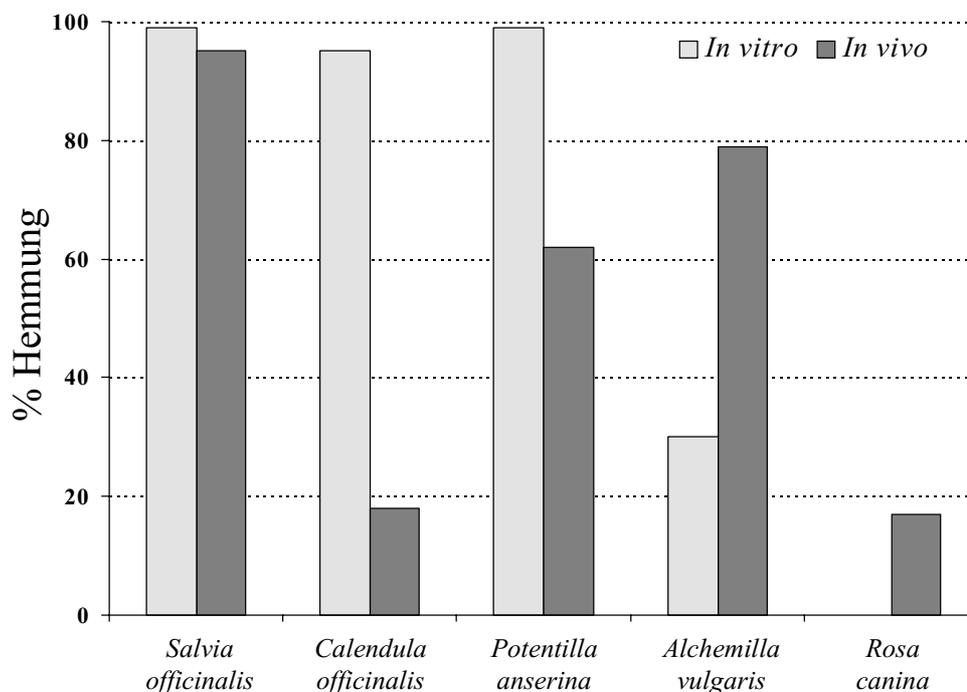


Abb. 17: Vergleich der *in vitro* (0,5 %-ige Extrakte in Agar) und der *in vivo* (Applikation 1 %-iger Extrakte) Wirkung von Pflanzenextrakten gegenüber *Botrytis cinerea*.

Auf der anderen Seite erbrachte die Behandlung mit dem Extrakt aus *Calendula officinalis* zwar *in vitro* eine Hemmung des Myzelwachstums von 98 %, bewirkte aber an der Pflanze kaum eine Befallsreduktion (Abb. 17). Die Extrakte aus *Alchemilla vulgaris* und *Rosa canina* zeigten im Gegensatz zu den anderen Pflanzenextrakten *in vivo* eine wesentlich höhere Wirksamkeit als *in vitro*. Der Extrakt aus *A. vulgaris* reduzierte das Myzelwachstum in einer 0,5 %-igen Konzentration im Agar zu 30 %, erreichte aber als 1 %-ige protektive Applikation an der Pflanze eine Befallsreduktion von 79 %. Die Untersuchungen des Extraktes aus *Rosa canina* gegenüber *B. cinerea* zeigten keine Wirkung gegen das Myzelwachstum. *In vivo* konnte aber durch die Applikation des Extraktes der Befall an Paprika zu 18 % reduziert werden.

3.2 Wirksamkeit unter praktischen Anbaubedingungen

Zur Überprüfung der Wirksamkeit von ausgesuchten Pflanzenextrakten unter praktischen Anbaubedingungen bei wechselnden Umweltfaktoren, die die Wirksamkeit stark beeinflussen können, wurden in den Jahren 1996 und 1997 Untersuchungen im Freiland durchgeführt. Geprüft wurde, in welchem Maße Pflanzen auch bei hohem und andauernden Befallsdruck durch Pathogenen mit der Applikation von Pflanzenextrakten geschützt werden könnten.

3.2.1 Kraut- und Braunfäule an Tomaten

Nach der Inokulation der ersten Blattetage der Versuchspflanzen ließ sich im weiteren Verlauf ein kontinuierlicher Befallsanstieg in den oberen Blattetagen der unbehandelten Pflanzen beobachten. Diese zeigten zum Ende des Versuchs einen Befallsgrad von 31 % (Abb. 18). Der als Vergleichsfungizid mitgeprüfte Wirkstoff *Dichlofluanid* in einer Aufwandmenge von 1000 ppm a.i. erreichte gegen Ende des Versuchs einen Wirkungsgrad von 84 %. Die beste Wirksamkeit konnte durch eine fünffache alternierende Applikationen im wöchentlichen Abstand mit dem Extrakt aus *Salvia officinalis* erzielt werden. Die erreichten zu allen Boniturterminen einen ähnlich hohen Wirkungsgrad wie der des Vergleichsfungizids. Durch die Applikation des Extraktes aus *Potentilla erecta* konnte ebenfalls eine deutliche Befallsreduktion erzielt werden (Abb. 18), die auf einem deutlich niedrigerem Niveau lag als die bei dem Extrakt aus *S. officinalis*.

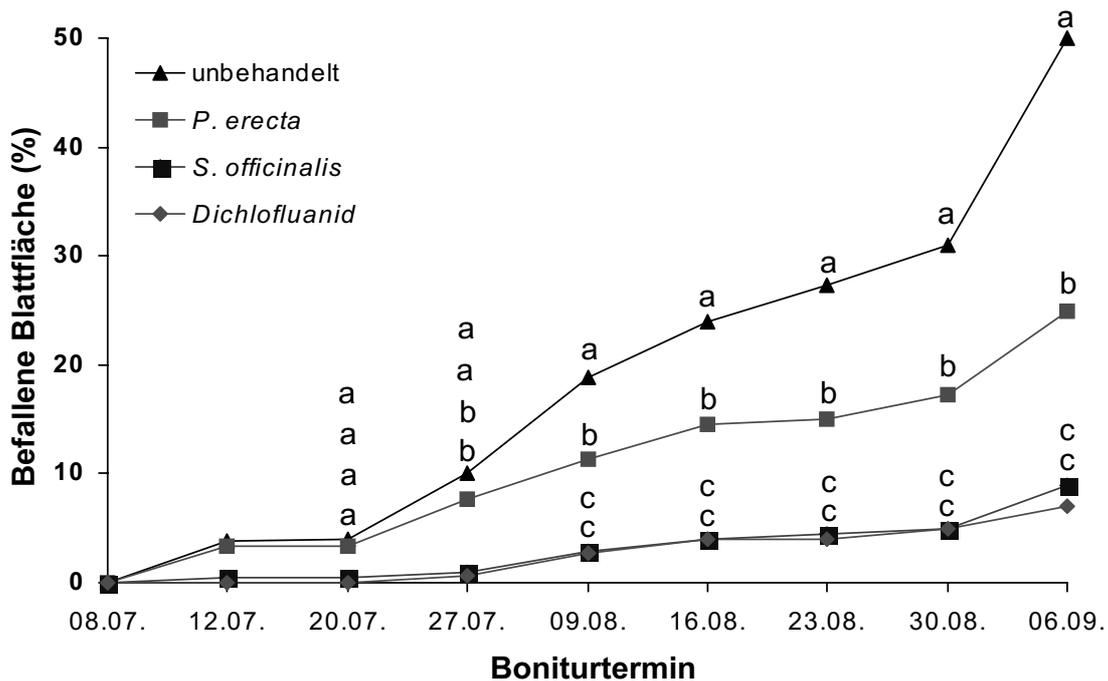


Abb. 18: Einfluß von protektiven Spritzapplikationen 2 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Tomaten ‚Rheinlands Ruhm‘ mit *Phytophthora infestans* unter praktischen Anbaubedingungen (n = 4, Poppelsdorf 1996). Boniturtermin mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

3.2.2 Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln

Nach dem ersten Auftreten des Erregers der Kraut- und Knollenfäule (*Phytophthora infestans*) ließ sich ein kontinuierlich starker Befallsanstieg an den unbehandelten Pflanzen beobachten. Dieser erreichte zum Versuchsende auf beiden Standorten einen Befallsgrad von 100 % (Tab. 14 und 15). Die als Standard mitgeprüfte sechsfache Applikation der Fungizide (Tattoo®; Shirlan® + Tattoo®; Ridomil® MZ super; Shirlan®; Brestan® + Shirlan®) bewirkten in der letzten Bonitur eine Befallsreduktion von 75 % auf dem Standort Poppelsdorf und 73 % auf dem Standort Meckenheim.

Die beste Wirkung durch die Applikation der Pflanzenextrakte konnte auf beiden Standorten mit dem Extrakt aus *Potentilla erecta* erzielt werden. Behandlungen mit diesem Extrakt reduzierten signifikant den Befall der Pflanzen mit *P. infestans* um 77 % in der ersten Bonitur und um 49 % in der letzten Bonitur (Standort Poppelsdorf; Tab. 14). Zu Befallsbeginn konnte hier durch Applikation dieses Extraktes eine ähnlich gute Wirkung erzielt werden wie sie die Fungizidvariante zeigte.

Tab. 14: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 1 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Kartoffeln ‚Cilena‘ mit *Phytophthora infestans* unter Freilandbedingungen (Poppelsdorf 1997). * kennzeichnet signifikante Unterschiede zu unbehandelt (Tukey $\alpha \leq 0,05$).

Behandlung	Boniturtermin / Wirkungsgrad nach ABBOTT (%)			
	10. Juli	19. Juli	24. Juli	30. Juli
<i>Potentilla erecta</i>	77*	61*	52*	49*
<i>Salvia officinalis</i>	73*	55*	33*	37*
Fungizidvariante	77*	82*	79*	75*
Befall in unbehandelt	22 %	28 %	58 %	79 %

Die Wirkung des Extraktes auf dem Standort ‚Meckenheim‘, auf dem die Epidemie deutlich schnellerer und stärker verlief, war mit 17 % in der ersten und 10 % in der letzten Bonitur geringer (Tab. 15). Auch die Applikationen des Extraktes aus *Salvia officinalis* bewirkte auf dem Standort Poppelsdorf eine deutliche Befallsreduktion der Pflanzen. Hier lagen die Wirkungsgrade des Extraktes in der ersten Bonitur bei 73 % und in der letzten bei 37 % (Tab. 14). Auf dem Standort Meckenheim konnte der Befall zwar zum Zeitpunkt der ersten Bonitur um 28 % reduziert werden, erreichte aber in der letzten Bonitur nur eine Reduktion von 5 % (Tab. 15). Nach dem altersbedingten Absterben des Bestandes gegen Ende September wurde auf beiden Standorten eine Ertragserhebung durchgeführt. Wie in Tabelle 16 ersichtlich, konnte durch die Applikation beider Pflanzenextrakte ein Ertragszuwachs gegenüber der unbehandelten Variante erzielt werden.

Tab. 15: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 1 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Kartoffeln ‚Cilena‘ mit *Phytophthora infestans* unter Freilandbedingungen (Meckenheim 1997). * kennzeichnet signifikante Unterschiede zu unbehandelt (nach Tukey $\alpha \leq 0,05$).

Behandlung	Boniturtermin / Wirkungsgrad nach ABBOTT (%)			
	10. Juli	19. Juli	24. Juli	30. Juli
<i>Potentilla erecta</i>	17	13	12	10
<i>Salvia officinalis</i>	28	16	8	5
Fungizidvariante	97*	95*	76*	73*
Befall in unbehandelt	32 %	43 %	88 %	100 %

Tab. 16: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 1 %-iger Pflanzenextrakte auf den Ertrag von Kartoffeln ‚Cilena‘ unter Freilandbedingungen. Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$ (Meckenheim und Poppelsdorf 1997).

Behandlung	Kartoffelertrag [dt/ha]			
	Meckenheim		Poppelsdorf	
	Mehrertrag [%]		Mehrertrag [%]	
Unbehandelt	239,2 a	-	285,0 a	-
<i>Potentilla erecta</i>	276,7 a	15,7	334,2 a	17,3
<i>Salvia officinalis</i>	269,2 a	12,5	325,0 a	14,0
Fungizidvariante	333,8 a	39,6	376,7 a	32,2

Die höchsten Ertragszuwächse wurden auf dem Standort Meckenheim durch die Fungizidvariante erzielt. Sie erreichte einen Mehrertrag von 39,6 % (94,6 dt / ha) gegenüber unbehandelt. Durch die Applikation des Extraktes aus *P. erecta* konnte ein Ertragszuwachs von 15,7 % (37,5 dt / ha) ermittelt werden. Die Anwendung des Pflanzenextraktes aus *S. officinalis* bewirkte gegenüber der Kontrolle einen Mehrertrag an Kartoffeln von 12,5 % (30 dt / ha).

Einen ähnlichen Einfluß auf den Ertrag, wie auf dem Standort Meckenheim konnten auch auf dem Standort Poppelsdorf beobachtet werden. Hier lagen die Erträge der einzelnen Varianten aber deutlich über denen in Meckenheim. Der höchste Ertrag wurde auch hier durch die Fungizidvariante erzielt. Die Applikation des 1 %-igen Extraktes aus *P. erecta* steigerte den Ertrag gegenüber den der unbehandelten Kontrolle um 17,3 % (49,2 dt / ha), die von *S. officinalis* um 14 % (40 dt / ha).

3.2.3 Grauschimmel an Erdbeeren

Wie aus Tabelle 17 ersichtlich, bewirkten die Applikationen des Extraktes aus *Galium aparine* und *Salvia officinalis* keine Reduktion des Befalls von Erdbeeren mit dem Erreger des Grauschimmels (*Botrytis cinerea*). Dies spiegelte sich in der Anzahl und dem Gewicht gesunder und befallener Erdbeeren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle wieder.

Tab. 17: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 2 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Erdbeeren ‚Korona‘ mit *Botrytis cinerea* während der Ernteperiode (fünf Bonituren; Poppelsdorf 1996; n = 5). Werte mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

Behandlung	Anzahl gesunder Erdbeeren	Anzahl befallener Erdbeeren	Ertrag gesunder Erdbeeren (g)	Ertrag befallener Erdbeeren (g)
Unbehandelt	2987 a	124 a	45980 a	1371 a
<i>Galium aparine</i>	2891 a	113 a	44680 a	1250 a
<i>Salvia officinalis</i>	2944 a	134 a	46810 a	1427 a

3.2.4 Falscher Mehltau an Weinreben

Am 02. Juni konnte der erste Befall mit dem Erreger des Falschen Mehltaus (*Plasmopara viticola*) an unbehandelten Weinreben beobachtet werden. Dieser stieg kontinuierlich an und erreichte gegen Ende des Versuchs in den unbehandelten Pflanzen ein Befallsniveau von 58 % (Abb. 19).

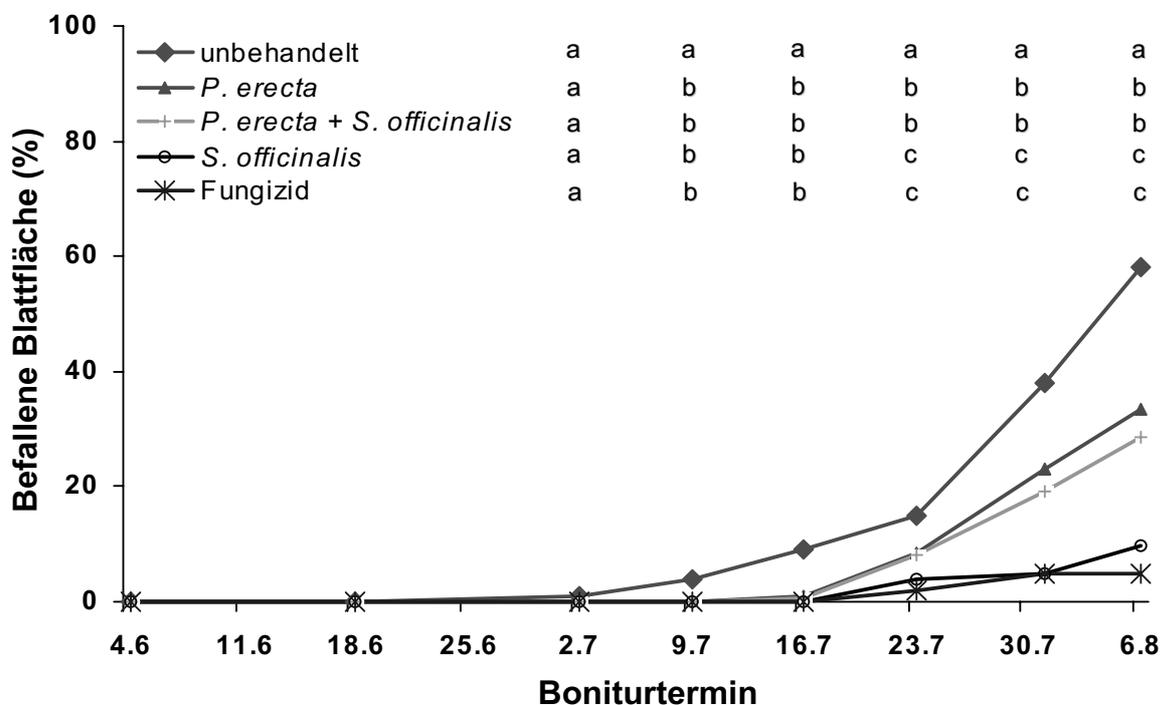


Abb. 19: Einfluß protektiver Spritzapplikationen 2 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Weinreben ‚Müller-Thurgau‘ mit *Plasmopara viticola* unter praktischen Anbaubedingungen (n = 4; Marienthal 1997). Boniturtermin mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

Durch die Applikationen des Pflanzenextraktes aus *Salvia officinalis* konnte die beste Befallsreduktion erreicht werden (Abb. 19). So bewirkten die Extraktapplikationen in der letzten Bonitur eine signifikante Befallsreduktion (83 %) gegenüber unbehandelt. Diese war ähnlich der der Fungizidvariante welche aus vier alternierenden Applikationen bestand. (Dithane Ultra[®]; Folicur[®]; Forum[®]; Aktuan[®]). Die Behandlung mit dem Extrakt aus *Potentilla erecta* konnte den Befall zwar vermindern, erreichte aber zum letzten Boniturtermin deutlich geringere Wirkungsgrade (43 %). Eine Kombination der beiden Extrakte zeigte im Vergleich zum Extrakt aus *P. erecta* eine stärkere Befallsreduktion (51 %), erreichte aber nicht die Wirksamkeit des Extraktes aus *S. officinalis* (Abb. 19).

3.3 Charakterisierung der Wirkung von Pflanzenextrakten

Für das Verständnis der Wirkung und der späteren Anwendungsempfehlung von biologisch aktiven Substanzen, stellen Beobachtungen zur Wirkungsweise ein entscheidendes Kriterium da. Im Folgenden wurden daher Untersuchungen zur Charakterisierung der Wirkungsweise von Pflanzenextrakten durchgeführt.

3.3.1 Protektive und kurative Wirkung

Der Applikationszeitpunkt kann einen starken Einfluß auf die Wirksamkeit von Substanzen ausüben. Zur Untersuchung dieses Parameters wurden ausgesuchte Pflanzenextrakte in verschiedenen Zeitintervallen vor und nach der Inokulation der Versuchspflanzen appliziert.

Durch eine protektive Applikation zu verschiedenen Zeitpunkten vor der Inokulation sollte die Wirkungsdauer sowie eine mögliche resistenzinduzierende Wirkung der Extrakte untersucht werden. Die Applikation der Extrakte nach der Inokulation mit den Pathogenen sollte Aufschluß geben, ob neben einer protektiven auch eine eradikative oder kurative Wirkung vorliegt.

Protektive Applikation

Am Beispiel der fünf Pflanzenextrakte aus *Salvia officinalis*, *Potentilla erecta*, *Salix* spp., *Trigonella foenum-graecum* und *Echinaceae pupureae* sollte der Einfluß eines Zeitintervalls zwischen Applikation und Inokulation auf die Wirksamkeit der Extrakte untersucht werden. Als Wirt-Pathogen-Modelle dienten *Phytophthora infestans* - Tomate, *Plasmopara viticola* - Weinrebe und *Botrytis cinerea* - Paprika. Die Applikation der Extrakte erfolgte protektiv in

den Zeitintervallen fünf Tage, zwei Tage und vier Stunden vor der Inokulation. Als Vergleichswirkstoff diente der Resistenzinduktor Bion (50 ppm a.i.) und wurde in den selben Zeitintervallen mitgeprüft.

In Wirt-Pathogen-Modell *P. infestans* - Tomate lag der durchschnittliche Befall der unbehandelten Pflanzen bei 87 %. Abbildung 17 zeigt die Wirksamkeit der Extrakte in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt in den drei Konzentrationen 1, 0,5 und 0,1 %. Der als Vergleichswirkstoff mit untersuchte Resistenzinduktor Bion[®] zeigte die für Resistenzinduktoren häufig beobachtete Abhängigkeit der Wirkung von dem Applikationszeitpunkt (Abb. 20). Behandlungen fünf Tage vor der Inokulation erbrachten signifikant die höchste Wirkung (74 %). Behandlungen mit dem Extrakt aus *S. officinalis* ließen diese Abhängigkeit nicht erkennen. Hier hatte die Applikationskonzentration den stärksten Einfluß auf die Wirksamkeit. Ähnliches ließ sich auch bei den Behandlungen mit dem Extrakt aus *P. erecta* beobachten. Lediglich Applikationen in einer Konzentration von 0,1 % ließen eine Abhängigkeit der Wirkung von Zeitpunkt der Behandlung erkennen. Applikationen des Extraktes aus *Salix* spp. zeigten in allen drei Konzentrationen die höchste Wirksamkeit bei einer Behandlung zwei Tage vor der Inokulation. Beobachtungen zum Einfluß des Extraktes aus *T. foenum-graecum* erbrachten, daß die höchste Wirksamkeit bei Applikationen von zwei und fünf Tage vor der Inokulation zeigte. Applikationen des Extraktes aus *E. pupureae* erreichten in diesem Wirt-Pathogen-Modell die geringste Wirksamkeit. Hier zeigte der Applikationstermin den stärksten Einfluß auf die Wirksamkeit. Applikationen zwei Tage und vier Stunden vor der Inokulation bewirkten die höchsten Befallsreduktionen.

Auch in dem System *P. viticola* an Weinreben, mit einem Befall der Kontrollpflanzen von durchschnittlich 59 %, ließ sich der typische Einfluß des Zeitintervalls auf die Wirksamkeit des Resistenzinduktors Bion[®] beobachten (Abb. 21). Behandlungen mit den Extrakt aus *S. officinalis* zeigten in allen drei Konzentrationen und zu allen Applikationsterminen nahezu die gleiche Wirksamkeit. Der Pflanzenextrakt aus *P. erecta* unterschied sich in seiner Wirksamkeit lediglich bei einer Konzentration von 0,1 %. Hier zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Wirkung vom Behandlungstermin, welche ähnlich zu der des Resistenzinduktors Bion[®] war.

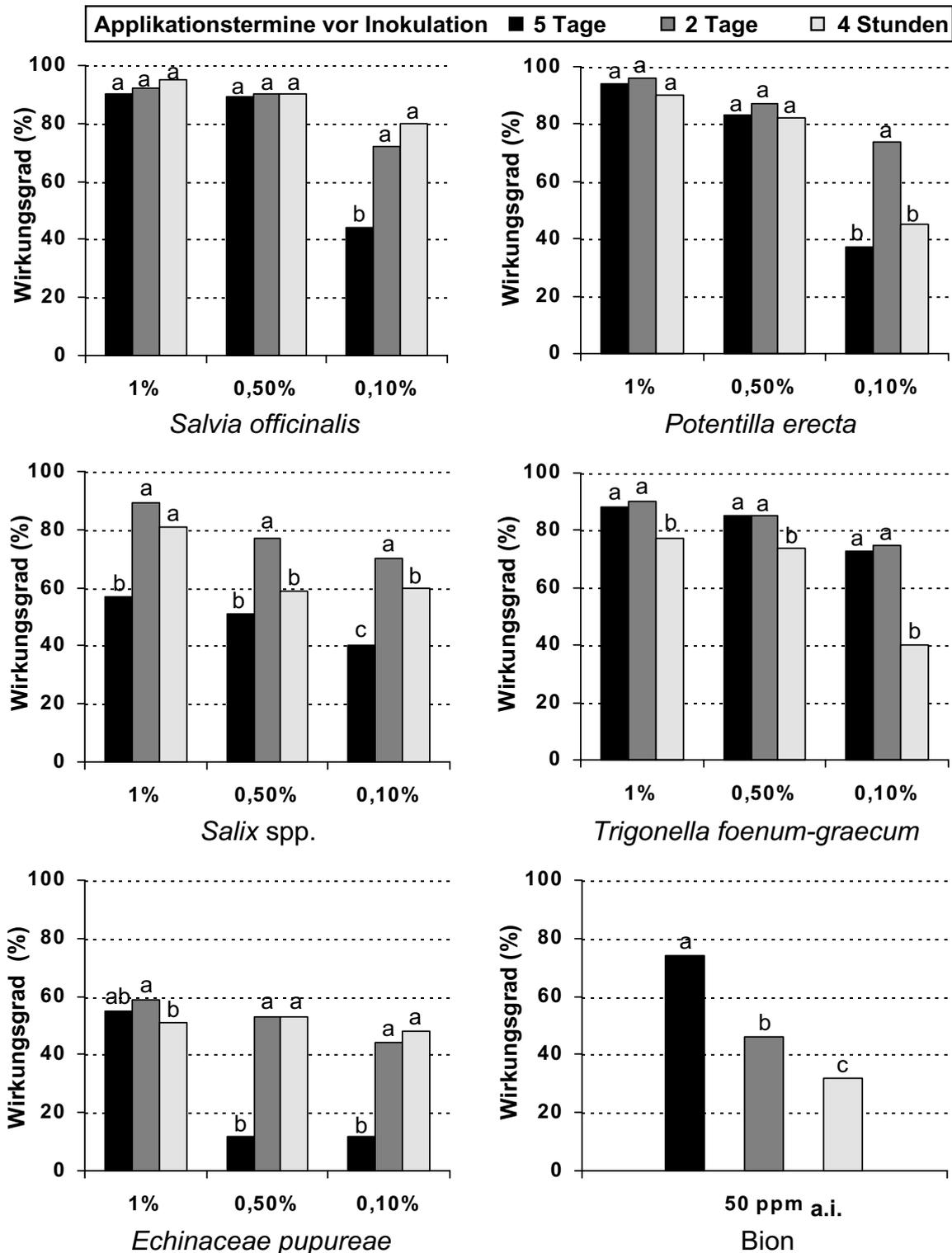


Abb. 20: Einfluß des Zeitintervalls zwischen Applikation von Pflanzenextrakten und Inokulation von Tomaten mit *Phytophthora infestans*. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

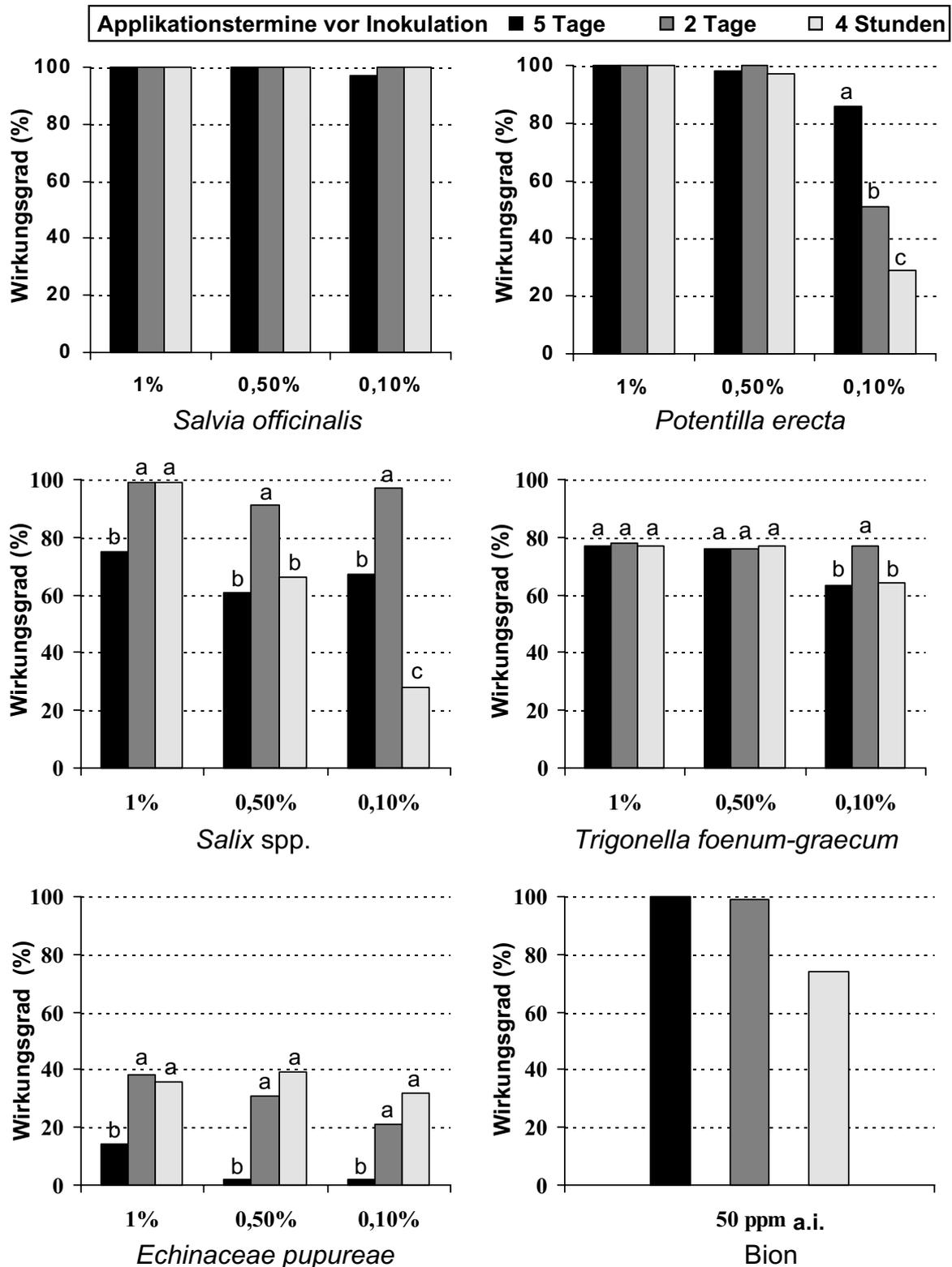


Abb. 21: Einfluß des Zeitintervalls zwischen Applikation von Pflanzenextrakten und Inokulation von Weinreben mit *Plasmopara viticola*. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

Ähnliches ließ sich auch bei den Applikationen des Extraktes aus *Salix* spp. beobachten. In allen Konzentrationen erbrachte eine Behandlung von zwei Tagen vor der Inokulation die höchste Wirksamkeit. Der Extrakt aus *T. foenum-graecum* ließ in den beiden höchsten Konzentrationen keine Unterschiede in der Wirksamkeit bezüglich des Applikationsintervalls und der Extraktkonzentration erkennen. Lediglich in einer Konzentration von 0,1 % zeigte sich eine höhere Wirksamkeit bei einem Intervall von zwei Tagen vor der Inokulation gegenüber den beiden anderen Applikationszeitpunkten. Applikationen des Extraktes aus *E. pupureae* ließen in allen drei untersuchten Konzentrationen die signifikant höchsten Wirkung bei einem Applikationszeitpunkten von zwei Tage und vier Stunden vor der Inokulation erkennen.

Im System *B. cinerea* an Paprika bewirkten nur drei der untersuchten Extrakte eine Wirksamkeit von über 70 % (Abb. 22). Der Befall der unbehandelten Pflanzen lag bei 100 %. Die Applikation des als Vergleich mit geprüften Resistenzinduktors Bion[®] erreichte in keiner Variante eine ausreichende Wirkung Die höchste Befallsreduktion konnte durch die Behandlung mit dem 1 %-igen Extrakt aus *S. officinalis* erreicht werden (95 %). In allen untersuchten Konzentrationen bewirkte der Extrakt nach einem Zeitintervall von vier Stunden die höchste Wirksamkeit. Dies zeigte sich in dem Konzentrationen 0,5 und 0,1 % in signifikanten Unterschieden. Die Untersuchungen zum Einfluß des Zeitintervalls zwischen Applikation und Inokulation auf die Wirksamkeit des Extraktes aus *P. erecta* ergaben, daß nur in den Behandlungen bei einer Konzentration von 1 % signifikante Unterschiede auftraten. Die höchste Wirksamkeit zeigte sich bei den Applikationsintervallen von zwei Tagen bzw. vier Stunden vor Inokulation. Sie waren signifikant höher als die Wirkung des Extraktes nach einer Applikation fünf Tage vor Inokulation. Der Extrakt aus *Salix* spp. hatte in diesem System seine höchste Wirksamkeit in den Konzentrationen 1 und 0,5 % bei einem Applikationsintervall von vier Stunden vor der Inokulation. Die Behandlungen mit den Extrakten aus *T. foenum-graecum* und *E. pupureae* bewirkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Applikationsterminen und Konzentrationen (Abb. 22).

Kurative Applikationen

Zur Untersuchung der kurativen Wirksamkeit von Pflanzenextrakten erfolgten eine Behandlungen in den Wirt-Pathogen-Modellen *Phytophthora infestans* an Tomaten und *Plasmopara viticola* an Weinreben.

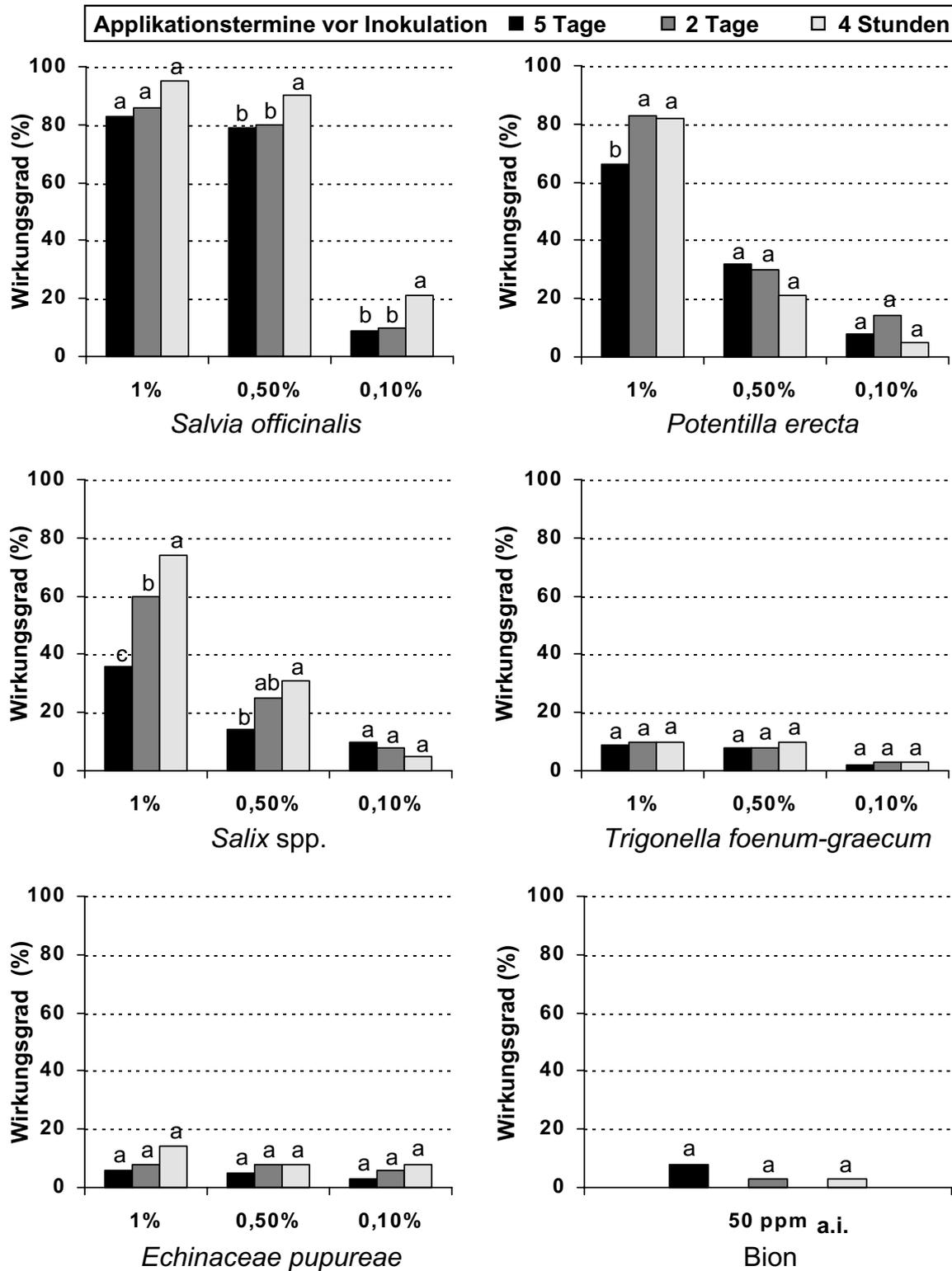


Abb. 22: Einfluß des Zeitintervalls zwischen Applikation von Pflanzenextrakten und Inokulation von Paprika mit *Botrytis cinerea*. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikante nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

Wie in Abbildung 23 ersichtlich, konnte bis zu einem Zeitpunkt von zwei Stunden nach der Inokulation eine deutliche Befallsreduktion erreicht werden. Behandlungen vier und fünf Stunden nach der Inokulation erbrachten dagegen nur noch eine geringe bis keine Wirkung. Kurative Applikationen gegen *P. viticola* verminderten den Befall bis zu acht Stunden nach der Inokulation um über 90 % (Abb. 24). Spätere Behandlungen von ein bis drei Tage nach der Inokulation zeigten deutlich geringere Wirksamkeit.

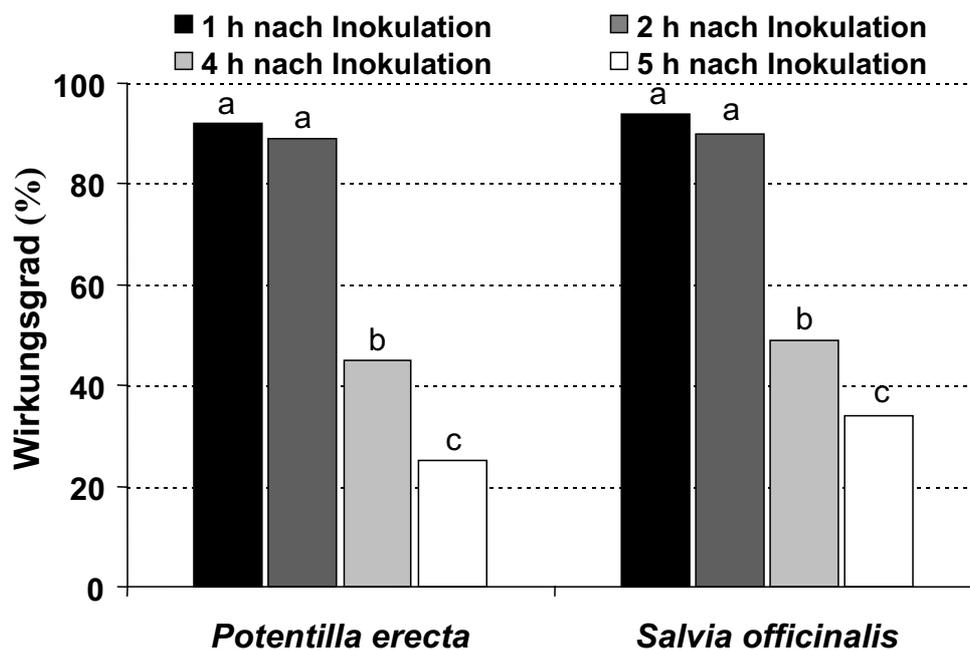


Abb. 23: Einfluß kurativer Spritzapplikationen von Pflanzenextrakten (1 % TS) auf den Befall von Tomaten ‚Rheinlands Ruhm‘ mit *Phytophthora infestans*. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant (Tukey $\alpha \leq 0,05$).

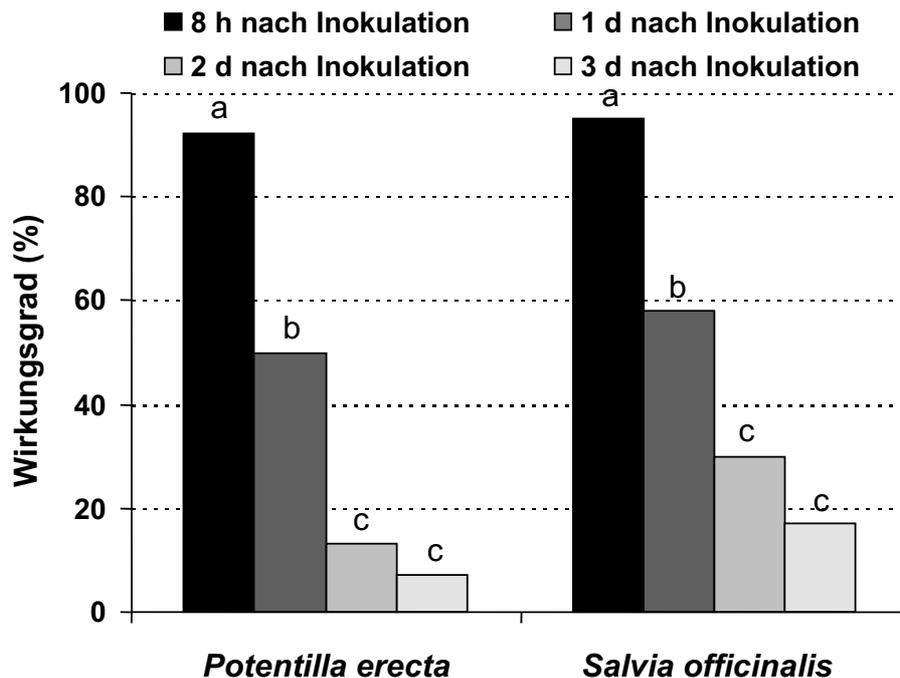


Abb. 24: Einfluß kurativer Spritzapplikationen 1 %-iger Pflanzenextrakte auf den Befall von Weinreben ‘Müller-Thurgau’ mit *Plasmopara viticola*. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant (Tukey $\alpha \leq 0,05$).

3.3.2 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Durch die Berechnung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von Substanzen ist es möglich, Aussagen über die optimale Aufwandtsmenge, die Selektivität und die Beeinflussung der Wirkung durch Formulierhilfsstoffe zu treffen. Weiterhin bietet sich die Möglichkeit, Wirkstoffe aufgrund ihres ED_{50} bzw. ED_{90} Werts miteinander zu vergleichen.

Am Beispiel der Wirkung des Extraktes aus *Potentilla erecta* gegen *Plasmopara viticola* wurden acht Konzentrationen (0,05 % bis 2 %) im Biotest an Weinreben geprüft. Die Wirkungsgrade nach ABBOTT (1925) wurden mit Hilfe einer linearen Regression verrechnet und logarithmisch transformiert. Abbildung 25 zeigt die Dosis-Wirkungs-Beziehung des Extraktes im Vergleich zu der des Wirkstoffes *Dichlofluanid*.

Wie deutlich zu erkennen ist, besteht eine ausgeprägte Abhängigkeit der Wirkung beider Substanzen von deren Konzentration. Die Kurven für den Extrakt aus *P. erecta* und den Wirkstoff *Dichlofluanid* zeigten einen ähnlichen sigmoiden Verlauf, der sich in beiden Fällen in einem Bereich von ca. zwei Zehnerpotenzen bewegt. Für den Extrakt aus *P. erecta* wurde ein ED_{50} Wert von 0,15 %, und für den Wirkstoff *Dichlofluanid* ein ED_{50} Wert von 1,8 ppm a.i. (0,00018 % a.i.) ermittelt. Die engliegenden Konfidenzbanden beider Kurven zeigen, daß die Versuchswerte durch die errechnete Kurve sehr gut beschrieben werden.

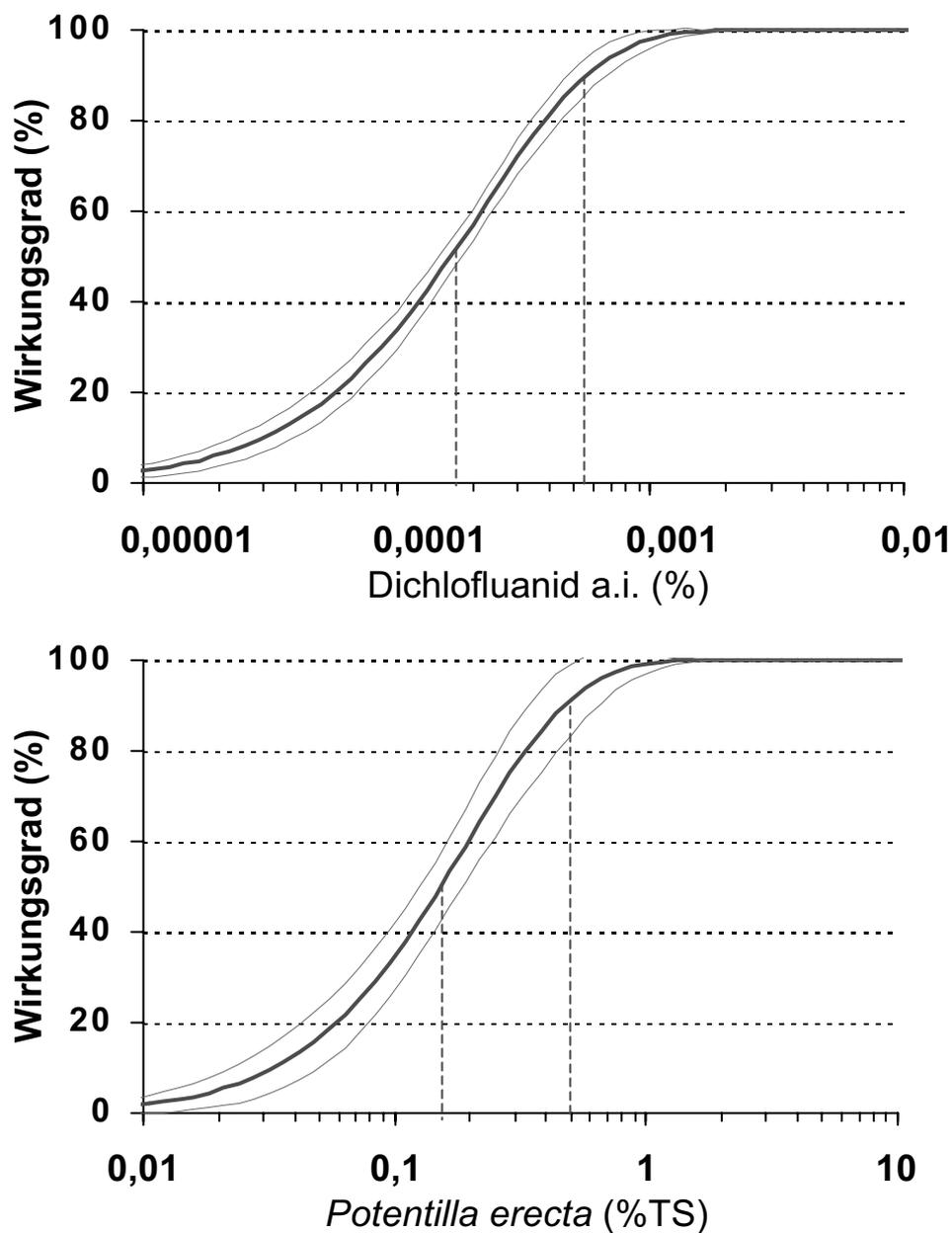


Abb. 25: Dosis-Wirkungs-Beziehung für den Extrakt aus *Potentilla erecta* (unten) im Vergleich zum Wirkstoff *Dichlofluanid* (oben) nach protektiver Spritzapplikation gegen *Plasmopara viticola* an Weinreben (n = 4).

3.3.3 Applikationsort und Systemizität

Durch den Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Applikationsformen und –techniken ist es möglich, Rückschlüsse auf die Aufnahme und die Translokation von Wirkstoffen in der Pflanze zu ziehen.

Am Beispiel der zwei äthanolischen Extrakte aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta* wurde der Transport der wirksamen Substanzen zwischen der unteren und den oberen Blatte-

tagen, zwischen Blattgrund und Blattspitze sowie zwischen Blattober- und Blattunterseite untersucht. Mit Hilfe einer Gießbehandlung sollte zusätzlich die Wirkstoffaufnahme über die Wurzeln der Versuchspflanzen ermittelt werden.

Die Applikationstechnik kann einen entscheidenden Beitrag zur Wirkstoffaufnahme darstellen. Daher wurde der Einfluß der Applikationstechnik mittels eines Gelbildners und einer Saatgutbehandlung auf die Aufnahme und den Transport von ausgewählten Pflanzenextrakten untersucht. Hierzu wurden einerseits die Extrakte mit Hilfe eines Gelbildner formuliert und auf den Stamm und den Blattansatz der Versuchspflanzen appliziert und andererseits eine Saatgutapplikation durchgeführt. Ein Transport der wirksamen Substanzen zwischen den Blattetagen bzw. den Blatteilen konnte nicht festgestellt werden. Die Wirksamkeit der Extrakte zeigte sich nur auf den behandelten Pflanzenteilen (Abb. 26).

Eine Applikation der Extrakte an die Wurzeln der Pflanzen mittels Gießbehandlung erbrachte ebenfalls keinen Transport in andere Pflanzenteile.

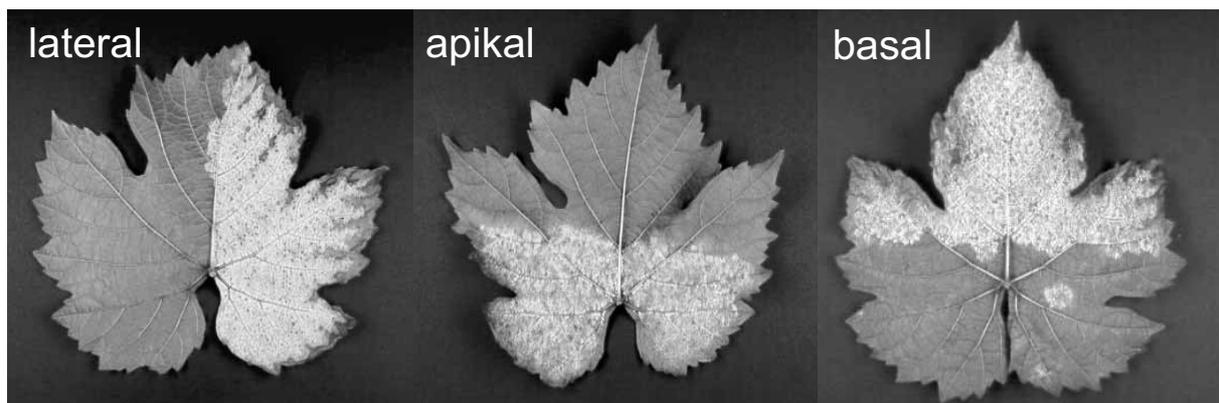


Abb. 26: Einfluß einer protektiven Spritzapplikation eines 1 %-igen Pflanzenextraktes aus *Salvia officinalis* auf den Transport der wirksamem Substanzen. Befall von Weinblättern mit *Plasmopara viticola*.

Zur Beurteilung der Effizienz einer Saatgutbehandlung bzw. zur Abschätzung möglicher phytotoxischer Effekte durch Pflanzenextrakte wurde als Untersuchungsparameter die Auflauftrate der Weizenkörner erfaßt.

Hierzu erfolgte als Kontrolle eine Aussaat der Körner *in vitro* auf Filterpapier und *in vivo* in Kultursubstrat. Die Keimrate der unbehandelten Weizenkörner lag *in vitro* bei 97 % und die Auflauftrate *in vivo* bei 96 %. Die Applikation der Leerformulierung beeinflusste die Auflauftrate minimal (94 %). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte die Saatgutbehandlung mit Pflanzenextrakten zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Auflauftrate (Tab. 18). Den

stärksten Einfluß auf die Auflauftrate zeigte die Behandlung mit *Satureja hortensis* (28 %), den schwächsten Effekt zeigte die Applikation mit *Pimenta dioica* (85 %; Abb. 27).

Zur Untersuchung der Wirksamkeit von Saatgutapplikation erfolgte die Aussaat der gebeizten Körner in mit *M. nivale* bzw. *G. graminis* beimpften Boden.

In allen Varianten konnte nach der Aussaat in mit *M. nivale* inokuliertem Boden eine signifikant verminderte Auflauftrate beobachtet werden. Keiner der untersuchten Extrakte zeigte eine Wirkung gegen *M. nivale* (Tab. 19). Auf Grund der deutlich verminderten Auflauftrate der Weizenkörner der Leerformulierung und der unbehandelten Kontrolle läßt sich ableiten, daß die Beimpfung der Bodens mit den Pathogenen erfolgreich war.

Tab. 18: Einfluß einer Saatgutapplikation mit Pflanzenextrakten auf die Auflauftrate von Weizen 'Toronto' (Anzahl Körner pro Variante = 40; n = 4). Werte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Reihe unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

Behandlung	Zahl der aufgelaufenen Pflanzen	Auflauftrate (%)
Unbehandelt	154	96 a
Leerformulierung	150	94 a
<i>Pimenta dioica</i>	136	85 a
<i>Rosa canina</i>	124	78 b
<i>Potentilla erecta</i>	117	73 b
<i>Origanum vulgare</i>	106	66 b
<i>Satureja hortensis</i>	45	28 c



Abb. 27: Einfluß einer Saatgutapplikation mit Pflanzenextrakten auf den Auflauf von Weizenkörner der Sorte 'Toronto'. (Behandlungen von links nach rechts mit: Leerformulierung, *Origanum vulgare*, *Rosa canina*, *Pimenta dioica*, *Potentilla erecta* und *Satureja hortensis*)

Gegen *G. graminis* zeigte im Vergleich zur Leerformulierung (80 %) die Applikation des Extraktes aus *P. erecta* eine signifikante Steigerung der Auflauftrate (89 %; Tab. 19). Alle anderen Saatgutapplikationen ließen keine Wirksamkeit gegenüber *G. graminis* erkennen und führten zu einem deutlich verminderten Auflauf der Körner.

Tab. 19: Einfluß der Saatgutapplikation von Pflanzenextrakten auf den Auflauf von Weizen 'Toronto' in mit *Microdochium nivale* bzw. *Gaeumannomyces graminis* inokuliertem Boden (Anzahl Körner pro Variante = 40; n = 4). Werte mit unterschiedlichen Buchstaben in einer Reihe unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

Behandlung	Auflauftrate (%)	
	<i>M. nivale</i>	<i>G. graminis</i>
Leerformulierung	56 a	80 b
<i>Potentilla erecta</i>	28 b	89 a
<i>Satureja hortensis</i>	24 c	69 c
<i>Origanum vulgare</i>	9 d	64 c
<i>Rosa canina</i>	8 d	36 d
<i>Pimenta dioica</i>	5 e	31 d

3.3.4 Fungizide bzw. fungistatische Wirkung

Zur Untersuchung, ob es sich bei der beobachteten Wirksamkeit der Pflanzenextrakte aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta* um fungizide oder fungistatische Effekte handelt, wurden Experimente zum Myzelwachstum der Pathogene *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea* und *Alternaria solani* durchgeführt.

Untersucht wurde, ob Myzel, welches sieben Tage auf Agar-Platten inkubiert wurde, die eine Extraktkonzentration von 0,5 % im Medium beinhaltet, nach dem Überführen auf unbehandeltes Medium Wachstum bzw. Veränderungen in der Morphologie zeigte.

Bei allen drei untersuchten Pathogenen konnte nach der Überführung des Myzels auf das behandelte Medium eine deutliche Wachstumsreduktion gegenüber unbehandelt beobachtet werden. Myzel von *P. infestans* zeigte bei beiden Extrakten eine vollständige Reduktion des Myzelwachstums. Nach der Überführung des Myzels auf unbehandelte Agar-Platten konnte auch auf diesem Medium kein Wachstum des Myzels festgestellt werden.

Bei den Pathogenen *B. cinerea* und *A. solani* ließ sich eine Wirksamkeit der Extrakte von 87 bis 100 % gegenüber unbehandelt beobachten. Das Wachstum beider Pathogene zeigte auf

mit *P. erecta* behandelten Medium deutliche Wachstumsdeformationen. Auf Platten, die mit dem Extrakt aus *S. officinalis* behandelt wurden, konnten diese Veränderungen am Myzel nur bei *B. cinerea* beobachtet werden.

Myzel, welches auf unbehandeltes Medium übertragen wurde, zeigte in Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine Beeinträchtigung des Myzelwachstums.

3.3.5 Einfluß der Formulierung auf die Wirksamkeit

Die Formulierung von Substanzen kann einen entscheidenden Effekt auf deren Wirksamkeit ausüben. Neben einem möglichen Einfluß auf die Aufnahme, die Belagsbildung auf der Pflanzenoberfläche und die Haltbarkeit auf der Pflanze, können auch synergistische Effekte durch die Zugabe von Formulierhilfsstoffen auftreten.

In folgenden Experimenten sollte dieser mögliche Einfluß der Formulierung auf die Wirksamkeit von ausgesuchten Pflanzenextrakten im Wirt-Pathogen-Modell *Phytophthora infestans* an Tomate näher untersucht werden. Ermittelt wurde die Wirksamkeit der Extrakte aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta* unter Verwendung von Formulierhilfsstoffen. Der Einfluß von Netzmitteln auf die Belagsbildung der Extrakte auf der Blattoberfläche und die damit verbundene Wirksamkeit der Pflanzenextrakte ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tab. 20: Einfluß der Formulierung mit Netzmitteln auf die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten (0,5 % TS) gegenüber *Phytophthora infestans* an Tomate. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede nach Tukey $p \leq 0,05$. (n = 2)

	Wirkungsgrad nach ABBOTT (%)			
	Rohextrakt	Extrakt + TWEEN 20 [®]	Extrakt + RENEX 36 [®]	Extrakt + CITOWETT [®]
<i>Salvia officinalis</i>	71 a	87 a	85 a	82 a
<i>Potentilla erecta</i>	68 a	82 a	74 a	79 a

Gegenüber dem unformulierten Rohextraktes (0,5 % TS) bewirke die Zugabe der Netzmittels in den unter 2.3.3.2 angegebenen Konzentrationen eine Steigerung der Wirkung. Die höchste Wirksamkeit konnte bei beiden Extrakten durch die Formulierung mit dem Netzmittel TWEEN[®] 20 erzielt werden. Eine Eigenwirkung der Substanzen konnte in Vorversuchen nicht festgestellt werden.

Untersuchungen zur Beeinflussung des Abwaschverhaltens von Pflanzenextrakten (1% TS), durch die Zugabe des Haftmittels BOND[®] sind in Abbildung 28 dargestellt.

Im Vergleich mit den unformulierten Varianten der Pflanzenextrakte ließ sich eine signifikante Wirkungssteigerung durch die Zugabe des Haftmittels erkennen. Die Leerformulierung zeigte nur eine sehr geringe Eigenwirkung.

Der Einfluß der als Additiv zugesetzten Linolsäure auf die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten führe bei beiden Extrakten zu einer höheren Wirksamkeit. Gegenüber den unformulierten Rohextrakt (0,1 % TS) ließ sich diese Wirkungssteigerung bei der Applikation des Extrakt aus *P. erecta* signifikant absichern (Abb. 29). Untersuchungen zur Eigenwirkung der Linolsäure zeigten keinen Einfluß auf den Befall von Tomaten mit *P. erecta*.

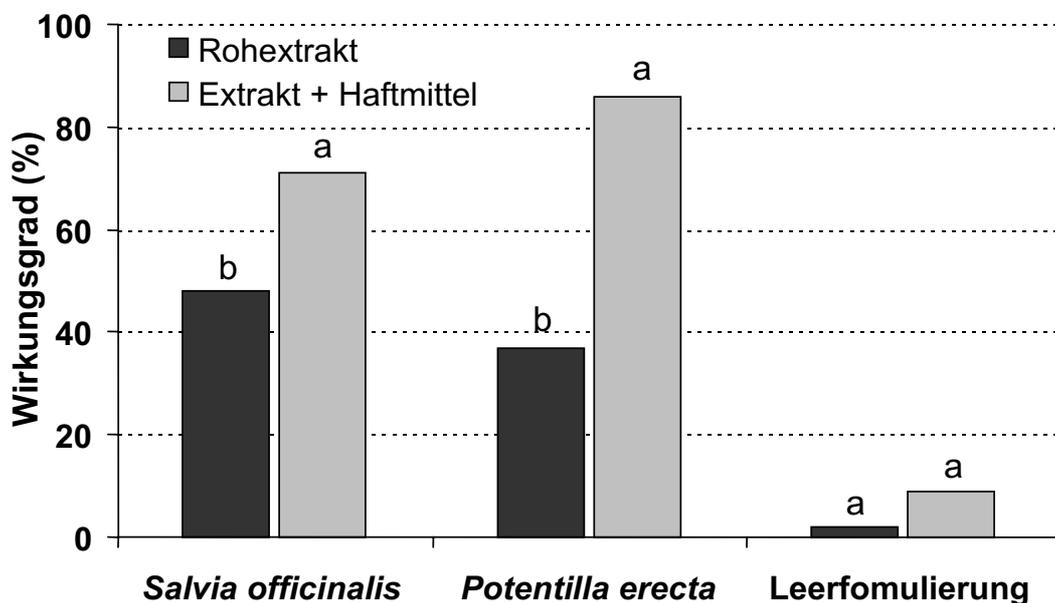


Abb. 28: Einfluß der Formulierung von Pflanzenextrakten (1 % TS) mit dem Haftmittel BOND[®] auf das Abwaschverhalten von Pflanzenextrakten (Wirt-Pathogen-Modell *Phytophthora infestans* - Tomate). Unterschiedliche Buchstaben einer Säulengruppe kennzeichnen signifikante Unterschiede nach Tukey $p \leq 0,05$

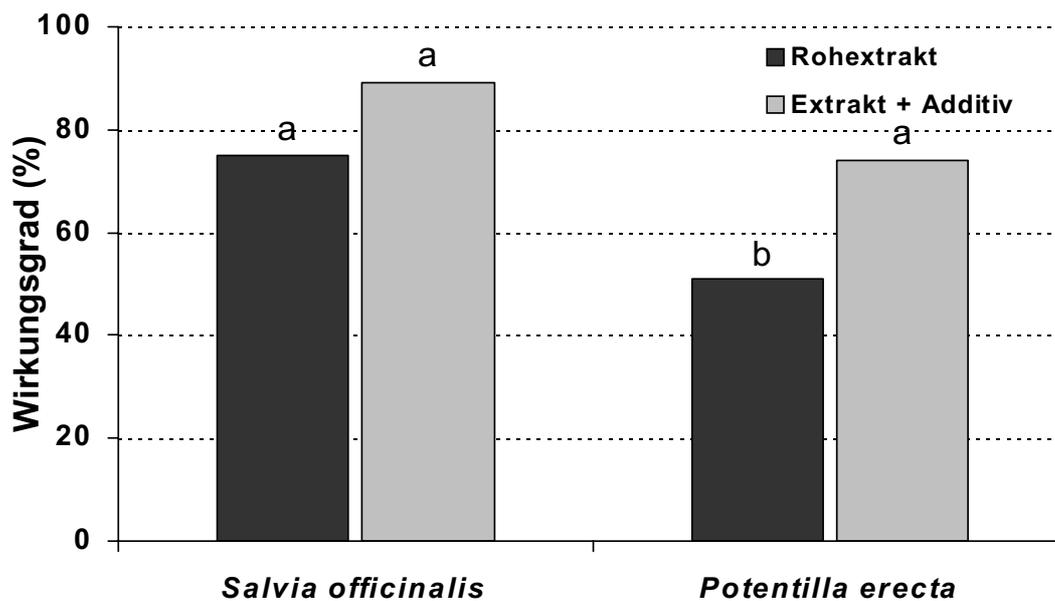


Abb. 29: Einfluß der Formulierung von Pflanzenextrakten (0,1 % TS) mit Linolsäure (1000 ppm) auf die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten im Wirt-Pathogen-Modell *Phytophthora infestans* an Tomate. Unterschiedliche Buchstaben einer Säulengruppe kennzeichnen signifikante Unterschiede nach Tukey $p \leq 0,05$

3.3.6 Einfluß der Applikation auf den Stoffwechsel der Pflanzen

Der Einfluß von Behandlungen mit Pflanzenextrakten auf den Photosyntheseapparat und die CO_2 - Assimilation der Pflanzen, die als Energie- und Baustofflieferanten weitgehend die pflanzliche Wachstums- und Ertragsleistung bestimmen, wurde mit Chlorophyllfluoreszenz- und Gaswechselformung quantifiziert. Dabei sollten in erster Linie die Auswirkungen möglicher latenter phytotoxischer Effekte auf die Pflanzen erfaßt werden. Als Versuchspflanzen wurden Reben der Sorte 'Müller-Thurgau' verwendet, da sie sich in Vorversuchen als sehr empfindlich erwiesen hatten.

3.3.6.1 Einfluß von Pflanzenextrakten auf Photosyntheseleistung

Wie in Tabelle 21 und 22 ersichtlich, bewirkte die Applikation der Extrakte (1 % TS) aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta* zwei Tage vor der Messung keine Veränderung der einzelnen Chlorophyllfluoreszenzparameter im Vergleich zur Leerformulierung bzw. unbehandelten Pflanzen. Auch die maximale Fluoreszenz (F_m) als Maß für die maximal mögliche Energetisierung der Membranen unterschieden sich nicht gegenüber unbehandelt Pflanzen.

Sowohl die Werte für die Elektronentransportrate (Yield) am Photosystem II, die minimale Fluoreszenz (f_0), die als Indikator für Membranschädigungen der Chloroplasten gelten kann als auch die maximale Fluoreszenz (F_m) als Maß für die maximal mögliche Energetisierung der Membranen unterschieden sich nicht gegenüber unbehandelten Pflanzen.

Der photochemische Quench (qP) als Maß für die Energie, welche über den Photosyntheseapparat umgesetzt werden kann und der nicht photochemische Quench (qN), als Maß für die Energie, die nicht in die Photosynthese umgewandelt werden kann und als Wärmestrahlung verloren geht, ließen auch keine Unterschiede zu den unbehandelt Pflanzen erkennen.

Tab. 21: Einfluß von Pflanzenextrakten (1 %) und der Leerformulierung (7 % Äthanol + 0,0125 % TWEEN® 20) auf die Messdaten der Chlorophyllfluoreszenz von Reben zwei Tage nach Applikation. (n = 4)

Behandlung	Minimale Fluoreszenz (F₀)	Maximale Fluoreszenz (F_m)	Elektronen- transportrate (Yield)	F_m'
Unbehandelt	0,217	0,903	0,396	0,515
StdAbw.	0,010	0,060	0,035	0,066
Leerformulierung	0,222	0,926	0,401	0,569
StdAbw.	0,006	0,020	0,049	0,029
<i>Salvia officinalis</i>	0,226	0,977	0,432	0,595
StdAbw.	0,010	0,011	0,054	0,082
<i>Potentilla erecta</i>	0,216	0,903	0,408	0,524
StdAbw.	0,020	0,102	0,053	0,025

Tab. 22: Einfluß von Pflanzenextrakten (1 %) und der Leerformulierung (7 % Äthanol + 0,0125 % TWEEN® 20) auf die Messdaten der Chlorophyllfluoreszenz von Reben zwei Tage nach Applikation. (n = 4)

Behandlung	Photochemischer Quench (qP)	Nicht-photochemischer Quench (qN)	(F_v/F_m)
Unbehandelt	0,691	0,567	0,759
StdAbw.	0,049	0,070	0,011
Leerformulierung	0,658	0,507	0,760
StdAbw.	0,070	0,047	0,006
<i>Salvia officinalis</i>	0,707	0,510	0,769
StdAbw.	0,059	0,115	0,008
<i>Potentilla erecta</i>	0,693	0,545	0,761
StdAbw.	0,092	0,067	0,009

3.3.6.2 Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Assimilation und Dissimilation

Der Einfluß der Pflanzenextrakte aus *Salvia officinalis*, *Potentilla erecta* sowie der Leerformulierung auf den Gaswechsel von Reben ist in Tabelle 23 dargestellt. Es zeigte sich, daß die Leerformulierung der Extrakte gegenüber den unbehandelten Pflanzen einen deutlichen Effekt auf den Stoffwechsel der Versuchspflanzen ausübte (Tab. 23). Dieser Einfluß spiegelte sich auch in den Werten der Extrakte wieder. Dennoch lagen die Werte der Extraktapplikationen über denen der Leerformulierung, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die wirksamen Substanzen in den Extrakten keinen Einfluß auf den Gaswechsel der Pflanzen ausübten.

Abb. 23: Einfluß von Pflanzenextrakten (1 %) und der Leerformulierung (7 % Äthanol + 0,0125 % TWEEN® 20) auf den Gaswechsel von Reben zwei Tage nach Applikation. n = 4

	Transpirationsrate (mmol/gs)		Assimilationsrate (µmol/gs)		Interzelluläre CO ₂ Konz. (ppm)	
	Licht	Dunkel	Licht	Dunkel	Licht	Dunkel
Unbehandelt	3,25	2,50	32,17	-3,04	290,25	421,75
StdAbw.	0,87	0,41	5,79	0,29	18,93	16,86
Leerformulierung	1,94	1,70	24,92	-2,69	230,25	426,50
StdAbw.	1,09	0,87	3,28	0,30	84,55	41,11
<i>Salvia officinalis</i>	1,73	1,94	25,81	-2,75	239,75	421,00
StdAbw.	0,15	1,09	0,25	3,28	34,43	23,10
<i>Potentilla erecta</i>	2,09	1,84	27,66	-2,44	263,75	421,00
StdAbw.	0,62	0,32	0,45	4,53	18,06	20,65

3.3.7 Einfluß auf die Entwicklungsstadien von pilzlichen Strukturen

Zur Untersuchung der Wirkungsweise ausgewählter Pflanzenextrakte gegenüber unterschiedlichen Entwicklungsstadien pilzlicher Pathogene wurden licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Untersucht wurde der Einfluß auf die wichtigsten Entwicklungsstadien der beiden Oomyceten *Phytophthora infestans* und *Plasmopara viticola* sowie der beiden Pathogene *Botrytis cinerea* und *Uromyces phaseoli*. Beobachtet wurde die Wirksamkeit der Extrakte aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta* auf die Zoosporentlassung, die Zoosporenbeweglichkeit, die Sporen bzw. Zoosporenkeimung *in vitro* und *in vivo* auf Blattscheiben sowie auf das Myzelwachstum von *P. infestans* und *B. cinerea*.

3.3.7.1 Zoosporentlassung

In der unbehandelten Kontrolle konnte eine 85 %-ige Zoosporentlassung aus Sporangien von *P. infestans* ermittelt werden. Die Leerformulierung bewirkte nur einen leichten Rückgang der Zoosporentlassung von sieben Prozent ab einer Konzentration von 0,175 % Äthanol. Auch höhere Konzentrationen der Leerformulierung (1,75 %) zeigten nur einen geringfügig stärkeren Einfluß auf die Zoosporentlassung (9 %) gegenüber unbehandelt.

Von den untersuchten Extrakten hatte der Extrakt aus *S. officinalis* den stärksten Einfluß auf die Zoosporentlassung (Abb. 30). Die Applikation des Extraktes in einer Konzentration von 0,0055 % bewirkte einen 50 Prozentigen Rückgang der Zoosporentlassung gegenüber unbehandelt. Dieser Effekt führte in höheren Konzentrationen (0,015 %) zu einem vollständigen Einstellen der Zoosporentlassung. Der Extrakt aus *P. erecta* zeigte einen ähnlich starken Einfluß auf die Entlassung der Zoosporen erst ab einer Konzentration von 0,015 % (50 %-ige Reduktion). Konzentrationen von 0,28 % bewirkten eine vollständiges Erliegen der Zoosporentlassung.

Die Zoosporentlassung aus Sporangien von *P. viticola* wurde in den unbehandelten Kontrollen mit 73 % bonitiert. Die Leerformulierung der Extrakte verursachte hier einen stärkeren Einfluß auf die Zoosporentlassung als bei *P. infestans*. Sie lag aber dennoch mit Reduktionen von 12 % und 22 % gegenüber unbehandelt in den Äthanolkonzentrationen 0,35 % und 1,75 % in einem niedrigen Bereich. Gegenüber der Zoosporentlassung aus Sporangien von *P. viticola* zeigten beide Extrakte eine deutlich geringere Wirksamkeit als gegen die von *P. infestans* (Abb. 31).

Auch hier bewirkte die Applikation des Extraktes aus *S. officinalis* den stärksten Einfluß. So bewirkten Extraktkonzentrationen von 0,03 % einen Rückgang der Zoosporentlassung von mehr als die Hälfte gegenüber unbehandelt. Konzentration von 0,07 % reduzierten die Zoosporentlassung zu über zwei Drittel.

Die Wirkung der Extraktapplikationen von *P. erecta* lag auf einem niedrigeren Niveau. Konzentrationen von 0,06 % dieses Extraktes verursachten einen Rückgang der Zoosporentlassung von 50 %, erreichten aber ab einer Konzentration von 0,5 % ein annähernd gleich hohe Wirksamkeit wie die des Extraktes aus *S. officinalis*.

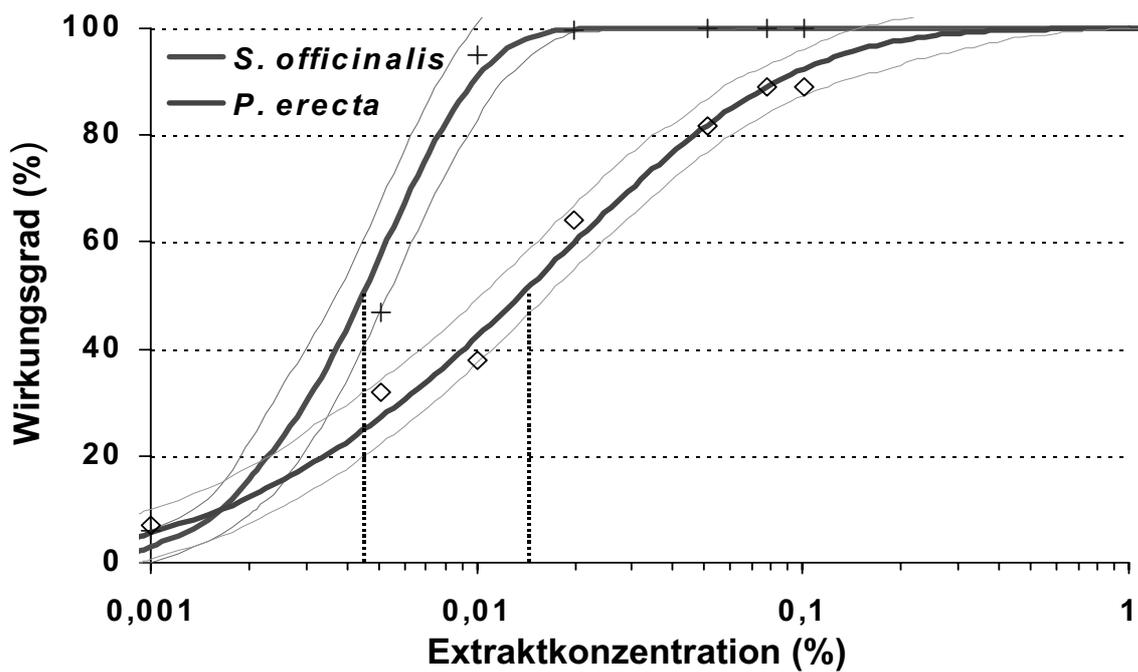


Abb. 30: Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Zoosporentlassung von *Phytophthora infestans*.

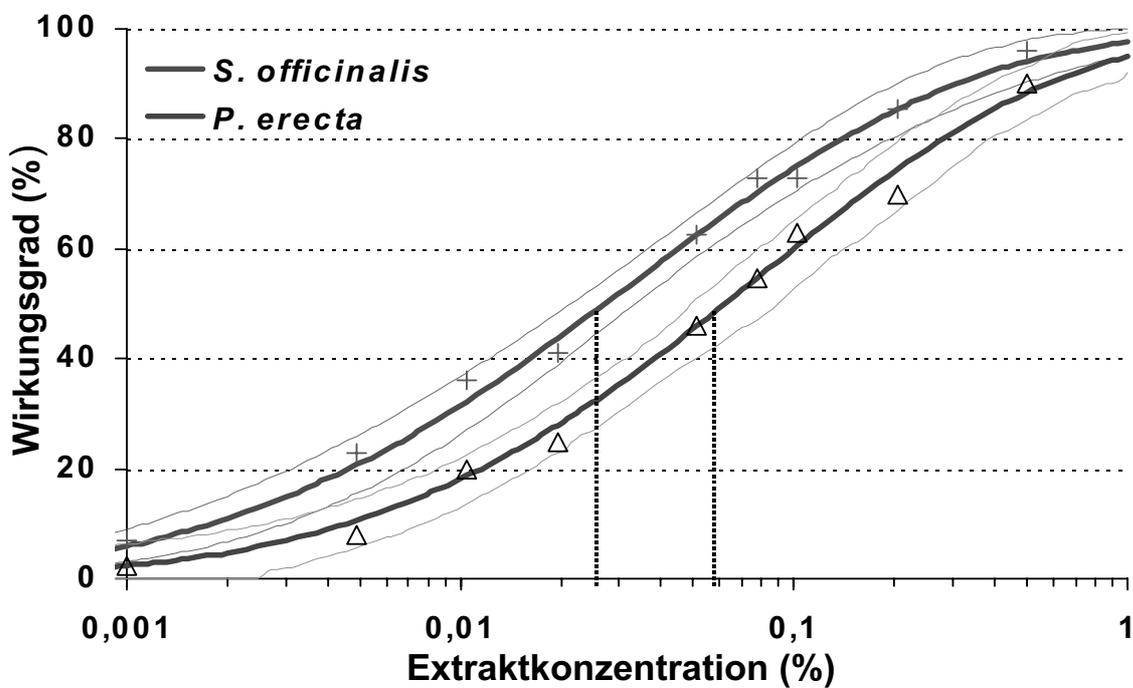


Abb. 31: Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Zoosporentlassung von *Plasmopara viticola*.

3.3.7.2 Zoosporenbeweglichkeit

Am Beispiel der Pflanzenextrakte aus *Potentilla erecta* und *Salvia officinalis* wurde der Einfluß der Extrakte auf die Zoosporenbeweglichkeit der beiden Oomyceten *P. infestans* und *P. viticola* untersucht.

Die Leerformulierung hatte im Mittel der vier Bonituren erst ab einer Konzentration von 1,75 % (was der Äthanolkonzentration eines 0,5 %-igen Extraktes entspricht) einen Einfluß auf die Beweglichkeit der Zoosporen. So konnte ab dieser Konzentration ein Rückgang der Zoosporenbeweglichkeit von 20 % beobachtet werden. Alle anderen Äthanolkonzentrationen zeigten keinen Einfluß auf die Zoosporenbeweglichkeit.

Den stärksten Einfluß auf die Zoosporenbeweglichkeit der beiden Pathogene konnte durch die Applikation des Extraktes aus *S. officinalis* erreicht werden. Ab einer Konzentration von 0,025 % führten die Behandlungen mit diesem Extrakt zu einem völligen Verlust der Beweglichkeit der Zoosporen von *P. infestans* (Abb. 32).

Eine Beeinträchtigung der Zoosporenbeweglichkeit zu 50 % zeigte sich bei Extraktapplikationen von 0,015 %. Gegenüber den Zoosporen von *P. viticola* zeigte sich dieser Effekt erst ab einer Konzentration von 0,036 % (Abb. 33).

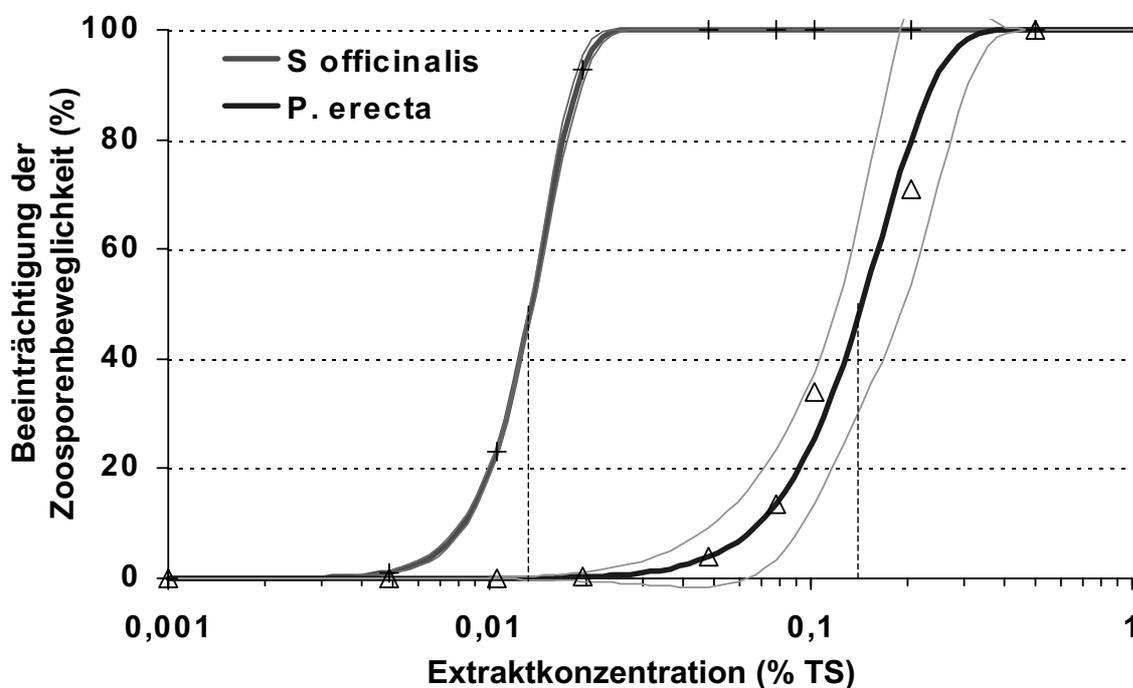


Abb. 32: Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Beweglichkeit der Zoosporen von *Phytophthora infestans*.

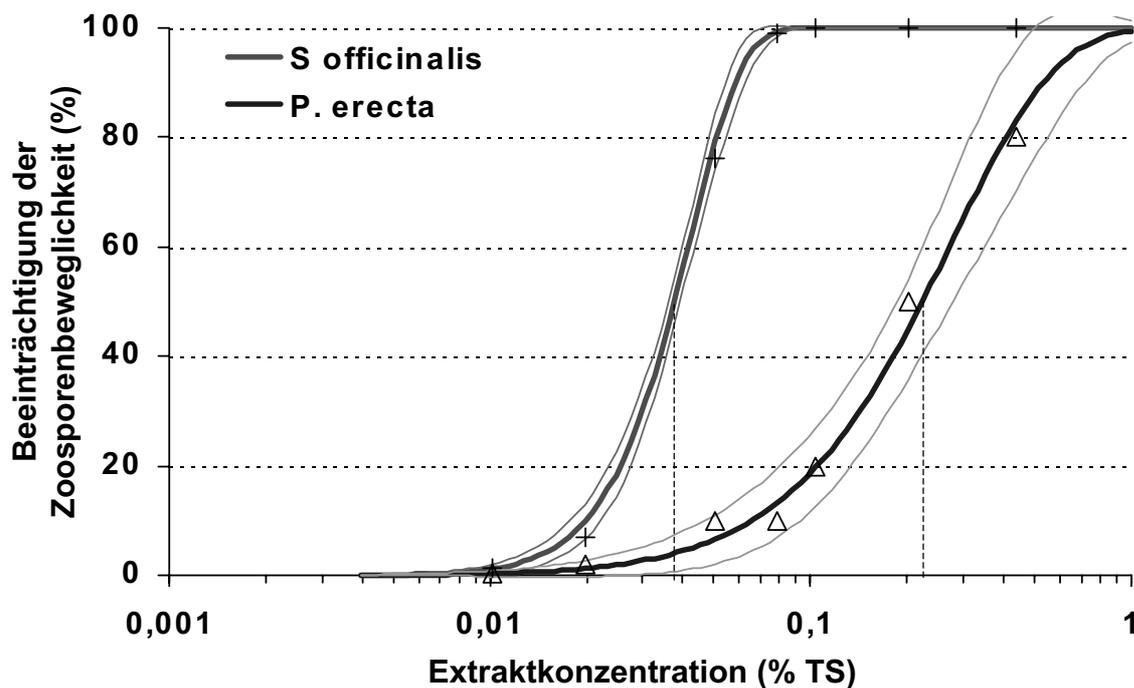


Abb. 33: Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Beweglichkeit der Zoosporen von *Plasmopara viticola*.

Der Extrakt aus *P. erecta* zeigte eine deutlich geringere Wirksamkeit. Er führte erst ab einer Konzentration von 0,35 % zu einem völligen Verlust der Zoosporenbeweglichkeit bei *P. infestans*. Gegenüber den Zoosporen von *P. viticola* konnte dieser Effekt in den untersuchten Konzentrationen nicht beobachtet werden. Hier ließ sich aber durch die Applikation des Extraktes ab einer Konzentration von 0,25 % eine Beeinträchtigung der Zoosporenbeweglichkeit zu über 50 % beobachten.

3.3.7.3 Zoosporen- bzw. Sporenkeimung

Die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten auf die Zoosporen- bzw. Sporenkeimung der beiden Oomyceten *Phytophthora infestans* und *Plasmopara viticola* sowie der beiden Pathogene *Botrytis cinerea* und *Uromyces phaseoli* wurde wie unter Punkt 2.5 beschrieben am Beispiel der beiden Extrakte aus *Potentilla erecta* und *Salvia officinalis* untersucht.

In den unbehandelten Kontrollen konnte bei *P. infestans* eine 93 %-ige und bei *P. viticola* eine 87 %-ige Zoosporenkeimung ermittelt werden. Die Leerformulierung bewirkte erst ab einer Konzentration von 0,7 % Äthanol eine nennenswerte Beeinträchtigung. Konzentrationen von 0,7 % Äthanol (entspricht der Konzentration eines 0,12 %-igen Extraktes) reduzierten bei *P. infestans* und bei *P. viticola* die Zoosporenkeimung um ungefähr ein Drittel gegen-

über unbehandelt. Geringere Konzentrationen beeinträchtigten die Keimung beider Pathogene nicht. Den stärksten Einfluß auf die Keimung der Zoosporen konnte bei beiden Pathogenen durch die Applikation des Extraktes aus *S. officinalis* beobachtet werden (Abb. 34 und 35). Die Behandlungen mit diesem Extrakt bewirkte gegenüber unbehandelt schon ab einer Konzentration von 0,005 % eine Reduktion der Keimung der Zoosporen von *P. infestans* zu über 50 %. Ab einer Extraktkonzentration von 0,06 % konnte eine 100 %-ige Beeinträchtigung der Zoosporenkeimung beobachtet werden. Auch gegenüber den Zoosporen von *P. viticola* zeigte die Applikation dieses Extraktes die höchste Wirksamkeit. So konnte ab einer Konzentration von 0,075 % eine 100 %-ige Hemmung der Keimung erzielt werden. Die Wirksamkeit des Extraktes aus *P. erecta* lag zwar unter der des Extraktes aus *S. officinalis*, dennoch konnte auch durch die Applikation dieses Extraktes eine deutliche Wirkung beobachtet werden (Abb. 34 und 35). Konzentrationen von 0,04 % reduzierten hier die Zoosporenkeimung beider Pathogene um mehr als die Hälfte.

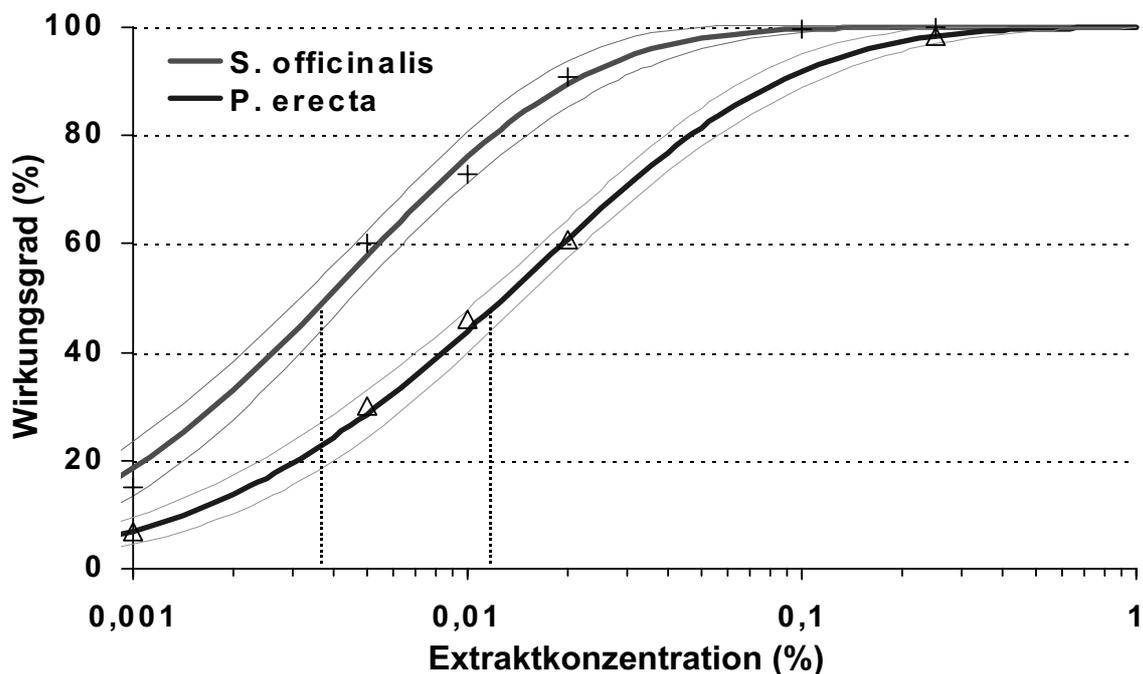


Abb. 34: Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Zoosporenkeimung von *Phytophthora infestans*.

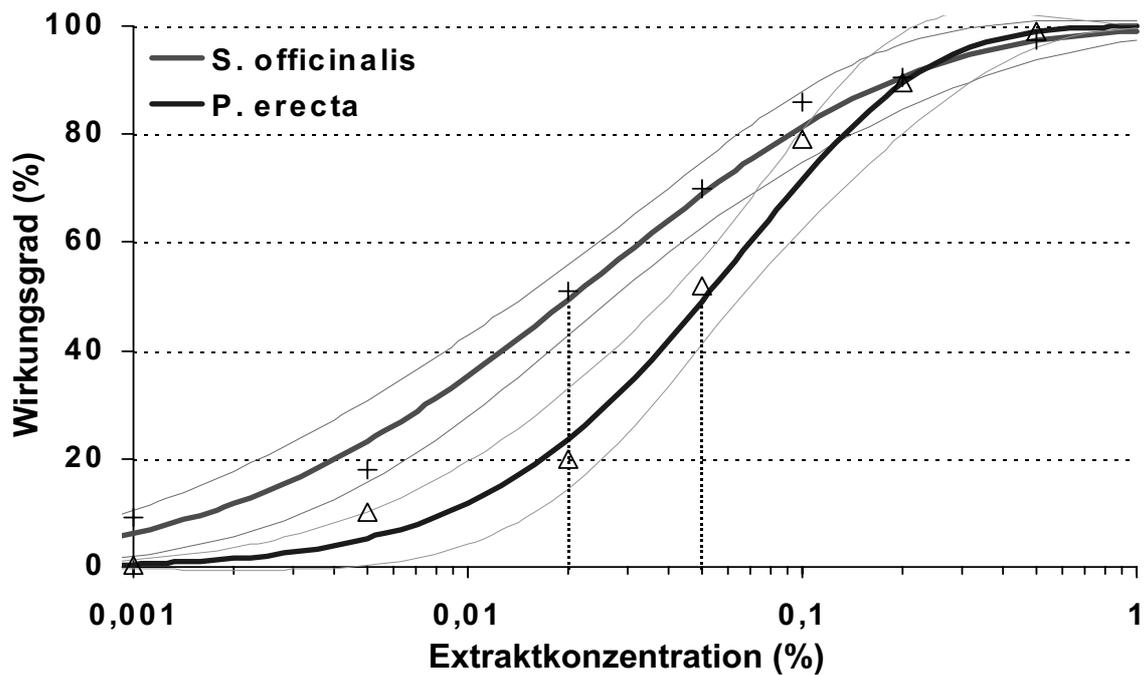


Abb. 35: Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Zoosporenkeimung von *Plasmopara viticola*.

Neben diesem deutlichen Einfluß auf die Zoosporenkeimung, ließ sich durch die Applikation des Extraktes aus *S. officinalis* noch ein weiterer starker Einfluß auf die Zoosporen beider Pathogene festgestellt werden. So zeigte sich nach der Inkubation der Zoosporen in einer Behandlungskonzentrationen von $> 0,1$ % eine völlige Zerstörung der Zoosporen (Abb. 36).

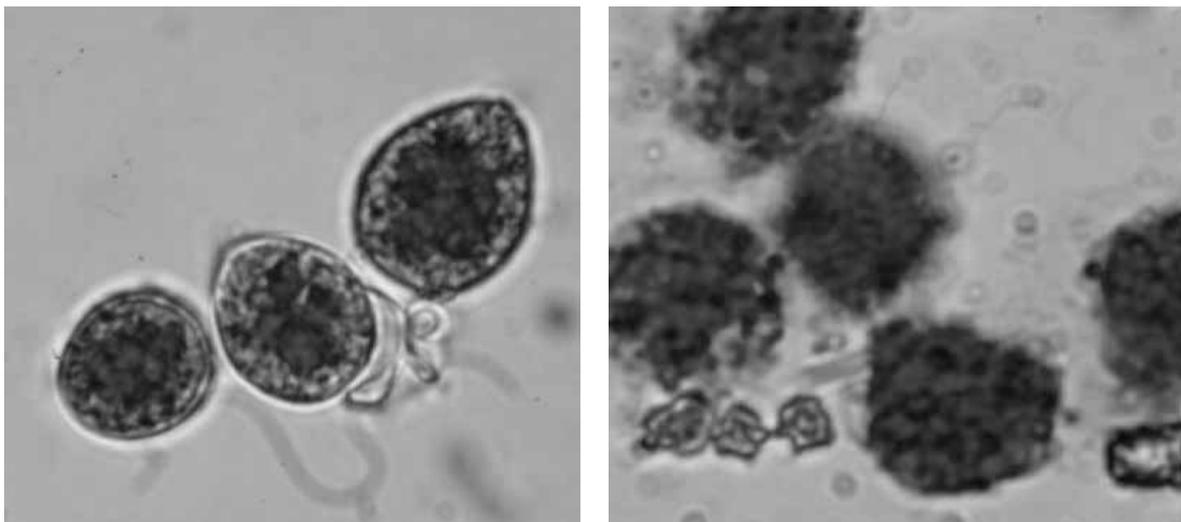


Abb. 36: Einfluß eines 0,025 %-igen Pflanzenextraktes aus *Salvia officinalis* auf die Zoosporen von *Phytophthora infestans* (Recht behandelt, links Leerformulierung; Färbung: Bengalrosa; 1000x).

Nähere Untersuchungen zu diesem Effekt des Extraktes aus *S. officinalis* auf die Zoosporen von *P. infestans* erfolgten mit dem Konfokalen Laser-Scan-Mikroskop.

Wie in Abbildung 37 zu sehen, konnte kurze Zeit nach der Zugabe des Extraktes (0,05 %) eine deutliche strukturelle Veränderung in den Zoosporen beobachtet werden. Dies äußerte sich in einer fortwährenden Zunahme von granulären Strukturen im Cytoplasma der Zoosporen und dem Zerplatzen der Zellmembranen nach ca. 11 Sekunden.

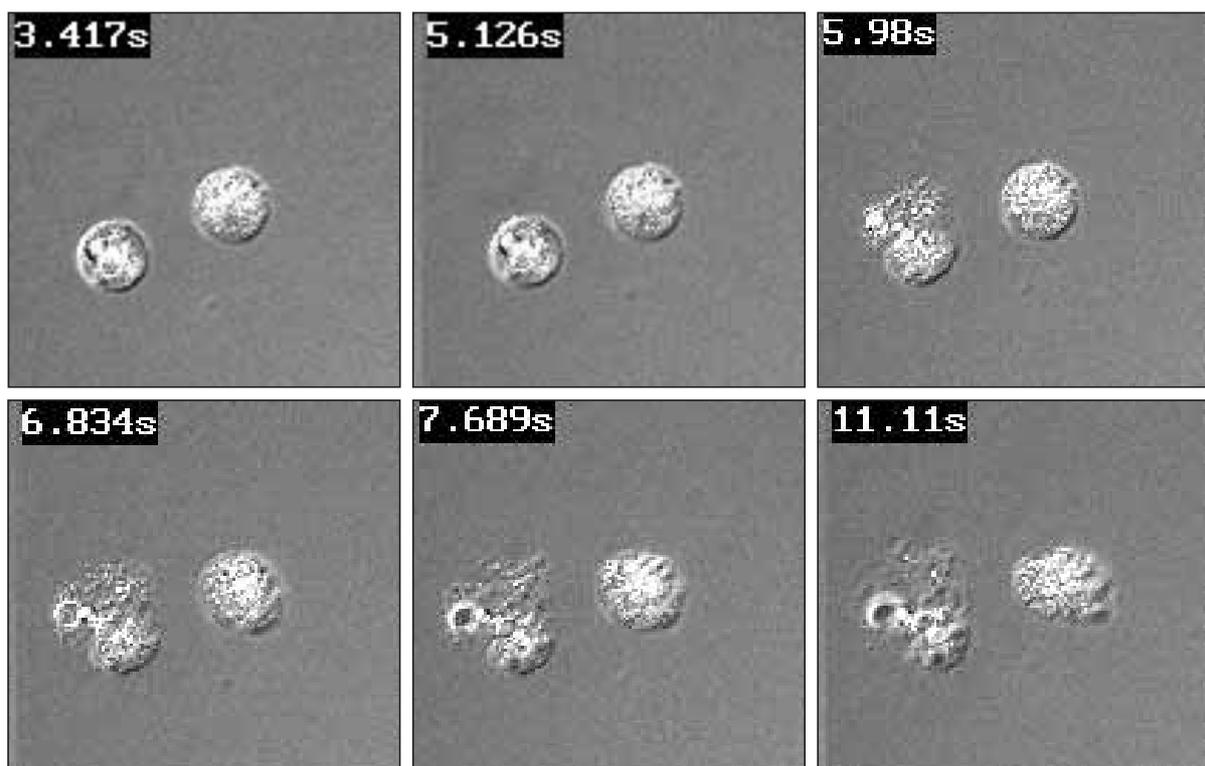


Abb. 37: Einfluß eines 0,05 %-igen Pflanzenextraktes aus *Salvia officinalis* auf die Zoosporen von *Phytophthora infestans*.

Gegenüber der Sporenkeimung von *B. cinerea* und *U. phaseoli* zeigte die Leerformulierung der Extrakte, ähnlich wie bei den vorherigen Pathogenen, nur eine geringfügige Beeinträchtigung der Sporenkeimung. So bewirkte die höchste untersuchte Äthanolkonzentration (3,5 %) bei *B. cinerea* nur eine Abnahme der Sporenkeimung von einem Prozent gegenüber unbehandelt (99 %). Applikationen der Leerformulierung in dieser Konzentration führten zwar bei *U. phaseoli* zu einer Beeinträchtigung der Sporenkeimung von 80 %, bei allen anderen Konzentrationen ließen sich aber nur eine Abnahme der Sporenkeimung von unter vier Prozent beobachten. In den unbehandelten Kontrollen von *B. cinerea* konnte eine

Sporenkeimung von durchschnittlich 98 % ermittelt werden und in denen von *U. phaseoli* eine von 75 %.

Die höchste Wirksamkeit gegenüber den Sporen des Bohnenrosts (*U. phaseoli*) zeigte sich durch die Applikation des Extraktes aus *S. officinalis* (Abb. 38). Ab einer Konzentration von 0,023 % des Extraktes konnte die Sporenkeimung von *U. phaseoli* zu 50 % reduziert werden. Applikationen von 0,2 % konnten die Keimung vollständig reduzieren.

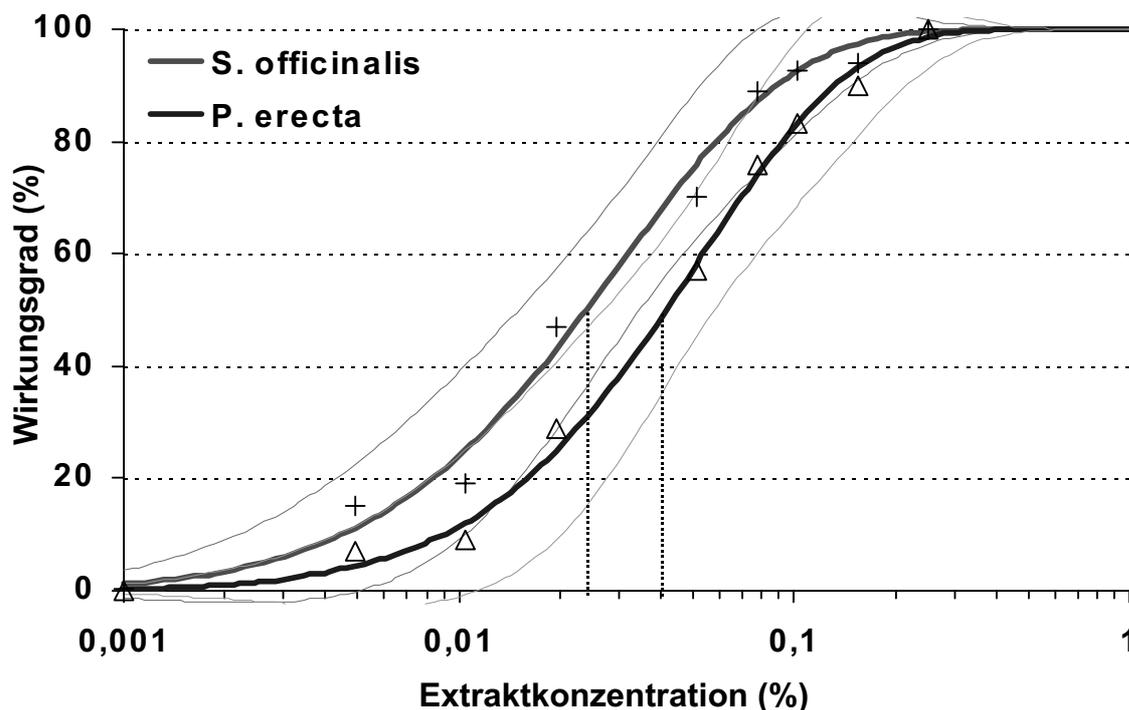


Abb. 38: Einfluß von Pflanzenextrakten in auf die Sporenkeimung von *Uromyces phaseoli*.

Behandlungen mit dem Extrakt aus *P. erecta* lagen zwar unter denen des Extraktes aus *S. officinalis*, erreichten aber dennoch deutliche Reduktionen der Sporenkeimung. So zeigte eine Applikation von 0,03 % dieses Extraktes eine 50 %-ige Reduktion der Sporenkeimung. Untersuchungen zur Wirksamkeit der beiden Extrakte gegenüber der Sporenkeimung von *B. cinerea* zeigten eine deutlich niedrigere Wirksamkeit. Keiner der Extrakte konnte in den untersuchten Konzentrationen die Sporenkeimung zu mehr als ein Drittel reduzieren (Abb. 39).

Auch gegenüber *B. cinerea* zeigte die Applikation des Extraktes aus *S. officinalis* die höchste Wirksamkeit. Behandlungen in einer Konzentrationen von 0,5 % des Extraktes reduzierten die Sporenkeimung gegenüber unbehandelt zu über einem Drittel. Applikationen des Extraktes aus *P. erecta* im der selben Konzentration reduzierten die Sporenkeimung nur um durch-

schnittlich 7 % und unterschieden sich in niedrigeren Konzentrationen kaum gegenüber den der unbehandelten Varianten.

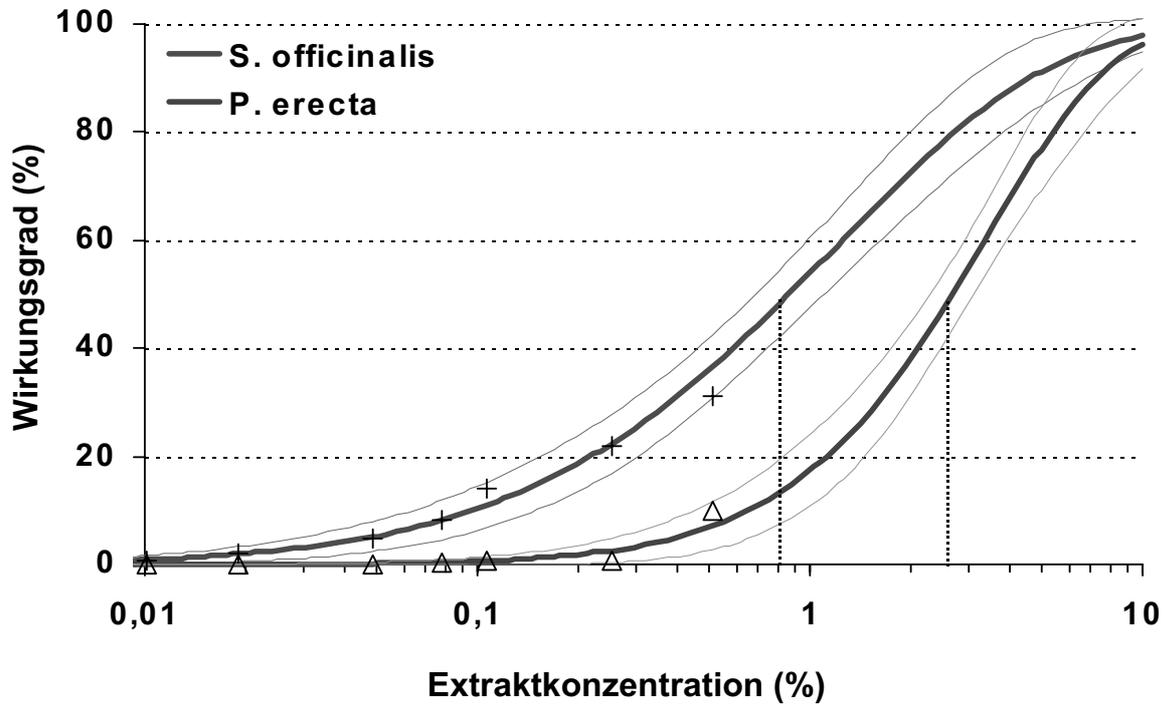


Abb. 39: Einfluß von Pflanzenextrakten auf die Sporenkeimung von *Botrytis cinerea*.

3.3.7.4 Infektionsstrukturen auf der Blattoberfläche

Mikroskopische Untersuchungen zeigten, daß die Keimrate der Zoosporen von *P. infestans* und *P. viticola* auf Blattscheiben, die mit den Extrakten aus *Cinnamomum camphora*, *Salvia officinalis* oder *Potentilla erecta* protektiv behandelt worden war, im Vergleich zu unbehandelt deutlich vermindert war. Wie aus Tabelle 24 ersichtlich, unterschieden sich die Extrakte in ihrer Hemmwirkung erheblich voneinander. Die signifikant höchste Wirkung zeigte die

Tab. 24: Einfluß einer protektiven 1 %-igen Spritzapplikation von Pflanzenextrakten auf die Zoosporenkeimung von *Phytophthora infestans* auf Blattscheiben (Tomate; n = 600). Unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Reihe unterscheiden sich signifikant nach Tukey; $\alpha \leq 0,05$.

Behandlung	Keimrate (%)		Wirkungsgrad (%)	
	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Plasmopara viticola</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Plasmopara viticola</i>
Unbehandelt	97 a	86 a	-	-
<i>Salvia officinalis</i>	10 c	8 c	90	91

<i>Potentilla erecta</i>	16 c	11 c	84	87
<i>Cinnamomum camphora</i>	34 b	23 b	65	73

Applikation des Extraktes aus *S. officinalis*. Durch die protektive Applikation dieses Extraktes konnte die Keimrate der Zoosporen von *P. infestans* zu 90 % und die von *P. viticola* zu 91 % gegenüber unbehandelt vermindert werden (Abb. 40). Eine ebenfalls deutliche Wirkung konnte bei den Behandlungen mit dem Extrakt aus *P. erecta* beobachten werden (Tab. 24). Die geringste Wirkung auf die Sporenkeimung beider Pathogene verursachte die Applikation des Extraktes aus *C. camphora*.

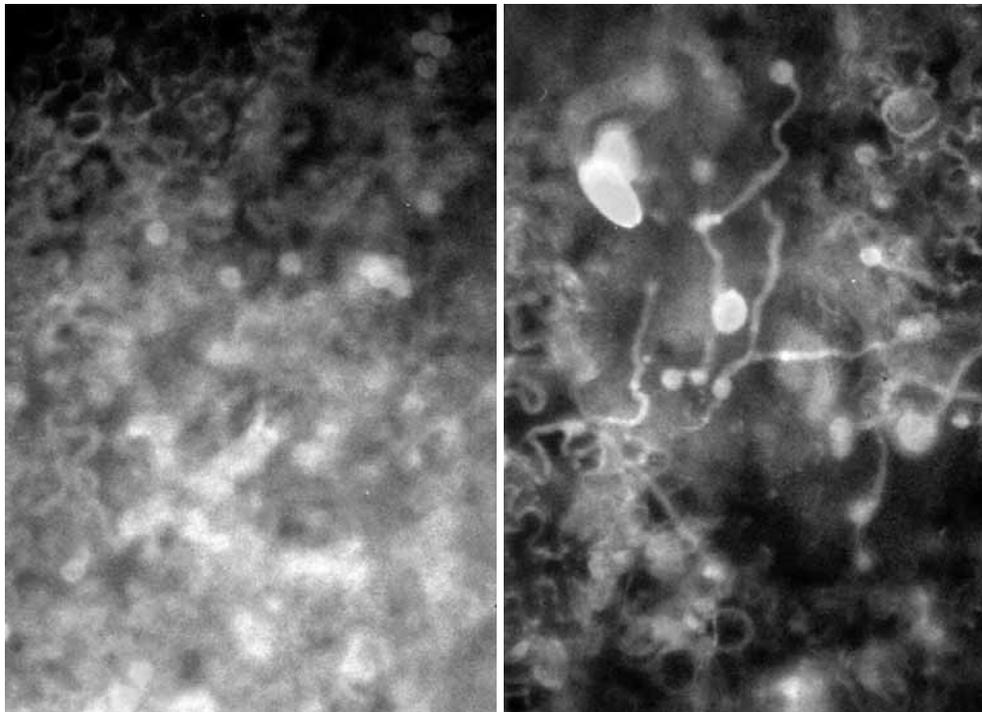


Abb. 40: Einfluß einer protektiven Applikation eines 1 %-igen Extraktes aus *Salvia officinalis* auf die Keimrate der Zoosporen von *Phytophthora infestans* auf Tomatenblattscheiben (Links behandelt, rechts unbehandelt).

3.3.7.5 Morphologische Veränderungen am Myzel

Untersuchungen zur Wirksamkeit der beiden Extrakte aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta* gegenüber dem Myzelwachstum des biotrophen Erregers *Phytophthora infestans* und dem perthotrophen Erreger *Botrytis cinerea* sind in Abbildung 41 und 42 dargestellt.

Ein Einfluß der Leerformulierung auf das Myzelwachstum von *P. infestans* konnte erst ab einer Konzentration von 1,225 % Äthanol (\approx einer Extraktkonzentration von 0,175 %) beobachtet werden.

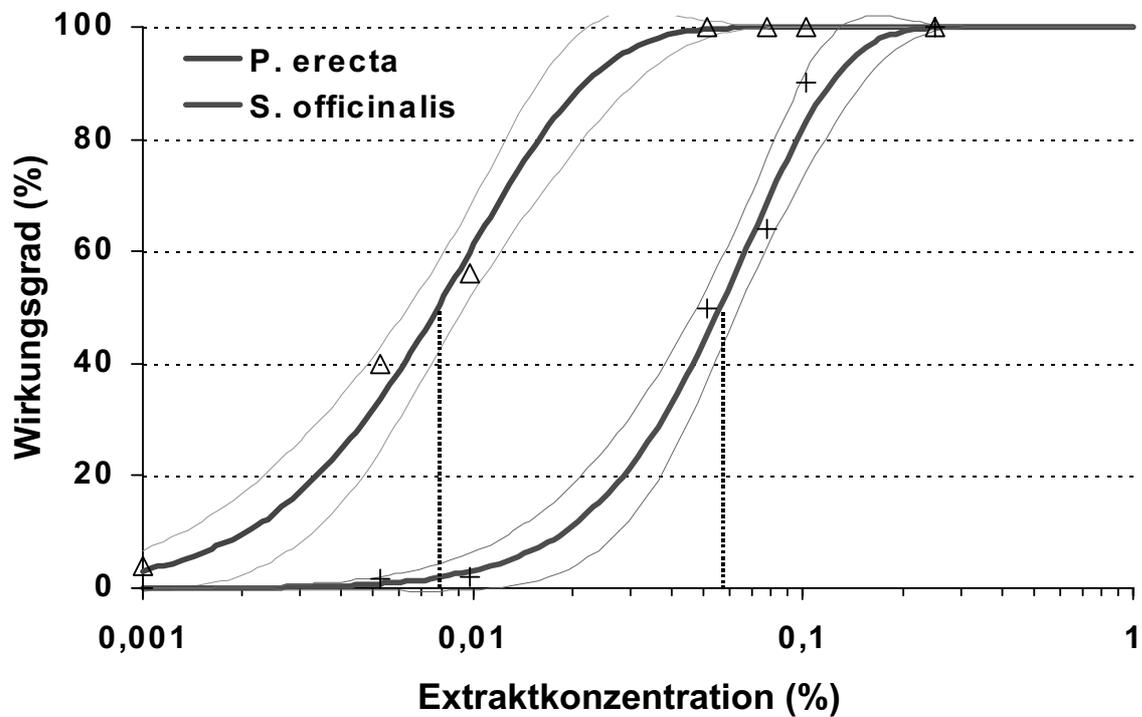


Abb. 41: Einfluß von Pflanzenextrakten auf das Myzelwachstum von *Phytophthora infestans*.

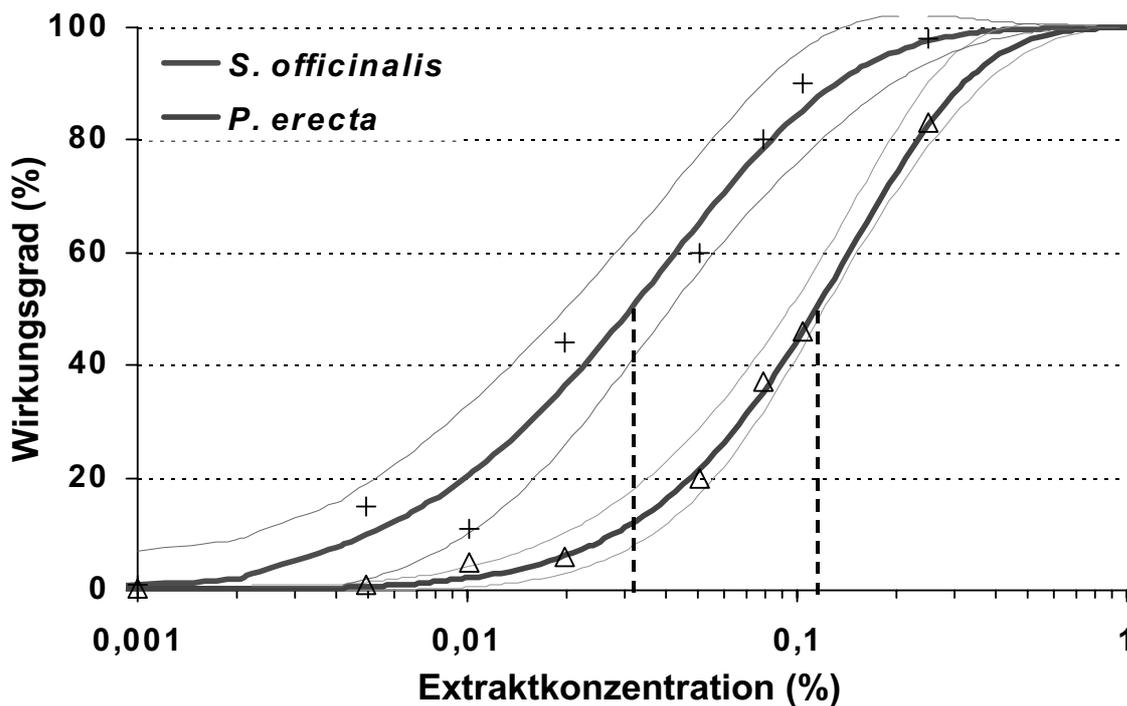


Abb. 42: Einfluß von Pflanzenextrakten auf das Myzelwachstum von *Botrytis cinerea*.

Gegenüber *B. cinerea* zeigte sich in keiner der untersuchten Konzentrationen ein Einfluß der Leerformulierung auf das Myzelwachstum ($\leq 1,75$ % Äthanol). Den stärksten Effekt auf des Myzelwachstum von *P. infestans* bewirkte die Applikation des Extraktes aus *P. erecta* (EC_{50} Wert = 0,008 %). Die Wirksamkeit des Extraktes aus *S. officinalis* lag auf einem deutlich niedrigeren Niveau (EC_{50} Wert = 0,058 %).

Untersuchungen zur Wirksamkeit der beiden Pflanzenextrakte auf das Myzelwachstum von *B. cinerea* zeigten, daß gegen diesen Erreger der Extrakt aus *S. officinalis* den stärksten Einfluß hatte (EC_{50} Wert = 0,032 %). Applikationen des Extraktes aus *P. erecta* verminderten das Myzelwachstum im geringeren Maße (EC_{50} Wert = 0,12 %).

Zur weiteren Aufklärung des Einflusses der Extraktes auf das Myzelwachstum von phytopathogenen Pilzen wurden mikroskopische Untersuchungen am Myzels von *P. infestans* nach Extraktapplikation durchgeführt.

Mikroskopische Beobachtungen ließen erkennen, daß Behandlungen mit dem Extrakt aus *P. erecta* ab einer Endkonzentration von 0,05 % im Agar morphologische Veränderungen am Myzel hervorriefen. Dies äußerte sich im Vergleich zu der Leerformulierung in einem gestauchten Wachstum und einer verstärkten Verzweigung des Myzels (Abb. 43).

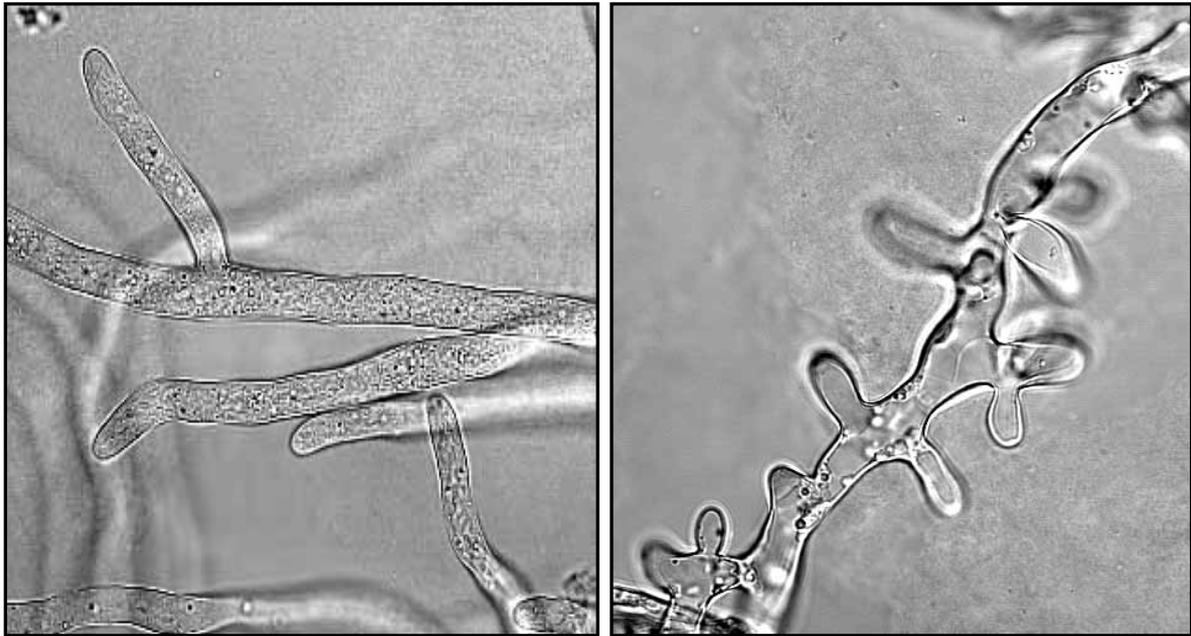


Abb. 43: Einfluß eines 0,05 %-igen Pflanzenextraktes aus *Potentilla erecta* auf das Myzelwachstum von *Phytophthora infestans*. (Links Leerformulierung, rechts behandelt, starke Verzweigungen und Stauchungen; 1000x).

Ähnliche Wirkungen auf das Myzel von *P. infestans* ließen sich durch die Behandlung mit den Extrakt aus *S. officinalis* in den untersuchten Konzentrationen (bis 0,5 %) nicht beobachten.

3.3.7.6 Cytologische Veränderungen am Myzel

Eine Ursache für die fungizide Wirkung von Pflanzenextrakten könnten Veränderungen und Schädigungen an der Zellwand oder den Membranen der Hyphen sein. Zur Analyse dieser möglichen Wirkungsweise wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen des Myzels der Pathogene *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani* und *Botrytis cinerea* durchgeführt.

Elektronenoptische Bilder der Hyphen von *P. infestans* verdeutlichten den Effekt der Pflanzenextrakte auf die Ultrastruktur des Myzels. Hyphen, welche mit dem Extrakt aus *P. erecta* behandelt worden waren zeigten bereits in geringen Konzentrationen ($\leq 0,01$ %) eine starke Vakuolisierung des Cytoplasmas. In höheren Konzentrationen ($> 0,01$ %) konnten neben der Vakuolisierung auch deutliche Veränderungen der Zellwände beobachtet werden. Dies äußerte sich in verdickten elektronendichteren Zellwandstrukturen, sowie dem Ablösen von Zellwandbestandteilen (Abb. 44).

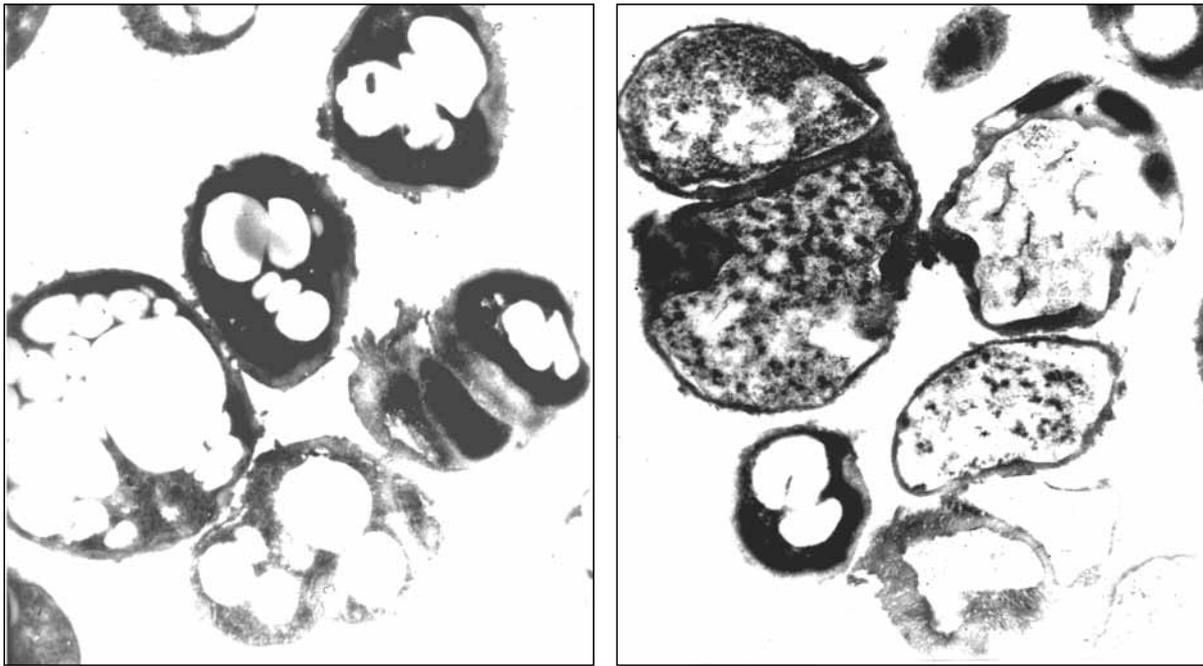


Abb. 44: Ultrastrukturelle Veränderungen der Hyphen von *Phytophthora infestans* nach Behandlung mit einem Pflanzenextrakt aus *Potentilla erecta* (0,025 %; Starke Vakuolisierung des Cytoplasmas; Elektronendichtere Zellwandveränderungen; 4000x).

Behandlungen mit dem Extrakt aus *S. officinalis* bewirkten erst in höheren Konzentrationen einen sichtbaren Einfluß auf die Hyphen. Ab einer Konzentration von 0,075 % zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten Hyphen eine verstärkte Vakuolisierung des Cytoplasmas (Abb. 45), sowie ein Ablösen des Plasmalemma von der Zellwand.

Mit Hilfe von ultrastrukturellen Untersuchungen konnte der Einfluß des Extraktes aus *P. erecta* auf die Morphologie der Pilzhyphen von *A. solani* bestätigt werden.

Es zeigten sich deutliche Veränderungen an den Zellwänden der Hyphen. Diese äußerten sich in einer Verdickung, welche wesentlich elektronendichter waren oder in dem Ablösen von Zellwandbestandteilen (Abb. 46). In manchen Fällen bewirkte der Extrakt eine völlige Degeneration der Hyphen. An behandelten Hyphen von *A. solani* löste sich das Plasmalemma ab und Zellbestandteile traten aus (Abb. 47).

Bei den Hyphen von *B. cinerea* bewirkten Behandlungen mit dem Extrakt aus *P. erecta* ab einer Konzentration von 0,175 % starke Veränderungen der Hyphen. Bei den meisten Hyphen ließen sich deutliche Degenerationserscheinungen des Cytoplasmas und elektronendichter Zellwände beobachten. Nach Applikationen von höheren Konzentrationen des Extraktes führte dies zu einer vollständigen Zerstörung der Hyphen (Abb. 48).

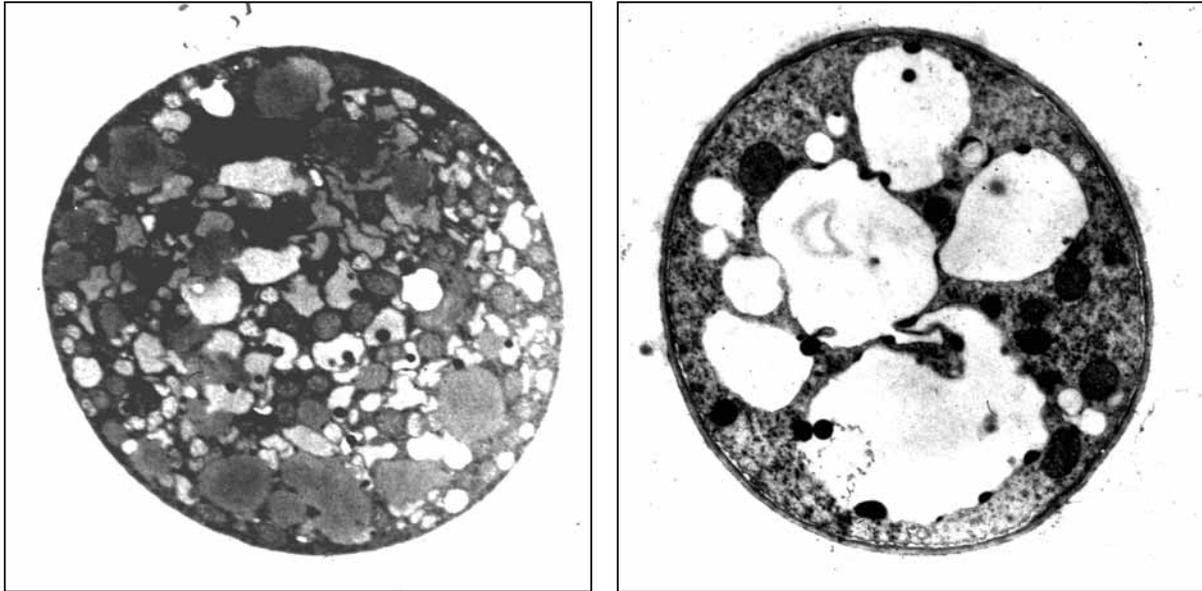


Abb. 45: Ultrastrukturelle Veränderungen der Hyphen von *Phytophthora infestans* nach Behandlung mit einem Pflanzenextrakt aus *Salvia officinalis* (0,075 % TS; rechts behandelt, links Leerformulierung; Starke Vakuolisierung des Cytoplasmas; 12000x).

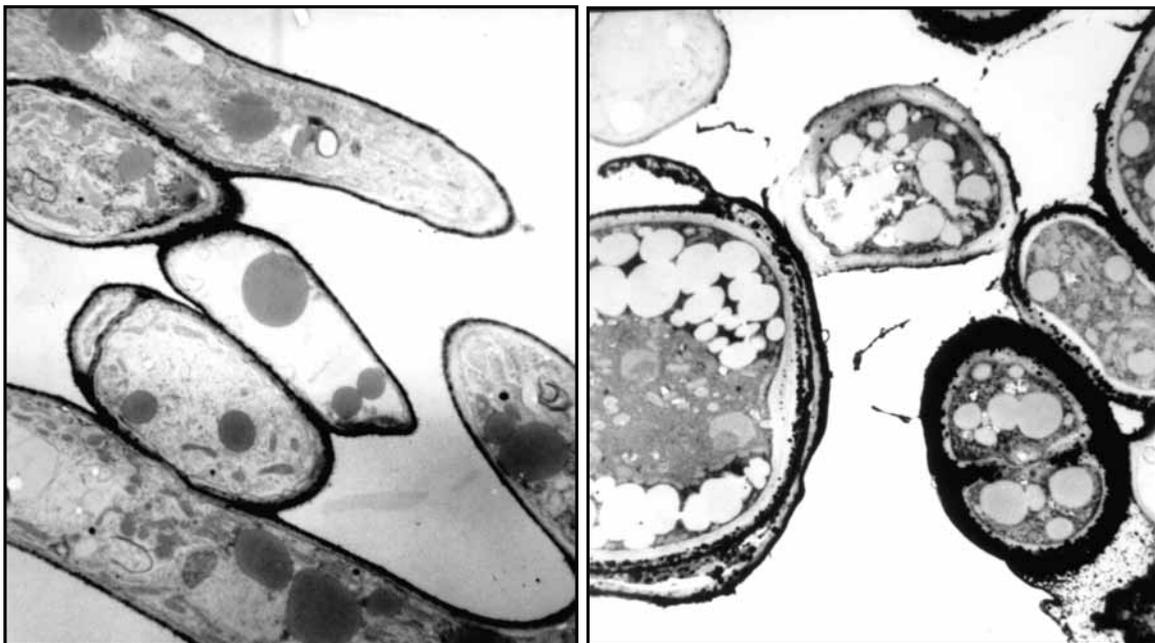


Abb. 46: Ultrastrukturelle Veränderungen der Hyphen von *Alternaria solani* nach Behandlung mit einem Pflanzenextrakt aus *Potentilla erecta* (0,25 %; rechts behandelt, links Leerformulierung; Starke Vakuolisierung des Cytoplasmas, Zellwandverdickungen und -ablösungen; 7000x).

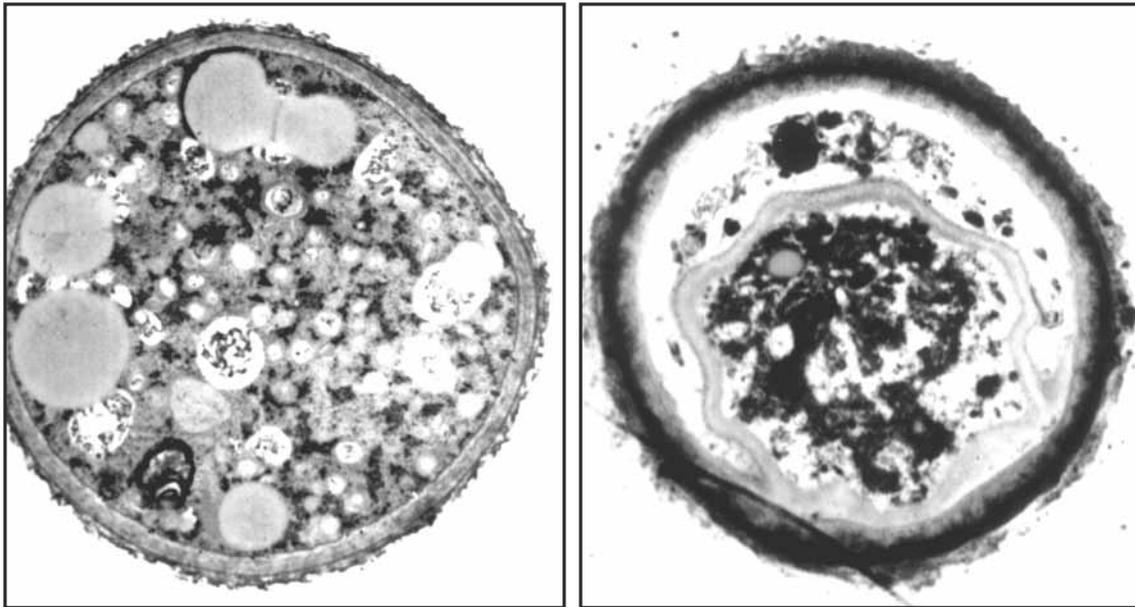


Abb. 47: Ultrastrukturelle Veränderungen der Hyphen von *Alternaria solani* nach Behandlung mit einem Pflanzenextrakt aus *Potentilla erecta* (0,25 %; rechts behandelt, links Leerformulierung; Degeneration des Cytoplasmas, Austreten von Zellbestandteilen; 12000x).

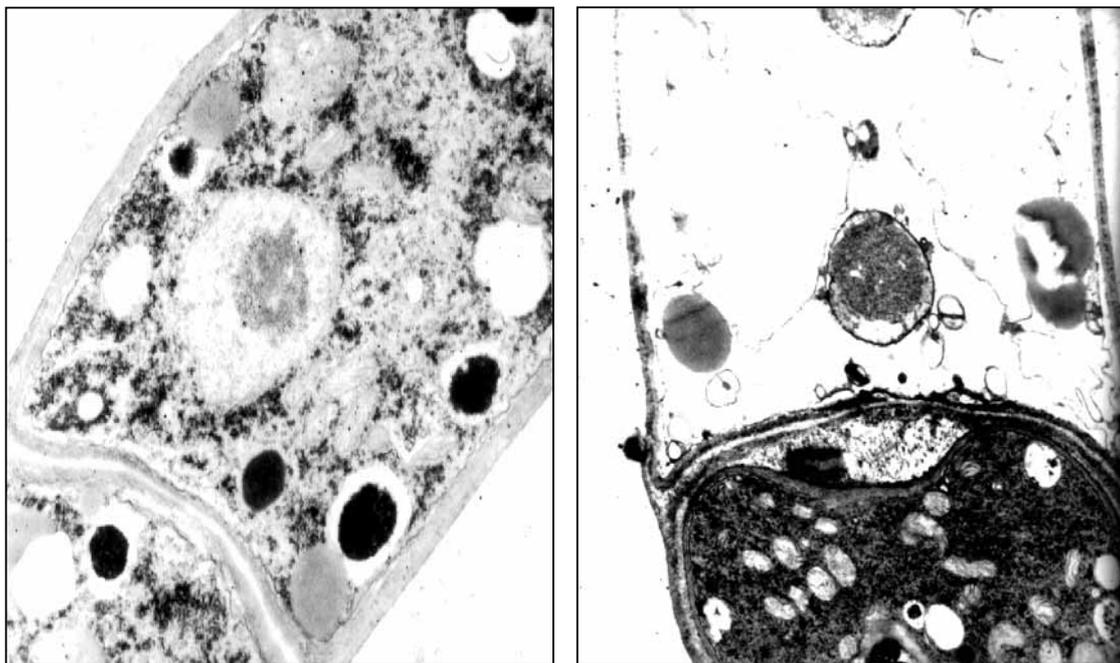


Abb. 48: Ultrastrukturelle Veränderungen der Hyphen von *Botrytis cinerea* nach Behandlung mit einem Pflanzenextrakt aus *Potentilla erecta* (0,175 %; rechts behandelt, links Leerformulierung; Degeneration der Hyphenzelle; Ablösen des Plasmalemmas; 12000x).

Neben diesem deutlichen Einfluß auf das Cytoplasma der Hyphen konnte in niedrigen Konzentrationen ($< 0,2\%$), noch ein weiterer Effekt beobachtet werden. In degenerierten Zellen bildeten sich aus angrenzenden noch intakten Zellen neue Hyphenstrukturen (Abb. 49).

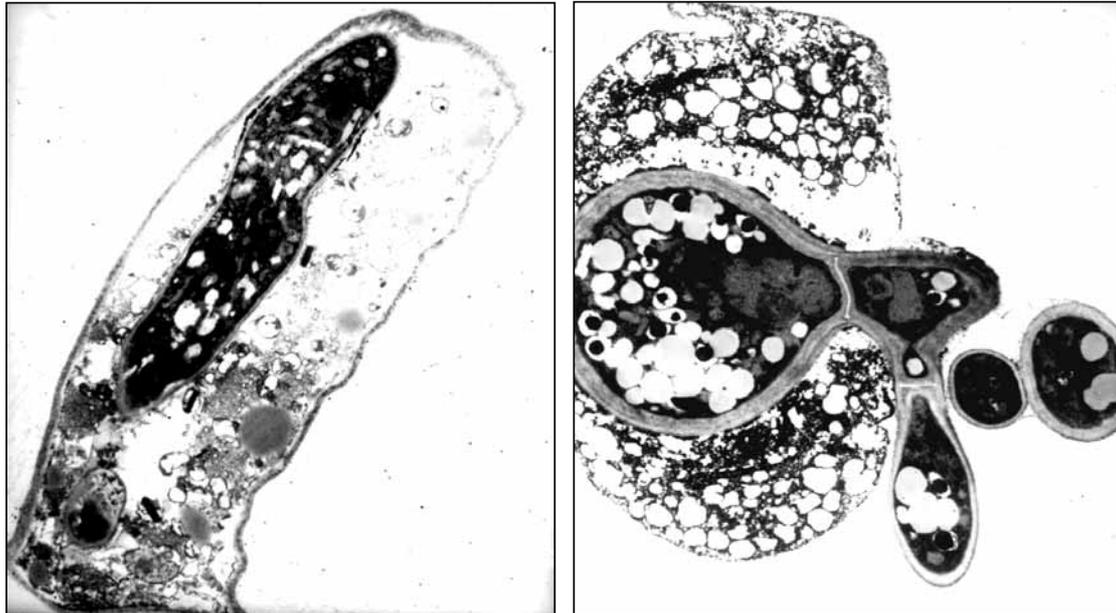


Abb. 49: Ultrastrukturelle Veränderungen der Hyphen von *Botrytis cinerea* nach Behandlung mit einem Pflanzenextrakt aus *Potentilla erecta* (0,175 %; Hyphen Neubildung in degenerierten Zellen; 7000x).

Diese neu gebildeten Hyphen zeigten aber sobald sie in Kontakt mit dem Extrakt kamen eine starke Vakuolisierung des Cytoplasmas und deutliche Degenerationserscheinungen.

3.4 Isolierung und Identifizierung wirksamer Substanzen

3.4.1 Optimierung des Extraktionsverfahrens

Die Extraktionsbedingungen haben einen entscheidenden Einfluß auf die Extraktion von Substanzen und können somit die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten stark beeinflussen. Variiert wurden daher die Parameter Extraktionsverfahren, Extraktionsmittel und Extraktionstemperatur.

3.4.1.1 Einfluß des Extraktionsverfahrens auf die Wirksamkeit

Am Beispiel des Pflanzenmaterials aus *Salvia officinalis*, *Potentilla erecta* und *Cinnamomum camphora* wurde der Einfluß der beiden unter Punkt 2.3.2 beschriebenen Extraktionsverfahren auf die Wirksamkeit der so hergestellten Extrakte untersucht. Geprüft wurde deren Wirksamkeit im Biotest gegen *Phytophthora infestans* an Tomate.

Der Befall der unbehandelten Pflanzen lag im Mittel der Versuche bei 92 %. Abbildung 50 verdeutlicht den Einfluß des Extraktionsverfahrens auf die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten. Bei den Extrakten aus *C. camphora* zeigte sich ein signifikanter Einfluß des Extraktionsverfahrens auf die Wirksamkeit der hergestellten Extrakte. So konnten Extrakte, welche im Wasserbad bei 60 °C hergestellt wurden, den Befall signifikant stärker vermindern als Extrakte, die mit der Soxhlet-Apparatur hergestellt wurden. Bei den Extrakten aus *S. officinalis* und *P. erecta* konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Hier zeigten die Extrakte, die im Wasserbad bei 60 °C hergestellt worden waren, keine Unterschiede zu denen die aus der Soxhlet - Apparatur stammten.

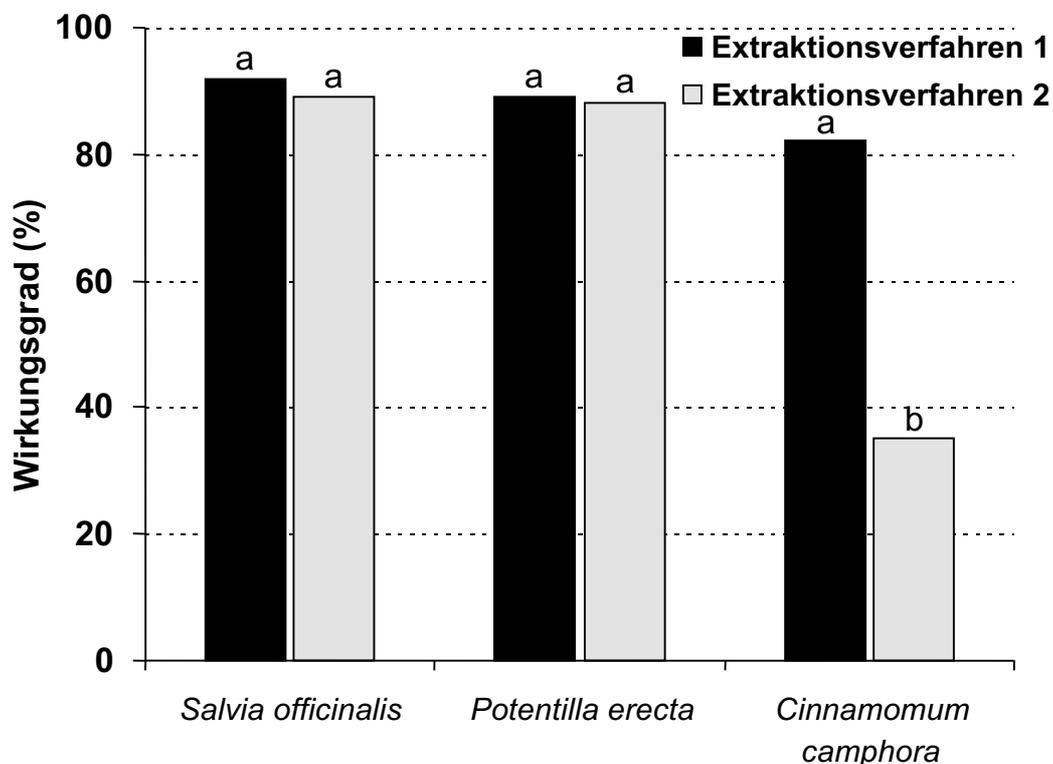


Abb. 50: Einfluß des Extraktionsverfahrens auf die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten (1 % TS) gegenüber *Phytophthora infestans* an Tomate. Extraktionsverfahren (1 = Extraktion im Wasserbad bei 60 °C, Extraktionsverfahren 2 = Soxhlet – Apparatur). Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

3.4.1.2 Einfluß des Extraktionsmittels auf die Wirksamkeit

Die Wahl des Extraktionsmittels hat einen starken Einfluß auf die zu extrahierenden Substanzen. Am Beispiel des Pflanzenmaterials aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta* sollte die-

ser Einfluß im Biotest gegen *Phytophthora infestans* an Tomate untersucht werden. Als Extraktionsmittel dienten Äthanol als polares Lösungsmittel, Hexan als unpolares Lösungsmittel, Essigsäureäthylester, welcher in der Mitte der eluotropen Reihe einzuordnen ist, und Toluol als aromatisches Lösungsmittel.

Mit abnehmender Polarität der untersuchten Lösungsmittel zeigte sich eine signifikant schlechtere Wirksamkeit der Extrakte (Abb. 51). Die signifikant höchste Wirksamkeit, bei allen geprüften Pflanzenmaterialien, konnte durch die Verwendung von Äthanol als Extraktionsmittel erzielt werden.

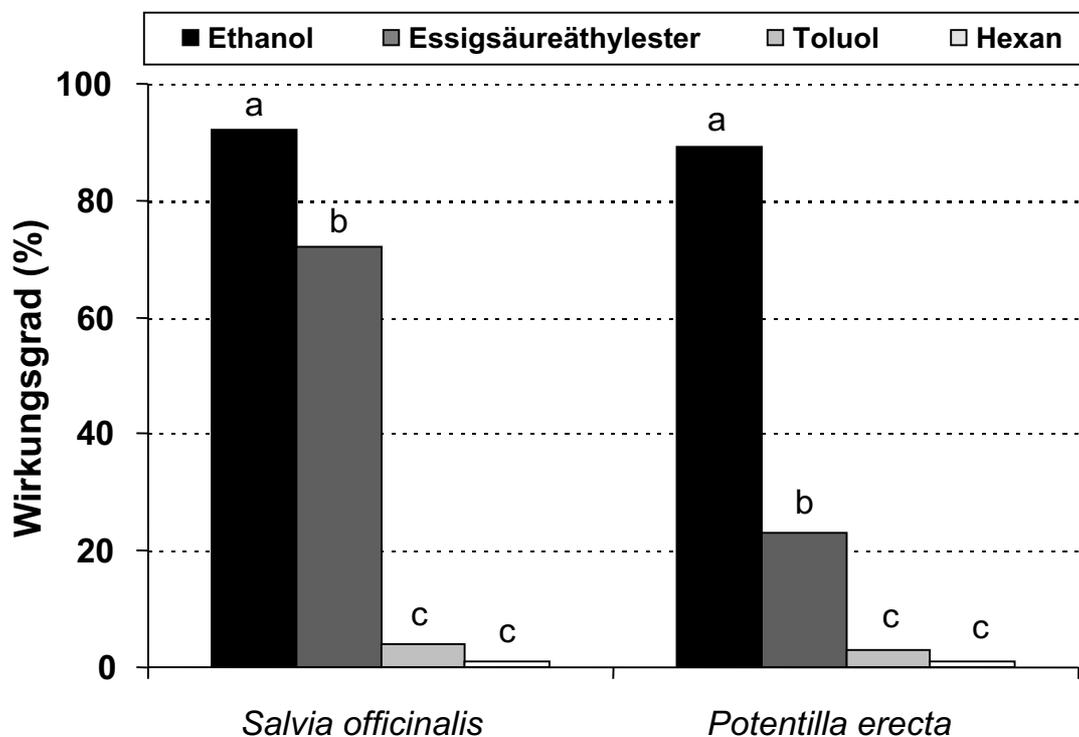


Abb. 51: Einfluß des Extraktionsmittels auf die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten (0,5 % TS) gegenüber *Phytophthora infestans* an Tomate. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

3.4.1.3 Einfluß der Extraktionstemperatur auf die Wirksamkeit

Der Einfluß der Extraktionstemperatur auf die Wirksamkeit der Extrakte wurde im Wirt-Pathogen-Modell *Phytophthora infestans* - Tomate untersucht. Während die Extrakte aus *Potentilla erecta* und *Salvia officinalis* bei allen drei untersuchten Extraktionstemperaturen annähernd ihre Wirkung gegen *P. infestans* beibehielten, zeigte der Extrakt aus *Cinnamomum*

camphora bei einer Extraktionstemperatur von 90°C keine Wirkung mehr (Abb. 52). Als Günstigste Extraktionstemperatur erwies sich eine Extraktion bei 60°C.

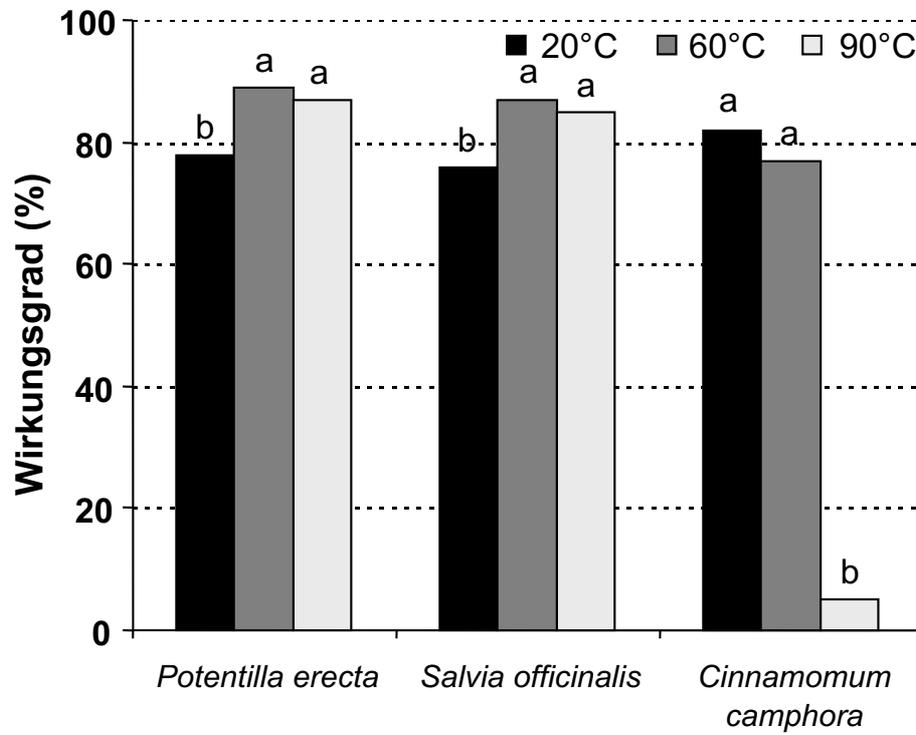


Abb. 52: Einfluß unterschiedlicher Extraktionstemperaturen auf die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten (1 % TS) gegenüber *Phytophthora infestans* an Tomate. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich signifikant nach Tukey $\alpha \leq 0,05$.

3.4.2 Überprüfung bekannter Inhaltsstoffe

Zur Identifizierung der wirksamen Substanzen wurden die in der Literatur beschriebenen Substanzen des Extraktes aus *Salvia officinalis* auf ihr Vorkommen im Extrakt und ihre Wirksamkeit gegenüber *Alternaria solani* überprüft. Untersucht wurden die Inhaltsstoffe, Terpene (α, β -Thujon; 1,8-Cineol; (+)-Campher; Borneol; Bornylacetat und Cavacrol), Flavonoide sowie der Gerbstoff Rosmarinsäure.

Abbildung 53 zeigt die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* sowie bekannter Terpene. Wie deutlich zu sehen ist, konnte keiner der untersuchten Standards in den beiden Extrakten identifiziert werden. Zur Überprüfung der biologischen Wirksamkeit der bekannten Terpene wurde eine (siehe 2.8.1.1) Bioautographie gegenüber *A. solani* durchgeführt. Eine Wirksamkeit gegenüber *A. solani* zeigten nur drei der untersuchten Terpene (Abb. 54). Diese Wirkung ließ sich erst ab Konzentrationen von

20 % a.i. beobachten und äußerte sich in einem deutlichen sichtbaren Hemmhof ca. vier Tage nach der Inokulation der DC - Platte.

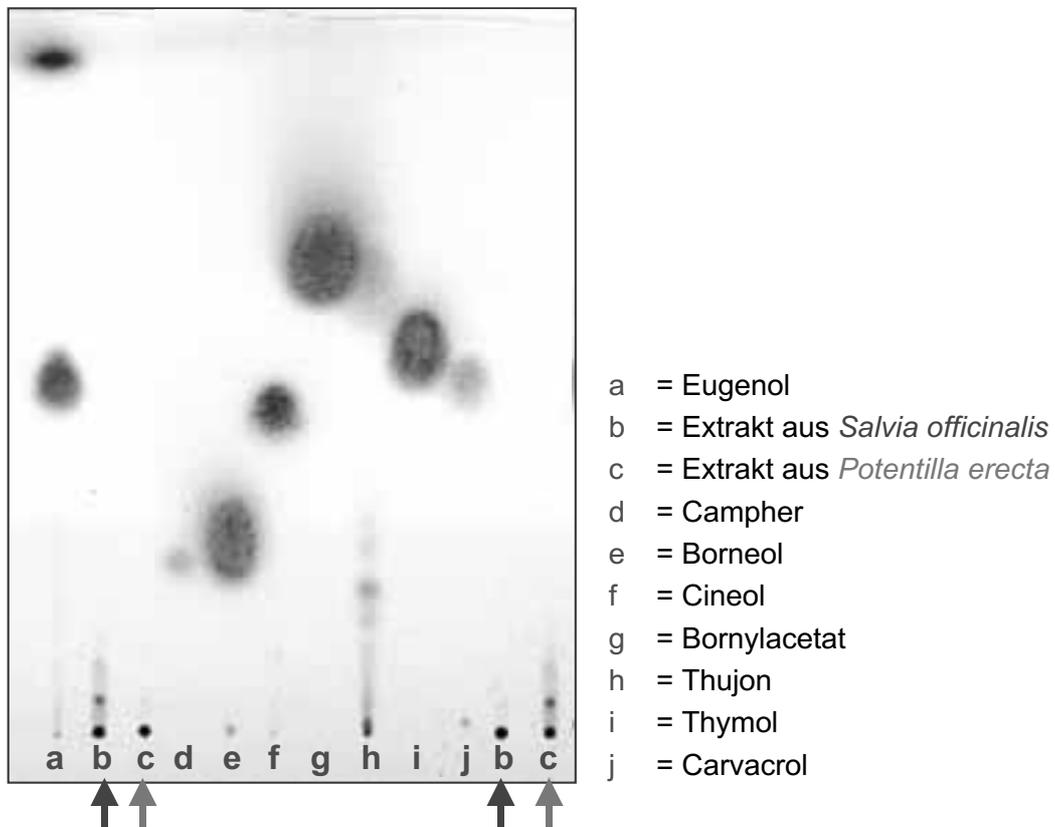


Abb. 53: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta*, sowie bekannter Terpene. (Sprühreagenz: Vanillin - Schwefelsäure; Laufmittelsystem: Toluol / Essigsäure im Verhältnis 93 : 7)

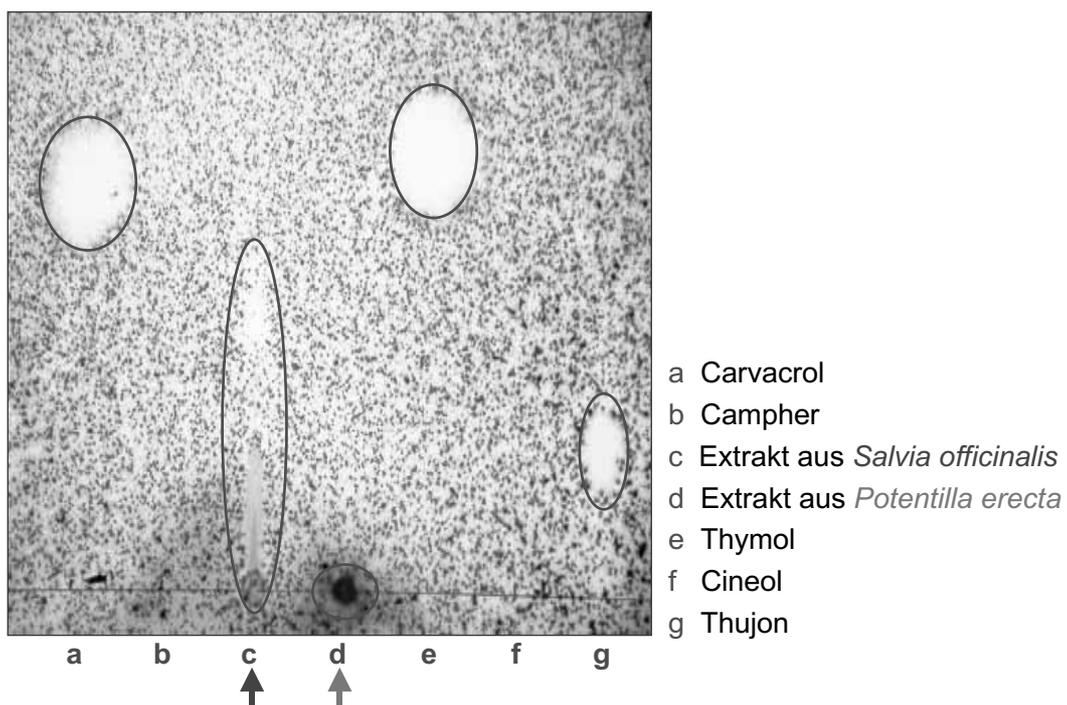


Abb. 54: Bioautographie der Extrakte aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta* sowie bekannten Terpene (20 % a.i.) gegenüber der Sporenkeimung von *Alternaria solani* (Laufmittelsystem: Toluol / Essigsäuremethylester im Verhältnis 93 : 7).

Im Vergleich mit dem Extrakt aus *S. officinalis* zeigte nur Thujon einen R_f -Wert der in einem ähnlichen Bereich wie der Hemmhofs des Extraktes lag. Gegenüber dem Extrakt aus *P. erecta* zeigte keiner der untersuchten Terpene einen ähnlichen R_f -Wert.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zur Bestimmung von Flavonoiden in den beiden Extrakten ließen erkennen, daß nur in dem Extrakt aus *S. officinalis* Flavonoide identifiziert werden konnten (Abb. 55). Von den untersuchten Standards zeigte nur das Flavonoid Scopoletin einen R_f -Wert der identisch mit dem einer Bande des Extraktes war.

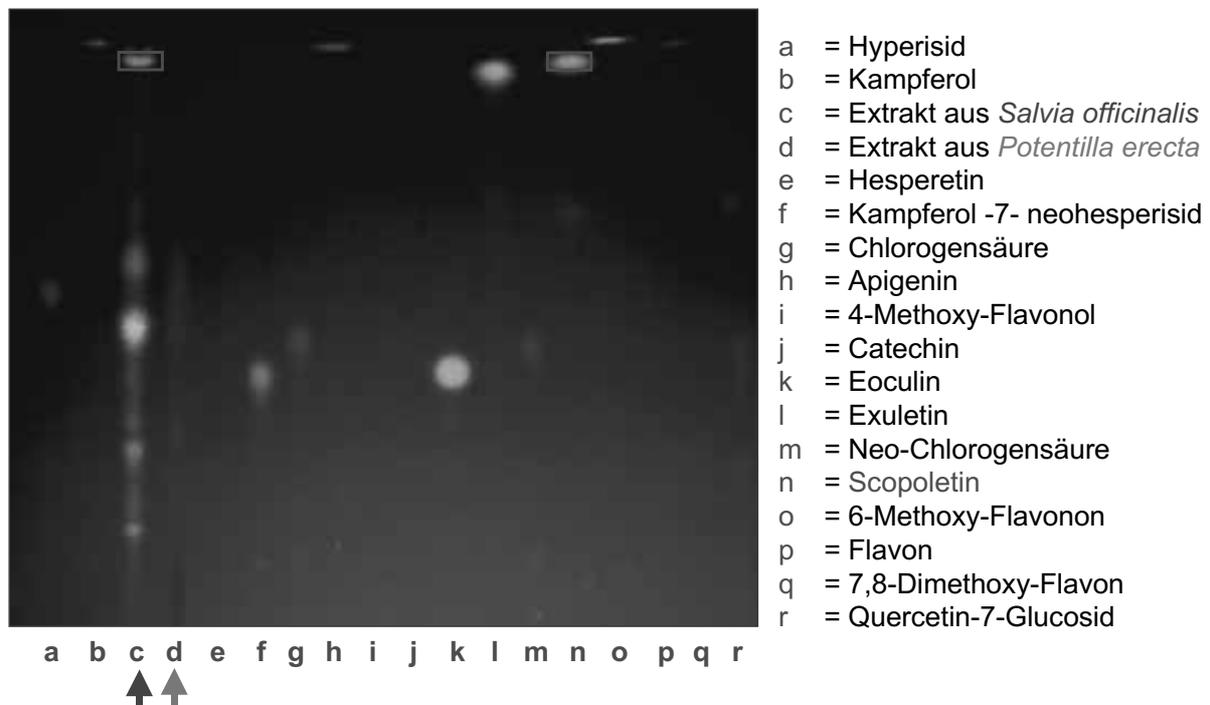


Abb. 55: Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta*, sowie bekannter Terpene (0,05 % TS; Färbung: Naturstoffreagenz nach WAGNER, H., *et al.* 1997; Detektion unter UV-Licht bei 365nm Wellenlänge).

Untersuchungen zur Überprüfung der biologischen Wirksamkeit von Flavonoiden erfolgten mit der unter 2.8.1.1 beschriebenen Bioautographie.

Es zeigte sich, daß nur vier der untersuchten Flavonoide eine Wirkung gegenüber der Sporenkeimung bzw. dem Myzelwachstum von *A. solani* aufwiesen (Abb. 56). Diese Wirkung konnte erst ab einer Konzentration von 1000 ppm a.i. erzielt werden. Drei der untersuchten Flavonoide besaßen bei diesem Laufmittel einen R_f -Wert, der ähnlich zu dem des Extraktes aus *S. officinalis* war. Untersuchungen zur Wirksamkeit des Extraktes aus *P. erecta* ergaben

auch bei diesem Laufmittel keinen R_f – Wert, der identisch mit dem der wirksamen Flavonoide war.

Weitere Untersuchungen zur Bestimmung der möglichen Wirksamkeit von Rosmarinsäure ergaben, daß dieser Inhaltsstoff nicht in dem untersuchten Extrakt nachgewiesen werden konnte. Eine biologische Wirksamkeit dieses Inhaltsstoffes gegenüber der Sporenkeimung von *A. solani* ergab sich erst bei Konzentrationen von 2000 ppm und zeigte nicht den selben R_f - Wert wie die Wirksamen Komponenten des Extraktes aus *S. officinalis* und *P. erecta*.

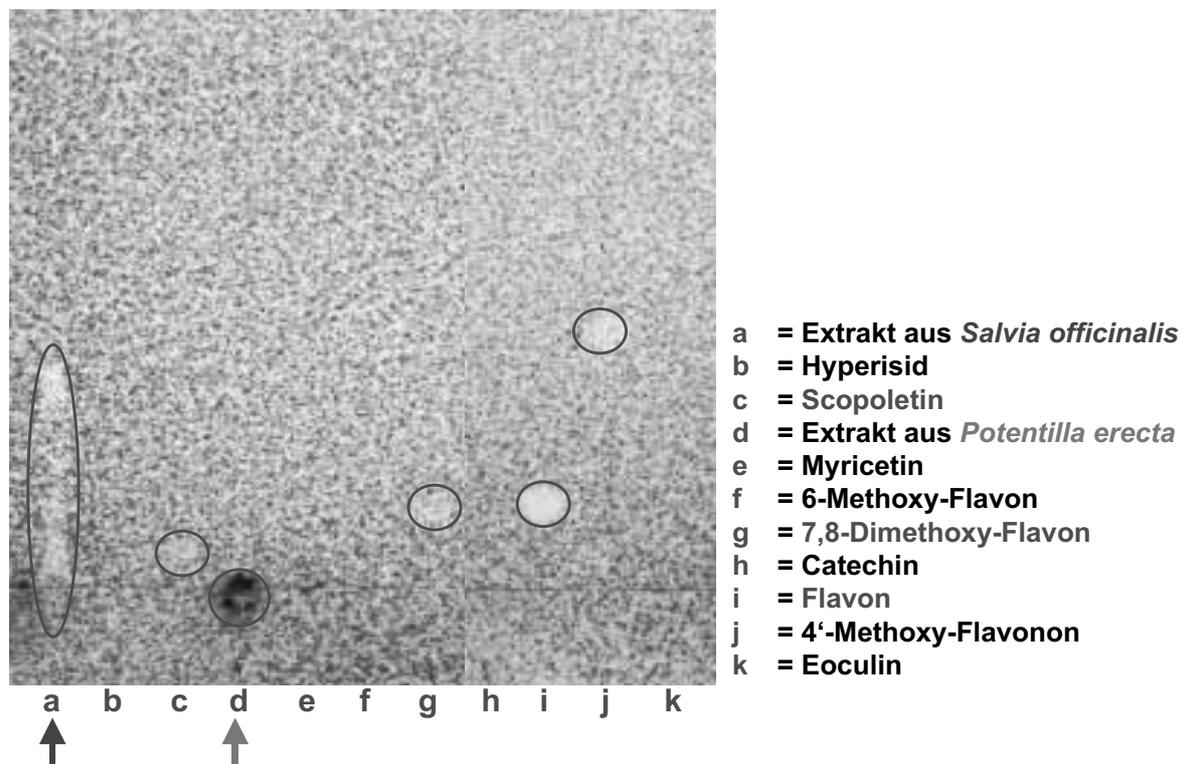


Abb. 56: Bioautographie der Extrakte aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta*, sowie bekannten Flavonoide (1000 ppm) gegenüber der Sporenkeimung von *Alternaria solani* (Laufmittel: Chloroform 100 %).

3.4.3 Nachweis von Wirksame Fraktionen aus pflanzlichen Rohextrakten mittels Dünnschichtchromatographie und Biotest

Die Wahl des Extraktionsmittel hat einen entscheidenden Einfluß auf den Transport bzw. die Auftrennung von Substanzgruppen. Daher erfolgte die Auffindung von aktiven Fraktionen in den Rohextrakten mittels Bioautographie (2.8.1.1) unter Verwendung unterschiedlicher Laufmittelsysteme.

In Tabelle 25 sind die R_f - Werte der mit Hilfe des Biotests lokalisierten wirksamen Fraktion in unterschiedlichen Laufmittelsystemen aufgeführt. Wie an Hand der R_f – Werte der detektierten wirksamen Fraktionen des Extraktes aus *S. officinalis* zu sehen ist, besteht eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Höhe des R_f – Werts und der Polarität des Laufmittelsystems. Je polarer das Laufmittelsystem, desto höher wurden die wirksamen Substanzen des Extraktes verlagert. Als besonders geeignet zur Trennung der wirksamen Fraktionen dieses Extraktes erwies sich das Laufmittelsystem Essigsäureäthylester / Methanol im Verhältnis 95 : 5. Hiermit konnten in Biotest zwei wirksame Fraktionen ermittelt werden. Die stärkste Wirksamkeit der beiden Fraktionen ließ sich bei der Fraktion mit dem höchsten R_f – Wert beobachten (Abb. 57). Diese deutliche Korrelation zwischen der Höhe des R_f – Werts und der Polarität des Laufmittelsystems, wie sie sich bei den wirksamen Substanzen des Extraktes aus *S. officinalis* darstellte, konnte bei dem Extrakt aus *P. erecta* nicht beobachtet werden.

Tab. 25: R_f - Werte der wirksamen Fraktionen aus den Pflanzenextrakten von *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta* bei verschiedenen Laufmitte / systemen. (Ermittelt im Biotest gegenüber dem Myzelwachstum von *Alternaria solani*).

Laufmittel	R _f - Wert der wirksamen Fraktion/en	
	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Potentilla erecta</i>
Methanol	0,82 - 0,88	0,76 - 0,82
Äthanol	0,76 - 0,82	0,71 - 0,82
Isopropanol	0,59 - 0,77	0,12 - 0,18
Essigsäureäthylester	0,53 - 0,65	0
Essigsäureäthylester/Methanol (1:4)	0,76 - 0,88	0,82
Essigsäureäthylester/Methanol (1:1)	0,88 - 0,94	0,76 - 0,82
Essigsäureäthylester/Methanol (4:1)	0,76 - 0,88	0,70
Essigsäureäthylester/Methanol (95:5)	0,74 - 0,58; 0,4	0
Essigsäureäthylester/Toluol (50:50)	0,43 - 0,25	0
Essigsäureäthylester/Toluol (7:93)	0,09 - 0,018	0
Chloroform	0,17 - 0,018	0,53 - 0,59
Benzol	0	0
<i>n</i> -Hexan	0	0

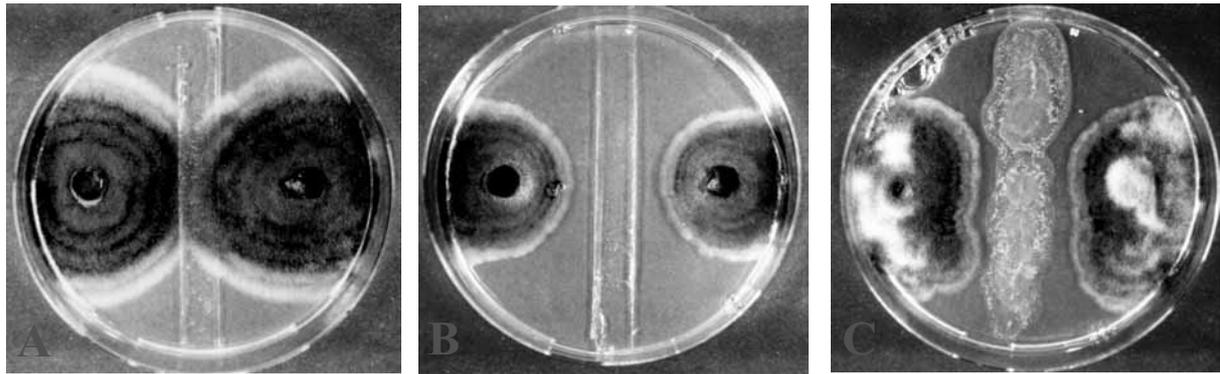


Abb. 57: Einfluß von dünnenschichtchromatographisch getrennten Fraktionen des Extraktes aus *Salvia officinalis* auf das Myzelwachstum von *Alternaria solani* (A = unwirksame Fraktion; B = wirksame Fraktion; C = Rohextrakt).

In keinem der untersuchten Laufmittelsysteme konnte eine Auftrennung der wirksamen Substanzen in mehr als einen Bereich festgestellt werden. Die R_f – Werte der so detektierten Banden wiesen alle einen relativ engen Bereich auf.

Keine der so lokalisierten wirksamen Fraktionen beider Extrakte zeigten eine Fluoreszenzlöschung oder Eigenfluoreszenz der Substanzen bei 254 nm bzw. 366 nm Wellenlänge. Auch mit Hilfe der unter Punkt 2.8.1.2 aufgeführten Sprühreagenzien konnte bei keinem der Extrakte eine Bande detektiert werden, welche in der Nähe der im Biotest identifizierten Fraktionen lag.

Zur Verifizierung der Auftrennung der wirksamen Substanzen des Extraktes aus *S. officinalis* in zwei Fraktionen, wurde eine wie unter Punkt 2.8.1.1 beschriebene Bioautographie des Extraktes durchgeführt (Abb. 58). Mit Hilfe dieser Methode konnte eine feinere Detektion der Fraktionen erfolgen, da hier die DC - Platte nicht in Bereiche zerschnitten wurde.

Es ließen sich drei wirksame Banden mit den R_f – Werten 0,7; 0,56 und 0,43 auf der DC - Platte identifizieren (Abb. 58). Die Wirksamkeit dieser detektierten Bereiche, gemessen an dem Durchmesser der Hemmbanden, nahmen von oben nach unten ab.

Für weitere Untersuchungen wurden die drei aktiven Banden aus weiteren DC - Platten heraus gelöst und die wirksamen Substanzen der einzelnen Fraktionen über eine Säule in 1ml Äthanol eluiert.

Überprüfungen der Fraktionen im Biotest gegenüber der Zoosporenkeimung von *P. infestans* bestätigten die Wirkung aller drei gewonnenen Proben. Dennoch ließ sich auch gegenüber diesem Erreger eine Abstufung in der Wirksamkeit der isolierten Fraktion erkennen. Während die Probe eins und zwei (siehe Abb. 58) eine 100%-ige Wirkung zeigten, ließ sich

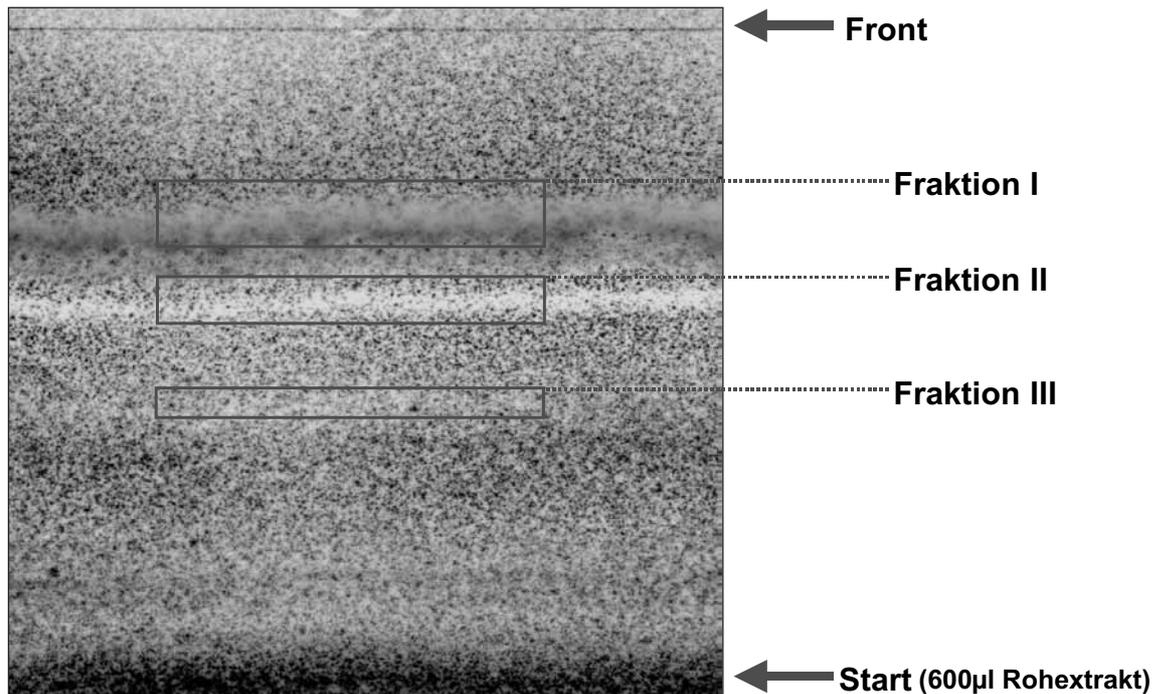


Abb. 58: Bioautographie des Extraktes aus *Salvia officinalis* gegenüber der Sporenceimung von *Alternaria solani* (Laufmittelsystem: Essigsäureäthylester / Methanol 95 : 5; Markierte Bereiche kennzeichnen eine Hemmung des Erregers).

bei der Probe drei nur eine Wirkung von 85% beobachten. Die so hergestellten Proben dienten als Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen zur Identifizierung der Wirksubstanzen.

3.4.4 Nachweis von Pflanzeninhaltsstoffen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur weiteren Auftrennung der in der Dünnschichtchromatographie gewonnenen Fraktionen aus den Extrakt von *Salvia officinalis* wurden Untersuchungen mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie durchgeführt.

Als Gradientenprogramm diente ein linearer Gradient bei dem ein stufenweiser Anstieg von 5 % Acetonitril bis zu 100 % (siehe 2.8.2) erfolgte. Der Vergleich der Chromatogramme der drei Fraktionen ließ erkennen, daß mit der durchgeführten Auftrennungsmethode unterschiedliche Substanzen isoliert werden konnten. So zeigte sich in den einzelnen Chromatogrammen ein unterschiedliches Peak – Spektrum (Abb. 59). Die meisten Substanzen wurden im mittleren Bereich (10 - 18 min.) des Chromatogramms von der Säule gelöst, bei einem eluerten Mischungsverhältnis von 80 % Acetonitril.

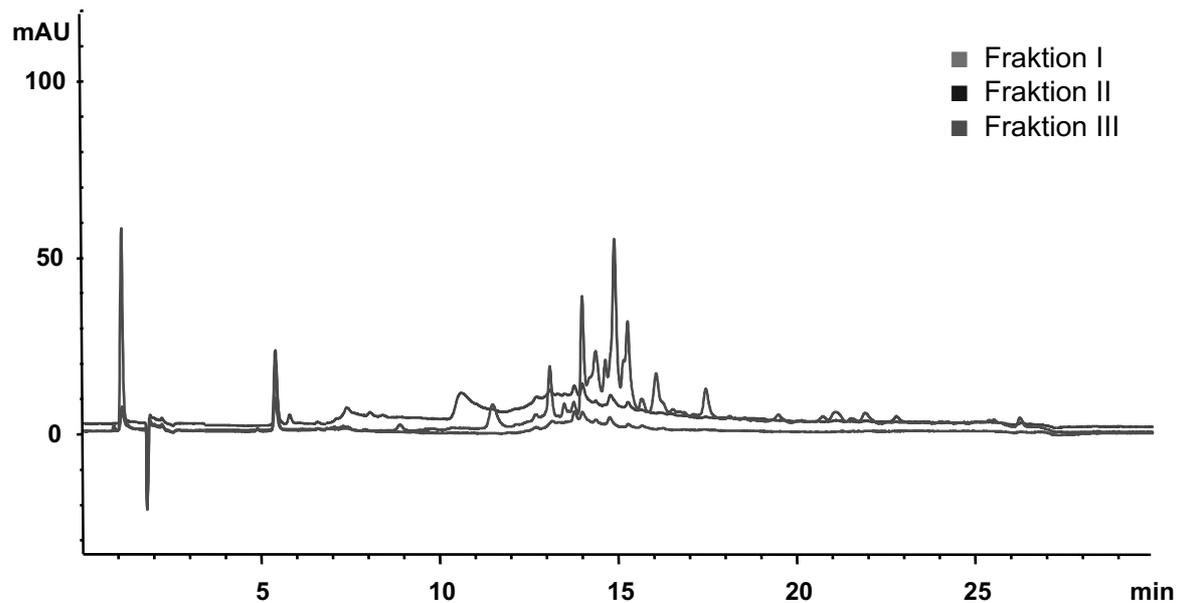


Abb. 59: HPLC-Trennung der drei mittels Dünnschichtchromatographie isolierten Fraktionen aus dem Extrakte von *Salvia officinalis* (Detektion bei 270 nm Wellenlänge).

Ein Vergleich der UV-Spektren der detektierten Peaks in den Chromatogrammen erbrachte, daß diese nicht identisch mit denen der bekannten Inhaltsstoffe waren.

3.4.5 Nachweiß von Pflanzeninhaltsstoffen mittels Gaschromatographie und Massenspektroskopie (GC - MS)

Zur Identifizierung der wirksamen Substanzen in den isolierten DC - Fraktionen erfolgten gaschromatographische Untersuchungen mit anschließender Massenspektroskopie. Hierzu erfolgte eine Derivatisierung der Proben durch die Zugabe von BSTFA (siehe 2,8.3). Anschließend wurden je 2µl jeder Probe gaschromatographisch bestimmt.

Auch in dieser Untersuchungsmethode bestätigten die Chromatogramme der drei Fraktionen, aufgrund ihrer unterschiedlichen Substanzspektren, daß es sich um unterschiedliche Substanzen in den Fraktionen handeln muß (Abb. 60 – 62). In der ersten Fraktion (I) konnten die meisten Substanzen detektiert werden (Abb. 60). Chromatogramme der beiden anderen Fraktionen zeigten, daß in diesen Proben bedeutend weniger Substanzen vorhanden waren. So ließen sich in der Probe zwei (II) erst nach 16,3 Minuten Peaks detektieren (Abb. 61). Chromatogramme der dritten Fraktion (III) zeigten, daß in dieser Probe nur ein Hauptpeak nachzuweisen war (Abb. 62).

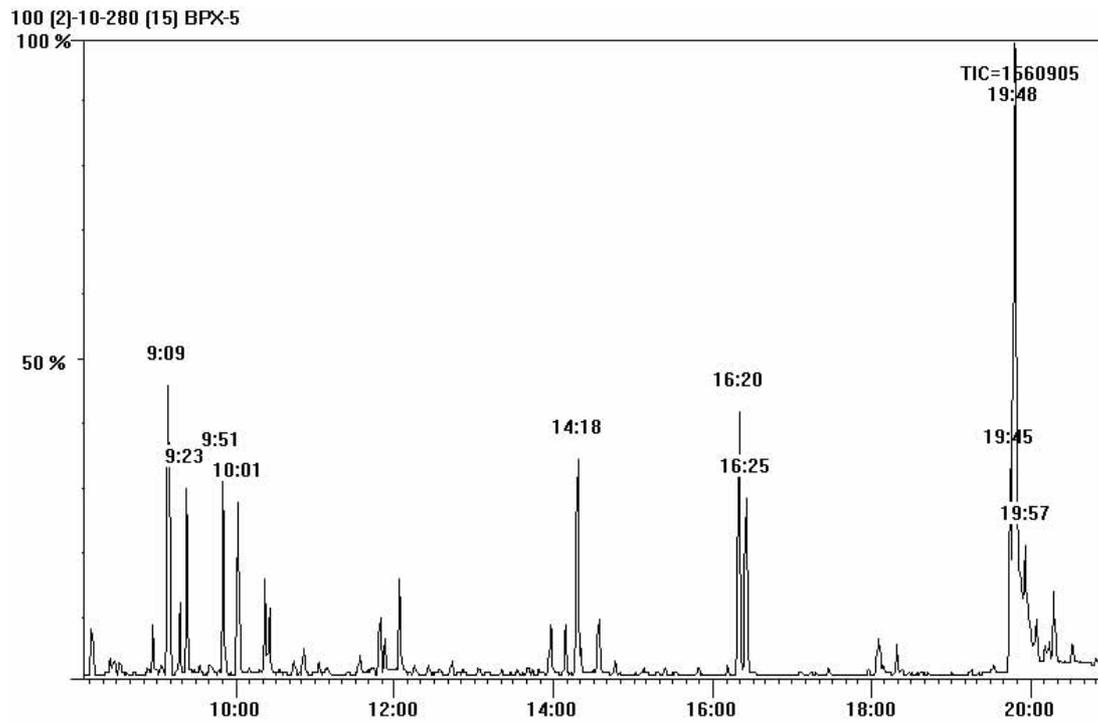


Abb. 50: Gaschromatographische - Trennung der isolierten DC - Fraktionen I aus dem Ex-
trakt von *Salvia officinalis*.

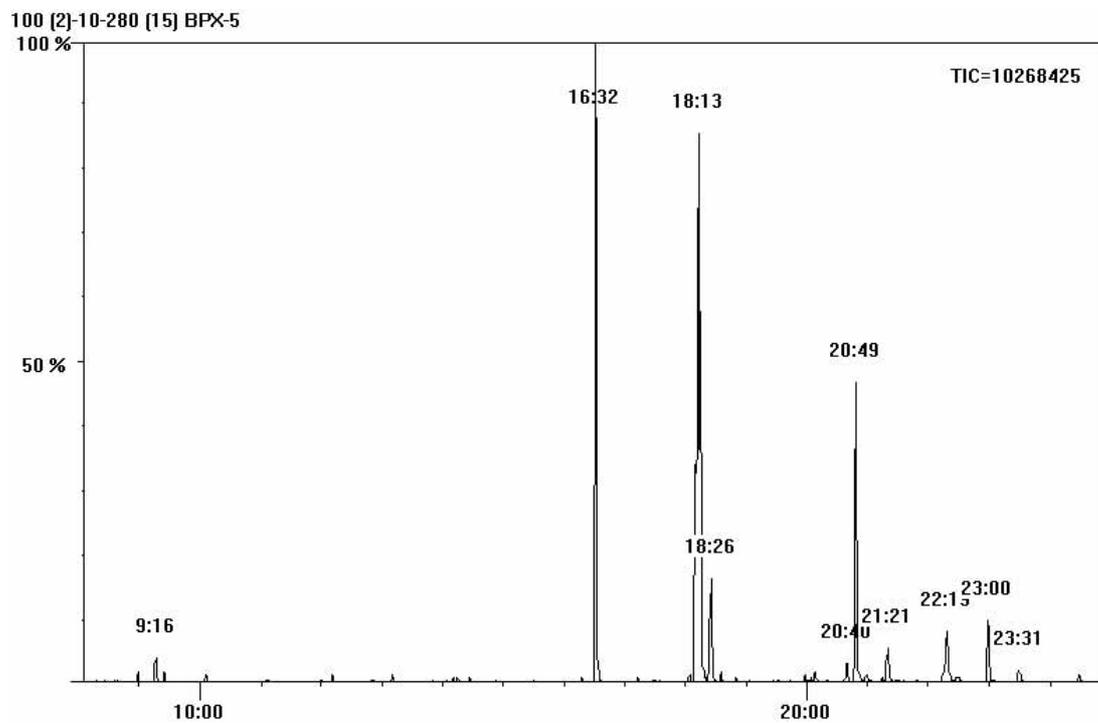


Abb. 61: Gaschromatographische - Trennung der isolierten DC - Fraktionen II aus dem Ex-
trakt von *Salvia officinalis*.

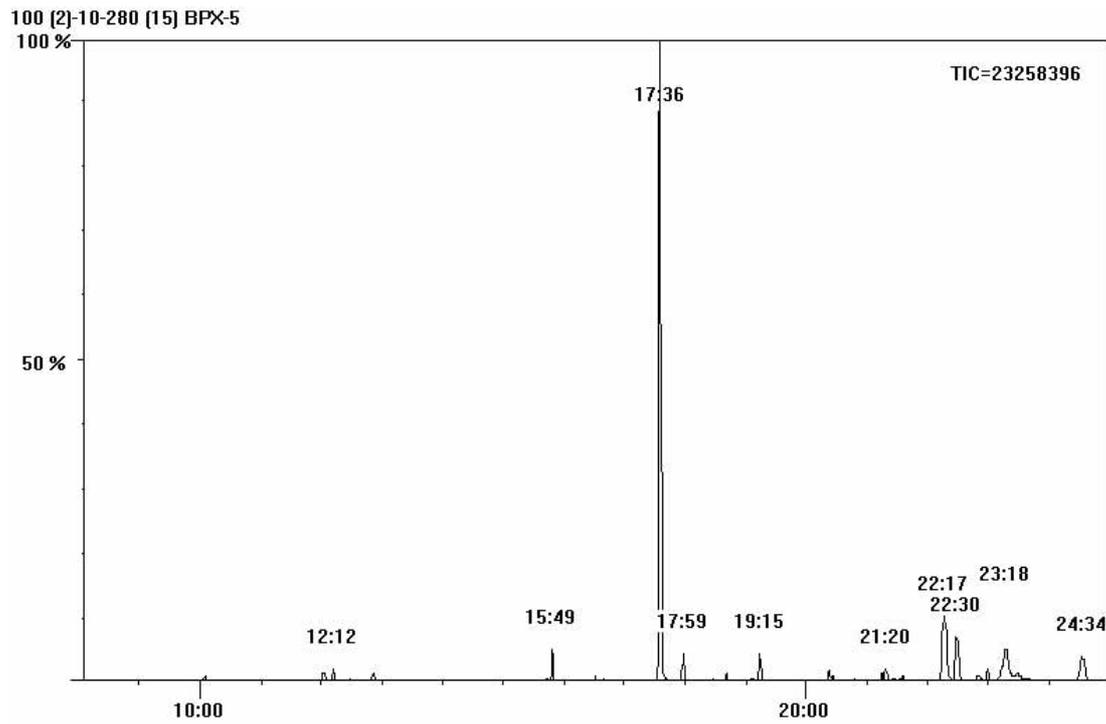


Abb. 62: Gaschromatographische - Trennung der isolierten DC - Fraktionen III aus dem Extrakt von *Salvia officinalis*.

4 Diskussion

Pflanzen stellen aufgrund ihres Sekundärstoffwechsels einen vielversprechenden Pool an interessanten Inhaltsstoffen dar, dennoch sind diese Substanzen eine weitgehend ungenutzte Quelle für die Auffindung wirksamer Moleküle, die zum Schutz von Pflanzen gegenüber phytopathogenen Pilzen genutzt werden können (FUGMANN *et al.* 1991; PLIMMER, 1993).

Obwohl die Untersuchung von pflanzlichen Inhaltsstoffen schon eine lange Tradition hat, existieren bisher nur sehr wenige Substanzen die sich auf ‚Naturstoffe‘ aus Pflanzen zurückführen lassen und in der Praxis verwendet werden. Die meisten dieser in den letzten Jahren erfolgreich eingesetzten Substanzen besitzen zudem eine ausschließlich insektizide Wirkungen. Hier sind es vor allem die Inhaltsstoffe Pyrethrum aus den Blüten von Chrysanthemen (*Chrysanthemum cinerariifolium*) und das Azadirachtin aus dem Neembaum (*Azadirachta indica*), die als Naturstoff im organischen Landbau eingesetzt werden. Die chemische Synthese dieser natürlichen Substanzen zur Entwicklung von neuartigen Pflanzenschutzmitteln gelang nur am Beispiel des Pyrethrum und führte zu der erfolgreichen Wirkstoffklasse der ‚Pyrethroide‘. Sie besitzen noch heute einen großen Marktanteil, der 1987 auf einen Anteil von 25 Prozent des Insektizidmarkts geschätzt wurde (HIRANO, 1989). Der pflanzliche Inhaltsstoff Azadirachtin eignete sich hingegen aufgrund seiner komplizierten Molekülstruktur nicht zur chemischen Synthese. Bei den Naturstoffen mit fungizider Wirkung stammen die bisher kommerziell produzierten Substanzen alle aus Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen. Zu den Naturprodukten, die in den letzten Jahren als Leitstruktur für neue Fungizide dienen, gehören Pyrrolnitrin, Methylacrylate, Strobilurin A und Oudemansin, Hadacidin, Thiolutin und Pisiferinsäure (BUCHENAUER, 1996).

Daß Pflanzenextrakte dennoch eine erfolgversprechende Quelle für fungizide Wirkstoffe darstellen, wird in Berichten deutlich, in denen mit geringem Aufwand aus wenigen Pflanzenarten eine vergleichsweise große Anzahl an wirksamen Extrakten gewonnen werden konnte. KLINGAUF & HERGER (1985) beschrieben eine fungizide Wirkung von über der Hälfte von mehr als hundert geprüften Pflanzenextrakten gegen den Echten Mehltau an Gerste. Auch in den eigenen Ergebnissen zeigte die hohe Zahl identifizierter wirksamer Extrakte das große Potential von Pflanzeninhaltsstoffen, die zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten verwendet werden können.

Da die Extraktionsbedingungen einen entscheidenden Einfluß auf die Isolierung von Substanzgruppen darstellten und somit die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten stark beeinflussen, wurden in den eigenen Experimenten die Parameter Extraktionsverfahren, Extraktionsmittel sowie die Extraktionstemperatur näher untersucht. Dies ist vor allem im Hinblick auf eine spätere Isolierung der aktiven Substanzen aus Pflanzenextrakten entscheidend, da die Menge der wirksamen Substanzen möglichst hoch sein sollte.

Die in der Literatur häufig als geeignete Methode zur Herstellung von Pflanzenextrakten beschriebene Soxhlet - Extraktionsmethode (HERGER, 1991; KOWALEWSKI, 1992; LATTEN, 1994) zeigte in eigenen Versuchen deutliche Nachteile. So konnte in Untersuchungen zur Wirksamkeit eines Extrakts aus *Cinnamomum camphora* gegenüber *P. infestans* an Tomaten nachgewiesen werden, daß Extraktionsprodukte aus der Soxhlet - Apparatur eine deutlich schwächere Wirksamkeit aufwiesen als Substanzen, die im Wasserbad bei 60 °C extrahiert wurden. Auch JAGLAN *et al.* (1997) berichten, daß bei einem Vergleich von Extrakten aus unterschiedlichen Pflanzenteilen von *Azadirachta indica*, die Soxhlet - Extraktionsmethode im Gegensatz zu anderen Methoden schlechter wirksame Extrakte lieferte. Dieser drastische Verlust der Wirksamkeit läßt sich durch die wesentlich höheren Extraktionstemperaturen in der Soxhlet - Apparatur erklären. Weitere Untersuchungen zum Einfluß der Extraktionstemperatur auf die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten bestätigten diese Annahme. Extrakte, welche mit einer Temperatur von 90 °C extrahiert wurden, verloren ihre befallsreduzierende Wirkung gegenüber *P. infestans* an Tomate. Für diesen Verlust der Wirksamkeit könnte eine Temperaturlabilität der aktiven Substanzen dieses Extraktes verantwortlich sein. Ähnliche Effekte wurden auch von HERGER (1991) und CHUNG *et al.* (1995) beschrieben. Hier wiesen Extrakte aus Alfalfa (Luzerne), die bei einer Temperatur von 24 °C extrahiert wurden, eine höhere Wirksamkeit auf, als Substanzen nach einer Extraktion bei über 80 °C. In eigenen Versuchen zeigten Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* hingegen keine Beeinträchtigung ihrer Wirksamkeit durch die Erhöhung der Extraktionstemperatur. Es ist daher anzunehmen, daß es sich bei den wirksamen Substanzen aus diesen Extrakten um sehr temperaturstabile Moleküle handelt. Weiterhin ist auf Grund der verwendeten Temperatur und des Lösungsmittels davon auszugehen, daß es sich nicht um Proteine handeln kann, die für die Wirksamkeit verantwortlich sind.

Die Extraktion des Pflanzenmaterials in unterschiedlichen Lösungsmitteln machte deutlich, daß die beste Wirksamkeit der Extrakte unter Verwendung von sehr polaren Lösungsmitteln

zu erzielen war. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von LATTEN (1994), MATTINA *et al.* (1997) und PINTO *et al.* (1998) gemacht. Extraktionen mit einem Lösungsmittel, welches stärker unpolare Eigenschaften aufwies, erbrachten deutlich niedrigere Befallsreduktionen. Die höchste Wirkung ließ sich unter Verwendung von 70 %-igem Äthanol beobachten. Nach KURT (1997) sind bei der Extraktion von pharmazeutischen Pflanzen bei der Verwendung von Äthanol - Wasser Gemischen als Lösungsmittel die höchsten Ausbeuten an Inhaltsstoffen zu erwarten. Dies können alkalische Substanzen, Glykoside, Terpene und Tannine sein (FRIEDLAND, 1997).

Die Suche nach neuen Wirkstoffen wirft unweigerlich das Problem auf, eine große Zahl von Substanzen bzw. Naturstoffen auf ihre Wirksamkeit gegenüber den unterschiedlichsten Pathogenen zu prüfen. Dies ist entweder in einem *in vitro* oder in einem *in vivo* Screening möglich. Die Vorteile von *in vitro* Untersuchungen liegen darin, daß sie kostengünstiger sind und vor allem auch schneller zu Ergebnissen führen. Weiterhin bieten sie die Möglichkeit, auch eine große Anzahl von Substanzen schnell auf ihre Wirksamkeit zu untersuchen (ANKE & STEGLICH, 1988).

In den dargestellten *in vitro* Untersuchungen zur Auffindung wirksamer Pflanzenextrakte zeigte sich ein Problem mancher Prüfmethode. So ließen sich mit der Filterpapier - Methode keine Aussagen über die Wirksamkeit der untersuchten Extrakte treffen. Ähnliche Erfahrungen wurden von LATTEN (1994) und HOSTETTMANN (1991) gemacht. Andererseits konnte aber, wie in eigenen Ergebnissen dargestellt, eine deutliche Hemmung des Myzelwachstums durch eine Reihe von Pflanzenextrakten gegenüber den untersuchten peritrophen Pathogenen festgestellt werden, wenn die Wirkstoffe dem Nährmedium im Agardiffusionstest zugesetzt wurden. HOSTETTMANN (1991) berichtete, daß der Agardiffusionstest besser zur Auffindung von wirksamen Pflanzenextrakten geeignet ist als die Untersuchung auf Filterpapierblättchen. Mit dieser Prüfmethode können polare Substanzen, wie sie in der Natur häufig vorkommen, schneller zu ihrem Wirkort gelangen, da sie gelöst im Medium vorliegen. Andererseits könnten aber auch die Tatsachen, daß entweder die Substanzen an das Material sorbiert bzw. gebunden werden und dadurch nicht in Lösung gehen, oder aber die Pilze durch die Bildung von Luftmyzel die Filterpapierblättchen überwachsen, ein Grund für die unzureichende Eignung dieser Methode sein.

Neben der fungiziden Wirkung von Pflanzenextrakten zeigten sich auch wachstumsfördernde Effekte. Die in eigenen *in vitro* Untersuchungen häufig beobachteten wachstumsfördernden

Eigenschaften von Pflanzenextrakten gegenüber den Erregern *R. solani* und *C. sativus* wurden auch von anderen Autoren beschrieben (KARAPINNAR, 1985; YEGEN *et al.* 1992). MOLEYAR & NARASIMHAM (1986) und VOKOU & MARGARIS (1988) begründen diesen Effekt damit, daß Inhaltsstoffe bzw. Öle von Pflanzen durch Bodenmikroorganismen als Substrat genutzt werden und sie daher eine Förderung des Wachstums in ihren Untersuchungen gegenüber *A. flavus* und *R. solani* feststellten. Ähnliches könnte auch in den eigenen Untersuchungen der Grund für die wachstumsfördernden Eigenschaften der Extrakte gegenüber *C. sativus* sein.

Als weiterer Nachteil von *in vitro* Untersuchungen erwies sich, daß die gewonnenen Ergebnisse im Biotest oft nicht bestätigt werden konnten. Das Screening an Pflanzen lieferte wesentlich fundiertere Ergebnisse. *In vitro* zeigten über zwei Drittel der geprüften Pflanzenextrakte eine gute Wirksamkeit gegenüber dem Myzelwachstum der Erreger, während *in vivo* weniger als ein Viertel der Substanzen eine Befallsreduktion bewirkten. Ähnliches fanden auch RATHMELL & SMITH (1980), MOSCH & KLINGAUF (1989) sowie MOSCH & ZELLER (1989) bei einem Screening von 131 Pflanzenextrakten. Hier zeigten *in vitro* ca. ein Viertel der untersuchten Extrakte eine bakterizide Wirkung gegenüber dem Erreger des Feuerbrandes *Erwinia amylovora*, während nur drei dieser wirksamen Extrakte auch eine Reduktion des Erregers unter Freilandbedingungen bewirkten. In eigenen Untersuchungen zeigte der Vergleich der in den beiden Prüfmethode gewonnenen Ergebnisse, daß in den meisten Fällen keine Übereinstimmung der als wirksam identifizierten Extrakte vorlag. Auch nach GLOGER (1995) ermöglicht das *in vitro* Screening nur eine erste Vorauswahl wirksamer Substanzen bzw. Pflanzenextrakte, die nochmals in aufwendigeren *in vivo* Untersuchungen sowie unter praxisnahen Erhebungen unbedingt getestet werden müssen.

Untersuchungen zur Wirksamkeit von Substanzen an der Pflanze bieten neben den schon erwähnten fundierteren Ergebnissen auch die Möglichkeit, eine Aussage über die Wirkung von Substanzen gegenüber Pathogenen zu treffen, die wie obligat biotrophe Pathogene aufgrund ihrer Lebensweise nur an der Pflanze kultiviert werden können. Mit dieser Methode bietet sich weiterhin die Möglichkeit Substanzen zu identifizieren, die nur über die Pflanze ihre Wirksamkeit zeigen, wie es zum Beispiel bei Resistenzinduktoren beschrieben wird (SCHÖNBECK *et al.* 1993). Andererseits können aber auch solche Substanzen untersucht werden, die zum Erreichen ihrer vollen Wirksamkeit die Pflanzen benötigen. Beispiele hierfür sind die Wirkstoffe Propamocarb-Hydrochlorid, Metalaxyl, Benomyl und Fosetyl (REICH *et al.* 1992; REICH, 1994; CRUTE, 1979; BRUCK *et al.* 1980). Dies könnte nach SCHWINN &

STAUB (1987) an einer indirekten Wirkung über den Stoffwechsel der Pflanze oder an einer Metabolisierung bzw. Aktivierung der Wirkstoffe im pflanzlichen Stoffwechsel liegen (REICH, 1994). Aufgrund der dargestellten Argumente und eigener Ergebnisse läßt sich ableiten, daß bei der Suche nach neuen Substanzen die Prüfung der Wirksamkeit an der Pflanze die am meisten Erfolg versprechende Methode ist.

Zusätzlich zu Wirksamkeit geprüfter Substanzen lassen Untersuchungen an der Pflanze auch Aussagen über die Phytotoxizität der Stoffe zu. Insbesondere dieser Aspekt stellt ein wichtiges Kriterium für die Entwicklung neuer Wirkstoffe dar (UESUGI, 1998). Zwar führte die Applikation von Pflanzenextrakten aus *Heracleum sphondylium* bei allen untersuchten Schadpilzen zu einer stark eingeschränkten Entwicklung, gleichzeitig zeigten sich aber auf den behandelten Pflanzen deutliche phytotoxische Nebenwirkungen. Pflanzenextrakte stellen ein Substanzgemisch dar, in dem eine Fülle von aktiven Komponenten enthalten sein können. Aufgrund dieser Tatsache könnte der negative Einfluß des Extrakts möglicherweise durch die Isolierung der fungizid wirkenden Substanz behoben werden. Derart schädigende Einflüsse auf den Stoffwechsel der Pflanzen könnten auch bei der Suche nach Leitstrukturen für neuartige Wirkstoffe ein großes Problem darstellen. Da von einigen Autoren eine stark phytotoxische Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen beschrieben wurde und selbst geringere phytotoxische Effekte Ertragseinbußen erwarten lassen, sollten solche Reaktionen der Pflanze durch sensitive Methoden bereits im Screening detektiert werden (SKIPP *et al.* 1977; GRÄFF *et al.* 1990; RAGSDALE, 1991 und BRENNER, 1993). Als geeignete Verfahren erwiesen sich sowohl die Messung der Chlorophyllfluoreszenz als auch Untersuchungen zum Gaswechsel der Versuchspflanzen. Während durch die Applikation der Pflanzenextrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* die Elektronentransportrate nicht beeinflußt wurde, zeigten die Ergebnisse zur Photosyntheserate deutliche Veränderungen an den behandelten Pflanzen. Dieser Effekt auf die Physiologie der Pflanzen ließ sich auf die Leerformulierung dieser Pflanzenextrakte zurückführen, und verdeutlicht die Empfindlichkeit der verwendeten Methoden.

In den geprüften Wirt-Pathogen-Modellen konnten eine Reihe von Pflanzenextrakten mit sehr guter befallsreduzierender Wirkung identifiziert werden. Sie erreichten in einigen Fällen einen ähnlich hohen Wirkungsgrad wie die zum Vergleich herangezogenen protektiven Fungizide. Gute befallsreduzierende Wirkungen konnten auch von anderen Autoren beobachtet werden (LAKSMANN *et al.* 1990, ROVESTI *et al.* 1992, REIMERS *et al.* 1993, MENON, 1994, SHAHI *et al.* 1996 und PASTER *et al.* 1996, CASTOR *et al.* 1998).

In eigenen Versuchen wurde eine deutliche Selektivität im Wirkungsspektrum der Extrakte beobachtet. Diese Selektivität in der Wirkung von Substanzen ist nach LYR (1995) und YAMAGUCHI (1998) ein wichtiger Aspekt bei der Suche nach neuen Wirkstoffen, da die Applikation von breit bioziden Substanzen mit dem integrierten Pflanzenbau und modernen Umweltauflagen nicht zu vereinbaren ist. Nach MOHAMED *et al.* (1996) können Pflanzenextrakte auch breit wirksame fungizide Eigenschaft besitzen. So zeigten zwei äthanolische Extrakte aus rotem und grünen Betelpfeffer (*Piper betle*) eine gute Wirksamkeit gegenüber einer großen Anzahl von Pathogenen.

Als wesentliches Kriterium bei der Beurteilung der untersuchten Extrakte auf ihre Eignung als Pflanzenbehandlungsmittel wurde die Wirksicherheit der Extrakte herangezogen. Diese äußerte sich vor allem in einer guten Reproduzierbarkeit der Wirkung. Bei der Verwendung von Pflanzenextrakten ist die Wirksicherheit ein großes Problem und stellt einen Hauptgrund für die geringe Anzahl der bis heute in der Landwirtschaft verwendeten Naturstoffpräparate dar (LATTEN 1994; BRENNER, 1993).

Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von Pflanzenextrakten zeigten, daß hier eine deutliche Korrelation zwischen der applizierten Extraktkonzentration und der Befallsreduktion besteht. So zeigte sich am Beispiel der Dosis-Wirkungs-Beziehung des Extrakts aus *P. erecta* gegenüber dem Befall von Tomaten mit *P. infestans* ein deutlicher sigmoider Kurvenverlauf, der für fungizide Substanzen typisch ist und auch bei anderen biologisch aktiven Wirkstoffen beobachtet wird. In eigenen Versuchen wurde dies auch am Beispiel des Wirkstoffs *Dichlofluanid* dargestellt. Die Darstellung dieser Abhängigkeit in einem nicht linearen Kurvenverlauf bietet nach MICHEL *et al.* (1999) die Möglichkeit, eine Aussage über die optimale Dosis der zu applizierenden Substanz sowie Unterschiede in der Wirksamkeit von Präparaten gegenüber sensitiven Erregerstämmen zu beschreiben (ORTEGA *et al.* 1996; 1997).

Die Bestimmung der optimalen Wirkstoffkonzentration hat eine große Bedeutung für die spätere Aufwandmenge in der Praxis, da hier erfahrungsgemäß wesentlich höhere Extraktkonzentrationen benötigt werden. In den durchgeführten Untersuchungen zeigten einige Extrakte schon bei einer Aufwandmenge von 1 % Trockensubstanz eine 100 %-ige Befallsreduktion. Im Gegensatz dazu waren in Untersuchungen von LATTEN (1994) wesentlich höhere Konzentrationen von Pflanzenextrakten für eine ausreichende Reduktion des Befalls an der

Pflanze notwendig. Von ursprünglich 44 im Gewächshaus als gut wirksam gegenüber *P. infestans* eingestuften Extrakten waren nur vier für eine Anwendung im Freiland geeignet.

Neben der Ermittlung der optimalen Applikationsdosis bietet die Darstellung der Wirksamkeit mittels einer Dosis-Wirkungs-Beziehung die Möglichkeit, einen Vergleich von Substanzen anhand ihrer EC₅₀ bzw. EC₉₀ Werte vorzunehmen. So verglich DAVIDSE (1995) anhand der EC₅₀ Werte verschiedener Oomycetenfungizide ihre Wirksamkeit gegenüber einem metalaxylresistenten sowie einem Wildstamm von *P. infestans*. Ein Vergleich des EC₅₀ und EC₉₀ Wertes des pflanzlichen Rohextrakts aus *P. erecta* mit den Werten des Wirkstoffs *Dichlofluanid* zeigte, daß sich in beiden Fällen die Wirksamkeit in einem Bereich von einer Zehnerpotenz bewegte. Die Differenz in der Wirksamkeit der beiden Substanzen, bezogen auf den EC₅₀ Wert, lag um den Faktor 200 auseinander. GLOGER (1995) beschreibt hingegen, daß man erfahrungsgemäß von dem Faktor 100 ausgehen kann, den ein Rohextrakt schlechter wirkt als die darin enthaltene aktive Reinsubstanz. Solche Erfahrungswerte beziehen sich allerdings meist auf *in vitro* gewonnene Ergebnisse. Der hier dargestellte Extrakt zeigte einen EC₅₀ Wert von 0,008 Prozent gegenüber dem Myzelwachstum von *P. infestans*. Dies würde bei einem Faktor 100 einem EC₅₀ Werte der Reinsubstanz von 0,8 ppm entsprechen. Diese Konzentration liegt in einem Bereich, in dem auch die EC₅₀ Werte konventioneller Fungizide liegen (LYR, 1995; FUGMANN, 1991; KLINKENBERG *et al.* 1998b). Die Wirksamkeit von Oomycetenfungiziden, dargestellt an Hand ihrer EC₅₀ Werte gegenüber dem Myzelwachstum von *P. infestans*, liegen in einem Bereich von > 50 ppm bis < 1 ppm (LYR, 1995). Bei der Verwendung von Erfahrungswerten besteht allerdings die Gefahr, daß Extrakte, deren Reinsubstanzen zwar hochwirksam sind, die aber nur in geringen Mengen vorliegen, nicht berücksichtigt werden, weil der Rohextrakt im Biotest kaum eine Wirkung erkennen läßt (GLOGER, 1995).

Für die Beurteilung von wirksamen Substanzen sind neben der Ermittlung der optimalen Extraktkonzentration Kenntnisse über die Wirkdauer sowie die mögliche Wirkungsweise von entscheidender Bedeutung. Sie bestimmen weitgehend den späteren Applikationszeitpunkt sowie die Behandlungshäufigkeit im Freiland (HOFFMANN *et al.* 1994). Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* zeigten gegenüber den beiden Oomyceten *P. infestans* und *P. viticola* in den untersuchten Wirt – Pathogen - Modellen eine Wirkungsdauer von fünf Tagen. Diese anhaltende Wirkung ließ sich nach Applikation sowohl bei einer 1 %-igen als auch bei einer 0,5 %-igen Konzentration der Extrakte beobachten. Gegenüber dem Erreger

des Grauschimmels an Paprika konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Hier lag die Wirksamkeit der Extrakte bei einer Applikation fünf Tage vor der Inokulation auf einem niedrigeren Niveau als bei einer Behandlung vier Stunden vor Inokulation. In Untersuchungen von LATTEN (1994) wiesen die meisten von ihr untersuchten Extrakte bei einer Behandlung fünf Tage vor der Inokulation eine geringere Wirksamkeit auf als es bei Applikationen von einem Tag vor Inokulation zu beobachten war. Dieser Effekt wurde durch eine Verringerung der Extraktkonzentration unter fünf Prozent noch verstärkt. Eine mögliche Ursache für eine unzureichende Wirkungsdauer könnte entweder die Photolabilität der Wirksubstanzen sein, wie dies für den Naturstoff Strobilurin A und für Phenylpyrrol beschrieben wurde (CLOUGH & GODFREY, 1998; KNÜPPEL *et al.* 1992), andererseits könnte aber auch der Abbau der Substanzen durch Phylloosphärenorganismen ein möglicher Grund für eine verringerte Wirkungsdauer sein. Die in den eigenen Versuchen festgestellten Unterschiede in der Wirkungsdauer der Extrakte gegenüber den Oomyceten und dem Erreger des Grauschimmels könnten darin begründet sein, daß je nach Pathogen unterschiedliche Substanzen in den Extrakten für die Wirksamkeit verantwortlich sind, und die gegenüber *B. cinerea* wirksame Substanz möglicherweise photolabil ist. Die Wirkdauer einer Substanz kann ebenso durch die Oberflächenbeschaffenheit, die Blattstellung, die Blattbehaarung sowie durch die Art der epikutikulären Wachse der Pflanzen beeinflußt werden, die entscheidend den Wirkstoffbelag auf der Blattoberfläche bestimmen (WALTER *et al.* 1977). Der Bekämpfungserfolg einer Behandlung hängt in besonderer Weise von der Art des Wirkstoffbelags ab (STEDEN, 1992). Für eine unzureichende Wirkung kann neben der Art des Wirkstoffbelags auch die Gleichmäßigkeit der Belagsstruktur auf der Pflanzenoberfläche verantwortlich sein (STEDEN, 1992; PRASAD & CADOGAN, 1992).

Eine Möglichkeit zur Optimierung der Belagsstruktur ist die Verwendung von Formulierungshilfsstoffen, wobei insbesondere Netzmittel für eine Verbesserung der Belagsstruktur auf dem Blatt herangezogen werden. In Untersuchungen von HERGER (1991) führte die Zugabe von Netzmitteln zu einer Verbesserung der Spritzeigenschaften und der Wirksamkeit von Pflanzenextrakten. In Gegensatz dazu konnte in eigenen Untersuchungen durch die Zugabe verschiedener Netzmittel die Wirksamkeit der Pflanzenextrakte jedoch nur geringfügig erhöht werden. Die geprüften Extrakte wiesen offenbar aufgrund ihre Inhaltsstoffe bereits eine optimale Belagsstruktur auf dem Blatt auf, so daß die Verwendung von Netzmitteln zu keiner Verbesserung führte.

Untersuchungen zur Wirkungsart der Pflanzenextrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* zeigten, daß die Extrakte in den verwendeten Wirt-Pathogen-Modellen weder kurativ noch eradikativ wirkten. Dieser drastische Verlust der Wirksamkeit bei postinfektionellen Behandlungen kann in der fehlenden Systemizität der Extrakte begründet sein, da zu diesem Zeitpunkt die Etablierung des Pathogens im Gewebe der Pflanzen abgeschlossen ist. Weiterhin könnte für die fehlende Wirksamkeit auch eine unzureichende Penetration durch das Gewebes, oder aber ein Auskristallisieren der aktiven Substanzen auf der Blattoberfläche verantwortlich sein. Dies läßt vermuten, daß die Wirksamkeit der Extrakte durch eine entsprechende Aufbereitung und Formulierung der Pflanzeninhaltsstoffe verbessert werden kann. Durch die Zugabe von Linolsäure, welche nach BICKERS (1997) penetrationsfördernde Eigenschaften besitzt, konnte eine Steigerung der Wirksamkeit der beiden Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* gegenüber *P. infestans* festgestellt werden. Neben penetrationsfördernden Eigenschaften kann Linolsäure möglicherweise auch als Signalstoff im pflanzlichen Stoffwechsel eine entscheidende Rolle für die Auslösung von Abwehrvorgängen spielen (COHEN *et al.* 1991), was ebenso zur Verbesserung der Wirksamkeit der Extrakte führen kann.

Die verwendeten Pflanzenextrakte eignen sich nicht als Beizmittel für Getreide, da die Extrakte eine keimhemmende Wirkung auf das Saatgut ausübten. Ursache hierfür sind phytotoxische Reaktionen der Pflanzen auf die Extraktapplikation. Ähnliches beobachteten auch SCHOLZ *et al.* (1998) bei der Verwendung von Extrakten aus der Gewürznelke von *Eugenia caryophyllata* zur Saatgutbehandlung von Weizen. Die in eigenen Untersuchungen festgestellten phytotoxischen Reaktionen der Samen lagen möglicherweise an den sehr hohen Aufwandmengen, die zur Beizung notwendig waren. Ähnliche Beobachtungen, daß nur hohe Aufwandmengen von Naturstoffen aus Pflanzen eine Wirksamkeit als Saatgutapplikation zeigten, wurden auch von anderen Autoren berichtet (KISHORE *et al.* 1989; MISHRA & MISHRA, 1990; SU, 1991). Die Tatsache, daß die geprüften Extrakte in der verwendeten Formulierung nur protektiv wirksam waren, macht die Verwendung der Extrakte als Beizmittel zusätzlich problematisch. Mit rein protektiv wirkenden Substanzen ist nur die Bekämpfung von Erregern möglich, die am Korn anhaften oder die unmittelbar mit dem Extrakt in Berührung kommen. Weiterhin sind die Anforderungen an die Pflanzenverträglichkeit eines Beizmittels wesentlich höher, da der zu schützende Keimling empfindlicher reagiert als eine voll entwickelte Pflanze.

Neben der fungiziden Wirksamkeit von Pflanzenextrakten kann eine weitere Wirkungsweise auch die Resistenzinduktion sein. Die Aktivierung der natürlichen Widerstandsfähigkeit der Pflanze kann nicht nur durch synthetische Substanzen, wie es am Beispiel einer Reihe von Wirkstoffen in der Literatur beschrieben wurde (METRAUX *et al.* 1991; STAUB *et al.* 1992; KESSMANN *et al.* 1994; COHEN, 1994; FRIEDRICH *et al.* 1996; RUESS *et al.* 1996; LAWTON, 1996), sondern auch durch die Applikation von Naturstoffen erfolgen. So wurden beispielsweise Extrakte von *Reynoutria sachalinensis* ('Milsana', Fa. Compo) als Resistenzinduktoren beschrieben (HERGER *et al.* 1988; HERGER, 1991; KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS & SCHMITT, 1998). Im Gegensatz zu fungizid wirkenden Substanzen benötigen Resistenzinduktoren zur Entfaltung ihrer Wirksamkeit ein Zeitintervall zwischen Behandlung und Befall (SCHÖNBECK *et al.* 1993). Weiter hin zeigen sie unter praktischen Anbaubedingungen häufig eine höhere Wirksamkeit als im Gewächshaus (RUESS *et al.* 1996). Die Wirksamkeit des geprüften Extraktes aus *Trigonella foenum-graecum* ist möglicherweise auf eine resistenzinduzierende Wirkung zurückzuführen. Während sich in den *in vitro* - Untersuchungen nur eine geringfügige Wirkung zeigte, führten Applikationen des Extrakts *in vivo* zu Befallsreduktionen von über 80 Prozent an Tomaten gegenüber *Alternaria solani*. Darüber hinaus ist der Inhaltsstoff Trigonellin dieser Pflanzenart als Resistenzinduktor beschrieben (SCHÖNBECK *et al.* 1993; KRASKA, 1996). Weitere Untersuchungen bestätigten diesen Eindruck. So zeigten Extraktapplikationen von *T. foenum-graecum* in den Wirt-Pathogen-Modellen *P. infestans* und *P. viticola*, eine Abhängigkeit zwischen dem Zeitintervall und der Wirksamkeit. Ähnliches ließ sich auch durch die Behandlungen mit dem Extrakt aus *Salix* spp. beobachten. Hier könnte der Inhaltsstoff Salicylsäure für die resistenzinduzierenden Eigenschaften des Extrakts verantwortlich sein. Salicylsäure wurde bereits von anderen Autoren als Resistenzinduktor beschrieben (MILLS & WOOD, 1984; YALPANI *et al.* 1991; WALTERS *et al.* 1993; KESSMANN *et al.* 1994).

Ein entscheidendes Kriterium für die erfolgreiche Verwendung von Naturstoffen bzw. ihrer aktiven Substanzen ist eine Bestätigung der Wirksamkeit auch unter Freilandbedingungen. Hier haben neben den häufig wechselnden Umweltfaktoren auch der andauernde Befallsdruck von Pathogenen einen starken Einfluß auf die Wirksamkeit. Nach KRAUSE (pers. Mitt.) und BRENNER (1993) stellt die Entwicklung von Naturstoffen ein großes Problem dar, weil sowohl die biologische Aktivität als auch die Stabilität von Naturstoffen im Freiland oft geringer ist als im Gewächshaus.

In eigenen Untersuchungen konnte dies nicht bestätigt werden. So zeigten Versuche unter praktischen Anbaubedingungen in Abhängigkeit von Kulturpflanze und Erreger zwar eine unterschiedliche Wirksamkeit der Pflanzenextrakte, dennoch ließen sich deutliche Befallsreduktionen durch die Applikation der Extrakte beobachten. Die protektive Applikation des Extraktes aus *Salvia officinalis* verhinderte den Befall mit *P. infestans* an Tomaten in gleichem Maße wie der fungizide Wirkstoff *Dichlofluanid* in praxisüblicher Aufwandmenge. Die mangelnde Wirkung der untersuchten Extrakte gegenüber *B. cinerea* an Erdbeere wird auf die spezifische Wirt – Erreger - Interaktion zurückgeführt, bei der die Infektion hauptsächlich über die nur schwierig zu schützenden Narben in der Blüte erfolgt. An Paprikapflanzen, deren Gewebe aktiv vom Pilz besiedelt werden muß, konnte *B. cinerea* unter Glas dagegen sehr erfolgreich bekämpft werden. Vor allem die Untersuchungen im Kartoffelanbau und im Weinbau in der Vegetationsperiode 1997 unterstreichen das Potential von Pflanzeninhaltsstoffen als erfolgversprechendes Pflanzenbehandlungsmittel gegenüber phytopathogenen Pilzen. Trotz des in diesem Jahr aufgrund günstiger Witterungsbedingungen außerordentlich starken Befallsdrucks mit falschen Mehлтаupilzen, konnte der Befall mit *P. infestans* an Kartoffelpflanzen durch die Behandlungen mit Pflanzenextrakten aus *S. officinalis* und *P. erecta* deutlich reduziert, sowie ein Mehrertrag von über 17 Prozent gegenüber unbehandelt festgestellt werden (BLAESER & STEINER, 1998a). An Weinreben bewirken die Applikationen des Extrakts aus *S. officinalis* ebenso eine deutliche Befallsreduktion, die mit der konventionellen Fungizidvariante vergleichbar war.

Unterschiede in der Höhe der befallsreduzierenden Wirkung der Extrakte in den Wirt-Pathogen-Modellen *P. infestans* - Kartoffel und *P. viticola* - Weinrebe lassen sich auf die unterschiedliche Kulturform der Versuchspflanzen zurückführen. So ist die Kulturführung im Weinbau bemüht, einen luftdurchlässigen Bestand zu erhalten, der eine optimale Benetzung aller Pflanzenteile durch die Applikation von Substanzen ermöglicht. Kartoffelpflanzen hingegen erschweren durch ihre hohe Biomasseproduktion spätestens nach dem Reihenschluß eine optimale Benetzung aller Pflanzenteile. Weiterhin können auch unterschiedliche Blattstellungen und Blattoberflächen der beiden Kulturen einen Einfluß auf das Abwaschverhalten der Extrakte ausüben. In eigenen Versuchen konnte durch die Zugabe eines Haftmittels die Abwaschfestigkeit der Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* deutlich erhöht werden.

Untersuchungen zur Wirksamkeit von Pflanzenextrakten gegenüber unterschiedlicher Entwicklungsstadien phytopathogener Pilze sollten einen Anhaltspunkt über die Wirkungsweise

der aktiven Substanzen in den Extrakten geben. Die Wirksamkeit moderner Oomycetenfungizide ist sehr spezifisch gegenüber verschiedenen Entwicklungsstadien von Pilzen. Die meisten dieser Substanzen hemmen *in vitro* das Myzelwachstum deutlich stärker als die Sporenkeimung der Pilze (SCHWINN & STAUB, 1995).

In eigenen Untersuchungen zeigten die Pflanzenextrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* eine unterschiedliche Wirkungsweise gegenüber den untersuchten Entwicklungsstadien der Pilze. Die Hauptwirkung des Extrakts aus *S. officinalis* richtete sich gegen den Zoosporenschlupf, die Zoosporenbeweglichkeit sowie die Zoosporenkeimung der beiden geprüften Oomyceten. Ähnliche Effekte wurden auch von anderen Autoren nach Applikationen von Ajone, einer Substanz aus *Allium sativum*, beschrieben (SINGH & CHAUHAN 1992). Einflüsse von Pflanzenextrakten auf pilzliche Sporen und ihre Keimung wurden auch von anderen Autoren festgestellt (REIMERS *et al.* 1993; LAKSHMANAN *et al.* 1990). Die Wirkung des Extrakts aus *S. officinalis* war gegenüber den Zoosporen von *P. infestans* etwa fünfmal höher als gegenüber den Sporen von *P. viticola*. Unterschiede in der Spezifität von Substanzen gegenüber den Sporen verschiedener Oomyceten wurden bei dem Wirkstoff Dimethomorph beobachtet (ALBERT *et al.* 1991).

In höheren Konzentrationen zeigte sich neben der beschriebenen Wirksamkeit noch ein weiterer Effekt des Extrakts. So führte die Behandlung der Zoosporen von *P. infestans* mit dem Extrakt aus *S. officinalis* zu einer Zerstörung der Sporen (BLAESER *et al.* 1998b). Weitere Untersuchungen zeigten, daß dieser Effekt bereits kurze Zeit nach der Behandlung zu beobachten war und daher auf einen spezifischen Einfluß des Extrakts zurückzuführen ist. Ähnliche Einflüsse auf die Zoosporen wurden auch durch die Applikation des Wirkstoffs Azoxystrobin beobachtet (KAPPES, pers. Mitt.). Untersuchungen, ob es sich bei der Wirkung des Extrakts um denselben Wirkmechanismus handelt wie beim Azoxystrobin, welches die mitochondriale Atmungskette hemmt, ergaben keine Übereinstimmung. Auch die Überprüfung eines möglichen osmotischen Effekts des Pflanzenextrakts, der nach STILLE (1965) einen Einfluß auf die Zoosporen ausübt, konnte nicht bestätigt werden. Gegenüber den Sporen von *B. cinerea* zeigte keiner der Extrakte eine nennenswerte Wirkung. Dies verdeutlicht die selektive Wirkung der Extrakte, die ein wichtiges Kriterium bei der Suche nach neuen Wirkstoffen darstellt. Im Gegensatz zu breit bioziden Substanzen, die auch „Nicht-Zielorganismen“ beeinträchtigen können, üben selektiv wirksame Substanzen nur einen Ef-

fekt auf ihre Zielorganismen aus. Dies ist laut EVANS & LAWSON (1992) unumgänglich bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe.

Während die Hauptwirkung des Extrakts aus *S. officinalis* auf die Sporenkeimung gerichtet ist, hemmt der Extrakt aus *P. erecta* das Myzelwachstum der untersuchten Pilze. Auch im Wirkungsspektrum dieses Extrakts zeigte sich eine deutliche Selektivität der Wirksamkeit gegenüber den untersuchten Pathogenen. Das Myzelwachstum von *P. infestans* wurde deutlich stärker gehemmt als das Myzelwachstum von *B. cinerea*. Bei einer Konzentration von 0,01 Prozent des Extraktes aus *P. erecta* zeigte das Myzelwachstum in makroskopischen Bonituren Wachstumsanomalien, was sich auch durch mikroskopische Untersuchungen bestätigen ließ. Myzel von *P. infestans* wies im Vergleich zu unbehandelt erhebliche Veränderungen der Hyphen in Form von Stauchungen und starker Verzweigung auf. Ähnliche Effekte konnten auch nach der Behandlungen des Myzels von *P. infestans* mit Aluminiumfosetyl beobachtet werden (DERCKX, 1984). Derartige charakteristische Hyphenanomalien sind typisch für Fungizide, die primär oder sekundär in die Synthese von Zellwandkomponenten des Pilzes eingreifen, wie beispielsweise aromatische Kohlenwasserstoff - Fungizide, Phosphonate oder Phenylamide (DERCKX, 1984; GROHMANN & HOFFMANN, 1982). JOCHOVA *et al.* (1993) berichten, daß die Applikation von Benomyl eine Stauchung sowie ein starkes Verzweigen der Hyphen von *Aspergillus nidulans* hervorruft. Dies ist nach MORRIS (1986) auf eine Hemmung der Mikrotubuli zurückzuführen. GROHMANN & HOFFMANN (1982) beobachteten Veränderungen der Tallusstruktur von Phytophthora- und Pythium- Arten nach der Applikation von Metalaxyl, was durch eine Beeinträchtigung der Zonierung (apikal, subapikal und vakuolisiert) der Hyphen hervorgerufen wird. Diese ist vermutlich auf eine Schädigung der kontraktilen Mikrotubuli in Cytoplasma zurückzuführen, die wesentlich an dem dynamischen Zusammenspiel dieser Zellzonen beteiligt sind. Ähnliche Beobachtungen des Myzelhabitus wurden auch nach der Applikation von Zuckeranalogen beschrieben von (EL-GHAOUTH *et al.* 1995). Behandlungen des Myzels von *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* und *Rhizopus stolonifer* mit 2-deoxy-D-glucose (0,1 %) riefen, ähnlich wie in eigenen Untersuchungen beobachtet, Veränderungen der Myzelmorphologie hervor. Daß die Behandlung mit Naturstoffen ebenfalls das Myzelwachstum und die Morphologie beeinträchtigen können, beschrieben auch ZAMBONELLI *et al.* (1996). So bewirkte die Zugabe von ätherischen Ölen aus *Thymus vulgaris* und *Lavandula* sp. eine Hemmung des Myzelwachstums sowie optische Veränderungen in der Hyphenmorphologie.

Ultrastrukturelle Untersuchungen der pilzlichen Hyphen nach einer Extraktapplikation bestätigten die lichtmikroskopisch beobachteten Effekte. Hier ließen sich je nach Erreger deutliche cytologische Einflüsse auf die Hyphen erkennen. Diese äußerten sich in einer starken Vakuolisierung bzw. Degeneration des Cytoplasmas sowie in Veränderungen an der Zellwand der Pilze in Form von Verdickungen, Ablösung von Zellwandbereichen und Zellwandneubildungen. Ähnliche Effekte konnten auch durch die Behandlung mit Fungiziden (KUHN *et al.* 1991) und Naturstoffen beobachtet werden (ADAMS, 1996). Behandlungen mit Triadimenol reduzierten das Myzelwachstum und induzierten die Bildung von Zellwandverdickungen an den Hyphen eines resistenten sowie eines sensitiven Stamms von *Ustilago avenae* (HIPPE & GIESEN, 1987). GROHMANN & HOFFMANN (1982) beobachteten ähnliche Effekt an *Phytophthora* - Arten nach einer Behandlung mit Metalaxyl. Die Einflüsse auf die Zellwand sind vermutlich auf eine untypische Ausrichtung der Mikrotubuli quer zur Längsachse der Hyphen zurückzuführen, wodurch es zu einer Aufhebung der Unterteilung in die von GROVE & BRACKER (1970) beschriebenen Zonen kommt. In eigenen Untersuchungen konnten solche Veränderungen der Mikrotubuliorganisation jedoch nicht beobachtet werden. Morphologische Veränderungen sind nach EDLICH & LYR (1995) relativ unspezifisch und können durch verschiedene Wirkmechanismen von Fungiziden hervorgerufen werden. Morphologische Veränderungen könnten entweder auf einer Hemmung der Proteinsynthese beruhen, oder aber auf der bereits beschriebenen Beeinflussung der Mikrotubuli. Ultrastrukturelle Veränderungen der Hyphen konnte von ADAMS (1996) nach der Applikation von Zimtaldehyd gegenüber *Cladosporium herbarum* beobachtet werden. Sie fand neben Zellwandverdickungen und Zellwandneubildungen auch eine gehäufte Ansammlung von Glykoseeinschlüssen, was ihrer Meinung nach auf einer Abwehrreaktion des Pilzes beruht. In eigenen Untersuchungen wurden ähnliche Ansammlungen in den Zellen nicht festgestellt. Neben einer verdickten Zellwand konnte in eigenen Experimenten auch eine vermehrte Vakuolisierung von pilzlichen Strukturen nach der Behandlung mit Naturstoffen festgestellt werden, was auch BIANCHI (1997) und EL-GHAOUTH *et al.* (1997) beobachteten.

Neben den bereits beschriebenen cytologischen Veränderungen der Pilze zeigte sich in Schnitten des Myzels von *B. cinerea* ein weiterer Effekt durch die Applikation des Extraktes aus *P. erecta*. Aus intakten Zellen wurden neue Hyphen in den zerstörten Hyphen gebildet. Dies ist möglicherweise auf einen Schutzmechanismus des Pilzes zurückzuführen, da in solchen Zellen die alten Zellwandstrukturen eine Diffusionsbarriere der aktiven Substanzen zu den neuen Hyphen darstellen können. Weiterhin wäre aber auch die Nutzung abgestorbener

Hyphen als Nährstoffquelle für die Neubildung von Pilzstrukturen denkbar, was aufgrund der starken Vakuolisierung des Cytoplasmas eher wahrscheinlich ist. Möglicherweise sprechen solche Veränderungen im pilzlichen Cytoplasma für eine Beeinträchtigung der Mitochondrienmembran. Untersuchungen zur Wirkungsweise von aromatischen Hydrocarbonen (z.B. Chloroneb) zeigten, daß diese eine Veränderung der inneren Mitochondrienmembran bewirkten, was nach einer Vakuolisierung der Kernhülle eine Verdickung der Zellwände nach sich zog (CASPERSON & LYR, 1982; LYR & CASPERSON, 1982).

Nach SCHWINN & STAUB (1995) wirken die meisten fungiziden Wirkstoffe lediglich fungistatisch. Die in den eigenen Untersuchungen geprüften Pflanzenextrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* zeigten gegenüber *P. infestans* eine ausgesprochen fungizide Wirksamkeit, die sich auch in mikroskopischen Beobachtungen bestätigen ließ. Gegenüber den beiden Erregern *B. cinerea* und *A. solani* zeigten hingegen beide Extrakte eine fungistatische Wirkung. Auch die Beobachtung, daß in abgestorbenen Hyphen von *B. cinerea* neue Pilzstrukturen gebildet werden, unterstützt diese Aussage. Wirkunterschiede zwischen den Pathogenen lassen sich auf die unterschiedliche Hyphenstruktur der Erreger zurückführen. Während *B. cinerea* und *A. solani* septierte Hyphen aufweisen, sind die Hyphen von *P. infestans* nicht septiert. Bei septierten Hyphen werden nur die Zellen geschädigt, die direkt mit dem Extrakt in Berührung kommen, während bei unseptierten Hyphen die gesamte Hyphe in Mitleidenschaft gezogen wird. Die von GROVE & BRACKER (1970) beschriebene Zonierung der Hyphen von *P. infestans* besteht auf cytoplasmatischer Ebene und stellt somit keinen ausreichenden Schutz gegenüber aktiven Substanzen dar.

Aufgrund der sehr guten Wirksamkeit in den Screeningversuchen, ihrer anhaltenden Wirkung sowie der im Freiland bestätigten Wirksamkeit wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen die Isolierung und Identifizierung der aktiven Inhaltsstoffe aus den Extrakten von *P. erecta* und *S. officinalis* vorgenommen.

Nach FROHNE & JENSEN (1992) und WAGNER (1993) werden für die Pflanze *Salvia officinalis* als wertbestimmende Inhaltsstoffe die Terpene α,β -Thujon, 1,8-Cineol, (+) Campher, Borneol und Borneolacetat sowie bei einigen Spezies Thymol und Cineol angesehen. Außerdem kommen Triterpensäuren (Ursol- und Oleanolsäure), Gerbstoffe (Rosmarinsäure) und Flavonoide in *S. officinalis* vor. MORCK (1997) erwähnt weiterhin Diterpenoide (Carnosolsäure) als Inhaltsstoffe dieser Pflanze. Pharmazeutisch wird dem ätherischen Öl aus

den Blättern von *S. officinalis* eine antiseptische, fungizide, virostatistische und antiphlogistische Wirkung zugesprochen (WIESENAUER & WIDMAIER, 1991).

Die wertbestimmenden Inhaltsstoffe von Extrakten aus dem Wurzelstock von *Potentilla erecta* sind nach FROHNE & JENSEN (1992) vor allem Gerbstoffe, wie sie für die Familie der Rosaceae typisch sind. Als charakteristische Verbindung nennt er das Pseudosaponin Tormentol, bei dem die ebenfalls typische Tormentillsäure mit 2 Mol Glukose verestert ist. Weiterhin sind nach WAGNER (1993) neben Tormentillsäure auch Catechingerbstoffe wie Tormentillrot und Tormentillgerbsäure enthalten. Die Ellagsäure ist ebenfalls ein Inhaltsstoff, der in dem Wurzelstock der Pflanze vorkommt. In der Humanmedizin wird den Extrakten aus *Potentilla erecta* (Wurzelstock) eine antiallergische, immunstimulierende und interferoninduzierende Wirkung zugesprochen (WAGNER, 1993).

Von den beiden Pflanzenextrakten aus *S. officinalis* und *P. erecta* ist bisher keine Wirkung gegenüber pflanzenpathogenen Pilzen beschrieben worden. HIRSCHFELD & KLINGAUF (1988) beobachteten lediglich eine repellente Wirkung von Extrakten aus *Salvia officinalis* gegenüber der kleinen Kohlflyge. Applikationen der Extrakte aus *Salvia fruticosa* und dem ätherischen Öl dieser Pflanze zeigten in Untersuchungen eine deutliche Reduktion des Myzelwachstums von pflanzenpathogenen Pilzen (FARAG *et al.* 1989a, 1989b; ARGÜL & MIVANC, 1989; YEGEN *et al.* 1992). Nach YEGEN *et al.* (1992) ist die Wirkung des ätherischen Öls höchstwahrscheinlich auf die beiden Inhaltsstoffe Carvacrol und Thymol zurückzuführen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von MÜLLER-RIEBAU *et al.* (1995, 1997) beschrieben.

Zur Identifizierung wirksamer Substanzen und um mögliche Wirkungen bekannter Inhaltsstoffe auszuschließen, wurden die Inhaltsstoffe der beiden Pflanzenextrakte auf ihr Vorkommen im Extrakt sowie ihre Wirksamkeit gegenüber phytopathogenen Pilzen überprüft. Nach GIBBONS & GRAY (1998) ist die Dünnschichtchromatographie eine schnelle und preiswerte Methode, um neu isolierte Substanzen mit bereits bekannten Molekülen zu vergleichen. Ein gutes Beispiel hierfür ist die von dem endophytischen Pilz *Taxomyces andreanae* produzierte Substanz Taxol. STIERLE *et al.* (1995) isolierten das pilzliche Taxol, welches mit dem pflanzlichen Inhaltsstoff von *Taxus brevifolia* identisch war. Ein anderes Verfahren zum Vergleich von Naturstoffen mit bekannten Substanzen ist die Bioautographie (HOMANS & FUCHS, 1970; HOLT, 1975; LEVEN *et al.* 1979; RIOS *et al.* 1988; RAHALISON *et al.* 1991). GULATI *et al.* (1998) identifizierten drei fungizide Substanzen aus der Zellkultur von *Pseudomonas*

chlororaphis und verglichen diese mittels Bioautographie mit bekannten Stoffwechselprodukten von *Pseudomonas* - Arten.

In eigenen Untersuchungen wurden die oben beschriebenen Inhaltsstoffe des Extrakts aus *S. officinalis* mit beiden Methoden untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß keines der bekannten Terpene in dem Extrakt detektiert werden konnte. Aufgrund der Extraktionsmethode und der Extraktionsbedingungen waren die ätherischen Öle der Pflanze möglicherweise nicht mehr im Extrakt vorhanden. Weiterhin konnte eine Wirksamkeit der untersuchten Substanzen gegenüber *A. solani* nur bei sehr hohen Konzentrationen (20000 ppm a.i.) festgestellt werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von YEGEN *et al.* (1992) festgestellt. Hier zeigten die ätherischen Öle erst ab einer Konzentration von 40000 ppm eine Reduktion des Myzewachstums der untersuchten Pathogene. TRIPATHI *et al.* (1986), THOMPSON *et al.* (1987) und KARAPINAR (1990) konnten hingegen eine deutliche Hemmung des Myzelwachstums von pflanzenpathogenen Pilzen schon ab einer Konzentration von 1500 ppm der Substanzen Thymol und Carvacrol feststellen. Nach HITOKOTO *et al.* (1980) läßt sich der Wirkmechanismus dieser Substanzen auf die Bildung von Charge - Transfer Komplexen mit der Aminosäure Tryptophan zurückführen, die dem pilzlichen Stoffwechsel dann nicht mehr zur Verfügung steht (KURITA *et al.* 1981). Diese widersprüchlichen Beobachtungen zur biologischen Wirksamkeit unterschiedlicher Konzentrationen der Substanzen lassen sich auf unterschiedliche Versuchspathogene sowie auf die abweichenden Untersuchungsmethoden und Versuchsbedingungen zurückführen.

Neben Terpenen zählen auch Flavonoide zu den sekundären Inhaltsstoffen beider Pflanzen. In dünnschichtchromatographischen Untersuchungen ließen sich nur in dem Extrakt aus *S. officinalis* Flavonoide detektieren, wovon das Flavonoid Scopoletin aufgrund seines R_f - Werte eindeutig identifiziert wurde. Flavonoide besitzen sowohl fungizide (CHOWDHURY *et al.* 1974; O'NEILL & MANSFIELD, 1982; WEIDENBÖRNER & JHA; 1993) als auch antibakterielle Eigenschaften (HEDIN & WAAGE, 1986), und wurden von WEIDENBÖRNER *et al.* (1992) auch erfolgreich zur Konservierung bzw. Bekämpfung von *Aspergillus* spp. an Samen verwendet. In eigenen Untersuchungen zeigten vier der 16 untersuchten Flavonoide ab einer Konzentration von 1000 ppm eine biologische Wirksamkeit gegenüber *A. solani*. Hiervon war das Flavonoid Scopoletin am wenigsten wirksam. Aufgrund dieser hohen Konzentration, ab der sich eine biologische Aktivität zeigte sowie der geringen Konzentration von 1 – 3 Prozent

in der Pflanze (WAGNER & BLADT, 1997) ist dieser Inhaltsstoff nicht für die Wirkung der Extraktes verantwortlich.

Organische Säuren besitzen ebenfalls eine antimikrobielle Wirkung und könnten daher auch für die Wirksamkeit von Pflanzenextrakten verantwortlich sein (KABARA & EKLUND, 1991). Nach KWOK & SHETTY (1998) zeigt die Rosmarinsäure eine antioxidative und antimikrobielle Wirkung und kann somit auch zum Schutz von Nahrungsmitteln vor pilzlichen Pathogenen genutzt werden. Rosmarinsäure, die nach WAGNER & BLADT (1997) mit einem Gehalt von 2 bis 3 Prozent in der Pflanze *S. officinalis* enthalten ist, konnte in den eigenen Versuchen weder durch dünnschichtchromatographische Untersuchungen detektiert werden, noch zeigte sie in Biotests gegenüber *A. solani* eine biologische Wirksamkeit. Rosmarinsäure scheidet demnach ebenfalls als wirksamer Inhaltsstoff aus.

Neben den bereits erwähnten Verwendungsmöglichkeiten eignet sich die Dünnschichtchromatographie auch zur einfachen Aufreinigung und ersten Isolierung von Substanzen aus Naturstoffextrakten (GIBBONS & GRAY, 1998). Sie bietet die Möglichkeit, aus einem komplexen Substanzgemisch schnell und mit relativ wenig Aufwand Substanzen bzw. Substanzgemische zu trennen. Weiterhin kann mit dieser Methode aufgrund der Rf - Werte bei unterschiedlichen Fließmitteln eine erste Aussage über die Polarität einzelner Substanzen getroffen werden (GIBBONS & GRAY, 1998). Untersuchungen von DELLAR *et al.* (1994) zeigen, daß die Bioautographie eine erfolgversprechende Methode ist, um aktive Substanzen aus Naturstoffen zu detektieren. Mit Hilfe der Bioautographie isolierten sie die fungiziden Sesquiterpene Aristolen-2-eins und Prostantherol aus *Prostanthera* - Spezies. Ebenso isolierten HOSTETTMANN & MARSON (1994) mit dieser Methode eine Reihe von Xanthonen aus *Hypericum brasiliense*, welche im Biotest eine Aktivität gegenüber *C. cucumerinum* zeigten.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie und Bioautographie konnten in eigenen Versuchen die wirksamem Substanzen des Extrakts aus *S. officinalis* in Fraktionen isoliert sowie andere Inhaltsstoffe, die nicht für die Wirkung verantwortlich waren, abgetrennt werden. Weiterhin kann aufgrund der Rf - Werte der Substanzen, die Hemmbanden in der Bioautographie bewirkten, davon ausgegangen werden, daß es sich bei den wirksamen Substanzen um polare Moleküle handeln muß.

Mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) zeigte sich, daß die Aufreinigung und Fraktionierung des Extrakts mittels Dünnschichtchromatographie zu unterschied-

lichen Substanzen in den einzelnen Fraktionen geführt hat. Die Wirksamkeit in den einzelnen isolierten Fraktionen war nur auf wenige Substanzen zurückzuführen. Dies ist ein wichtiger Aspekt für eine spätere Verwendung aktiver Inhaltsstoffe als Pflanzenschutzmittel. Die Untersuchungen mit der HPLC zeigten weiterhin, daß keiner der bekannten Inhaltsstoffe mittels internen Standards in den Fraktionen nachgewiesen werden konnte. Versuche zur weiteren Isolierung der wirksamen Substanzen in den aufgereinigten Fraktionen erbrachten, daß in keiner der präparativ fraktionierten Proben eine Wirkung nachzuweisen war. Eine mögliche Ursache für den Verlust der Wirksamkeit könnte die geringe Probenmenge sein, die für eine Fraktionierung verwendet werden muß. Andererseits könnte auch eine unzureichende Trennung der Substanzen, bzw. eine verzögerte Freigabe von der Säule und die damit verbundene Vermischung der aktiven Inhaltsstoffe über mehrere Fraktionen, ein Grund für die fehlende Wirkung sein.

Untersuchungen der Fraktionen mittels Gaschromatographie und anschließender Massenspektrometrie bestätigten zwar den Trennerfolg der Aufreinigung, es ließ sich aber keine der aktiven Substanzen in den Fraktionen anhand ihrer Massen identifizieren. Auch konnten keine der bekannten Inhaltsstoffe in den Fraktionen nachgewiesen werden. Eine endgültige Identifizierung der wirksamen Substanzen steht daher noch aus, und müßte in weiterführenden Untersuchungen unter Verwendung von anderen Bibliotheken, in denen eventuell eine umfangreichere Sammlung von Massenspektren von Substanzen gespeichert sind, erfolgen.

Eine direkte Applikation von Pflanzenextrakten zur Bekämpfung von phytopathogenen Pilzen wäre im organischen Landbau denkbar. Hier hat sich in den letzten Jahren aufgrund von neuen Gesetzgebungen und dem Verbot von Kupferpräparaten ein starker Handlungsbedarf zur Bekämpfung von pilzlichen Pathogenen ergeben. Weiterhin stellen Naturstoffpräparate in Entwicklungsländern, in denen synthetische Wirkstoffe aufgrund ihres Preises nicht verwendet werden, oder aber keine synthetischen Präparate vorhanden sind, eine gängige Alternative dar. Das wohl bekannteste Beispiel für die Nutzung von Pflanzenextrakten zum Schutz von Kulturpflanzen in Entwicklungsländern ist die Verwendung des Extraktes aus dem Neembaum (*Azadirachta indica*). Neben der seit langem bekannten insektiziden und nematiziden Effekte der Extrakte aus *A. indica* stellt auch die fungizide Wirksamkeit dieses Naturstoffes ein erfolgversprechendes Behandlungsmittel dar (JEYARAJAN *et al.* 1986; LAKSHMANAN *et al.* 1990). Hier könnte die Suche nach aktiven Substanzen eine denkbare Alternative sein. Darüber hinaus kann die Isolierung und Identifizierung der aktiven Substanzen aus Pflanzenex-

trakten zu neuartigen Wirkstoffen führen, die synthetisch hergestellt werden könnten. Hier stellen auch solche Pflanzen eine interessante Quelle für Wirkstoffe dar, deren Inhaltsstoffe bereits aufgrund ihrer Verwendung in der Naturheilkunde bekannt sind, wie beispielsweise die in eigenen Versuchen verwendeten Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta*. Es wurde jedoch deutlich, daß es sich bei den aktiven Substanzen um andere Wirkstoffe handelt als die in der Humanmedizin beschriebenen.

Natürlich vorkommende Stoffe haben den Vorteil, daß sie sozusagen in der Natur bekannt und daher vollständig abbaubar sind. Auch mit einer Akkumulation im Boden oder im Trinkwasser ist nicht zu rechnen (KOWALEWSKI & SCHMITT, 1993). Nach FUGMANN *et al.* (1991) sind jedoch nur wenige chemische Substanzen für den Menschen so giftig wie Naturstoffe. Von 370 als giftig eingestuften Verbindungen waren neben den synthetischen Kampfstoffklassen fast die Hälfte der Verbindungen Naturstoffe. Auch die Behauptung, daß für alle Naturstoffe schnelle Abbauewege existieren, ist ihrer Meinung nach nicht richtig. So ist ein Teil der jährlichen Pflanzenproduktion relativ schwer abbaubar und häuft sich langsam zu Humus- und Torfschichten auf (FUGMANN *et al.* 1991). Nach AMES *et al.* (1990) ist eine Bioakkumulation von Naturstoffen durchaus denkbar, ähnlich wie es beispielsweise beim synthetischen Wirkstoff DDT bekannt ist. Naturstoffe aus Kartoffelpflanzen, wie Solanine und Chaconine, inhibieren Cholinesterasen, sind persistent und zudem teratogen. Aufgrund dieser Tatsache wurde eine krankheitsresistente Kartoffelsorte mit einem hohen Anteil der genannten Substanzen in den Blättern wieder vom Markt zurückgezogen (JESPERS & DE WAARD, 1993). Aus diesen kontroversen Berichten wird deutlich, daß auch für Naturstoffpräparate, genauso wie es bei synthetischen Wirkstoffen der Fall ist, eine Zulassung erfolgen sollte. Hier müßten Untersuchungen über das toxikologische und ökotoxikologische Potential der Substanzen sowie ihr Abbauverhalten im Boden abgewogen, und auf ihre Unbedenklichkeit geprüft werden. Andererseits könnte gerade die chemische Synthese von interessanten Naturstoffanalogen einen Weg darstellen, um Probleme der Ursprungssubstanz zu beheben. Hier bietet sich die Möglichkeit, z.B. toxikologisch bedenkliche Substanzen durch die Veränderung ihrer Molekülstruktur zu verbessern.

Die Diskrepanz zwischen der hohen Anzahl bekannter Naturstoffe und der geringen Anzahl kommerzieller Produkte auf Naturstoffbasis erklärt sich dadurch, daß Pflanzenmaterial häufig nicht in ausreichender Menge und meist nicht das ganze Jahr über verfügbar ist. Die Menge und Art an pflanzlichen Inhaltsstoffen kann weiterhin stark von verschiedenen Umweltbe-

dingungen beeinflußt werden. Außerdem ist die Isolierung der aktiven Reinsubstanzen in der Regel beträchtlich teurer als die Herstellung von synthetischen Produkten. Darüber hinaus ist die biologische Aktivität und Stabilität von Naturstoffen im Freiland oft geringer. Bei der Verwendung von Rohextrakten als Pflanzenschutzmittel können Probleme bei der Standardisierung und der Toxizität auftreten, so daß die geforderten Voraussetzungen für eine Registrierung oft schwer, oder gar nicht zu erfüllen sind (KRAUSE, pers. Mitt.). Die häufig sehr komplexe Struktur der Moleküle aus Naturstoffen erschwert zudem eine chemische Synthese (JESPERS & DE WAARD, 1993). Dennoch stellt die Isolierung aktiver Substanzen aus Pflanzen eine vielversprechende Methode zur Auffindung von Molekülen da, die aufgrund ihrer neuartigen Wirkungsweise bzw. Molekülstruktur einen Weg zu neuen Leitstrukturen aufzeigen.

Obwohl in der Literatur eine beträchtliche Anzahl an wirksamen Naturstoffen beschrieben ist (REIMERS *et al.* 1993; LATTEN 1994; PASTER *et al.* 1996), und ein in den letzten Jahren zunehmendes Interesse an Naturstoffen besteht, ist es oft schwierig, auf bestehenden Ergebnissen aufzubauen oder interessante Substanzen in die Praxis zu überführen. Dies ist meist auf zu hohe Aufwandmengen, auf unzureichende Charakterisierung der Wirkung, auf nicht untersuchte Wirksamkeit *in vivo* und im Freiland sowie unbekanntem toxikologischen Daten der Substanzen zurückzuführen.

In den hier dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, daß die Untersuchung von Pflanzenextrakten zu interessanten Rohextrakten führte, die sich in ihrem Wirkspektrum und ihrer Wirkungsweise deutlich unterscheiden. Das Extraktionsverfahren, sowie die Wahl der Untersuchungsmethode hatten einen entscheidenden Einfluß auf die Auffindung aktiver Extrakte. Neben einer guten Wirkdauer und Wirksamkeit konnte durch die Applikation der Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* auch unter Freilandbedingungen eine deutliche Befallsreduktionen von phytopathogenen Pilzen an Kulturpflanzen erzielt werden. Weiterhin zeigte sich, daß die bekannten wertbestimmenden Inhaltsstoffe von *S. officinalis* nicht für die fungizide Wirkung des Extraktes verantwortlich sind. Neben diesen schon beschriebenen Substanzen, liegen folglich noch weitere biologisch aktive Moleküle in dem pflanzlichen Extrakt vor, die ihrerseits für die fungizide Wirksamkeit verantwortlich sind. Aufgrund dieser Tatsache läßt sich ableiten, daß auch ‚bekannte‘ Pflanzenarten bzw. deren Inhaltsstoffe eine erfolgversprechende Quelle für neuartige Substanzen darstellen, da sich unter den bereits bekannten Substanzen noch weitere biologisch aktive Inhaltsstoffe befinden können.

5 Zusammenfassung

Pflanzen weisen aufgrund ihres Sekundärstoffwechsels ein außerordentlich großes Reservoir an Molekülen auf, die zum Schutz von Pflanzen gegenüber phytopathogenen Pilzen genutzt werden können. Ziel der Arbeit war es, Pflanzenextrakte zu identifizieren, die auf Grund ihrer fungiziden Wirkung zur Bekämpfung von pilzlichen Erregern genutzt werden können. Von besonderem Interesse war hierbei neben der Wirksamkeit auch die Überprüfung der Aktivität im Freiland, die Charakterisierung der Wirkungsweise sowie die Isolierung aktiver Substanzen.

1. In den Untersuchungen konnte eine Reihe von wirksamen äthanolischen Pflanzenextrakten gegenüber den Pathogenen *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Plasmopara viticola*, *Uromyces phaseoli* und *Erysiphe graminis* identifiziert werden. Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Aktivität gegenüber den verschiedenen Entwicklungsstadien der Erreger und in Abhängigkeit der Prüfmethode. *In vitro* bewirkten wesentlich mehr Extrakte eine deutliche Reduktion des Myzelwachstums als *in vivo* eine Befallsreduktion an der Pflanze von über 80 Prozent. Gegenüber den unterschiedlichen Erregern ließ sich eine deutliche Selektivität der Wirksamkeit der Extrakte beobachten. Als besonders wirksam gegenüber Oomyceten und *B. cinerea* erwiesen sich Behandlungen mit den Extrakten aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta*.
2. In Freilanduntersuchungen konnte die gute Wirksamkeit der Extrakte bestätigt werden. Applikationen der Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* bewirkten an Kartoffelpflanzen auch bei starkem Infektionsdruck eine Reduktion von *P. infestans* sowie einen deutlichen Mehrertrag. Durch die Behandlung mit dem Extrakt aus *S. officinalis* konnte gegenüber *P. viticola* an Weinreben eine ähnliche Wirksamkeit erzielt werden wie mit einer alternierenden Behandlung mit konventionellen Fungiziden.
3. Hervorragende befallsreduzierende Wirkungen ließen sich nur bei protektiver Applikation der Pflanzen mit den Extrakten beobachten. Untersuchungen zur Systemizität der Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* zeigten, daß keine Verlagerung der Wirksamkeit in der Pflanze zu beobachten war. Durch die Verwendung von Netzmitteln und Linolsäure zur Förderung der Penetration konnte weder die Wirksamkeit noch die Systemizität der Extrakte beeinflußt werden.

4. Neben direkten fungiziden Effekten ließen sich auch resistenzinduzierende Eigenschaften von Pflanzenextrakten beobachten. Applikationen der Extrakte aus *Trigonella foenum-graecum* und *Salix* spp. zeigten die für Resistenzinduktoren typische Abhängigkeit der Wirkung von dem Zeitintervall zwischen Behandlung und Infektion mit dem Erreger. Behandlungen zwei bzw. fünf Tage vor der Inokulation bewirkten in den Wirt-Pathogen-Modellen *P. infestans* an Tomate und *P. viticola* an Weinrebe deutlich höhere Befallsreduktionen als Applikationen vier Stunden vor der Inokulation mit den Erregern. Im Wirt-Pathogen-Modell *B. cinerea* an Paprika konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.
5. Untersuchungen zum Einfluß der Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* auf unterschiedliche Entwicklungsstadien pilzlicher Erreger ließen unterschiedliche Wirkungsweisen erkennen. Während der Extrakt aus *S. officinalis* Schlupf, Beweglichkeit und Keimung der Zoosporen von Oomyceten stark reduzierte, bewirkten Behandlungen mit dem Extrakt aus *P. erecta* eine deutliche Hemmung des Myzelwachstums von *P. infestans* und *P. viticola*. Gegenüber *Botrytis cinerea* ließ sich bei keinem der Extrakte ein Einfluß auf die Sporenkeimung beobachten. Das Myzelwachstum des Erregers wurde hingegen von beiden Extrakten deutlich beeinflusst.
6. In mikroskopische Untersuchungen wurde der Einfluß des Extrakts aus *P. erecta* auf das Myzel von *P. infestans* näher untersucht. Behandlungen ab einer Konzentration von 0,05 Prozent bewirkten eine deutliche Stauchung sowie eine starke Verzweigung des Myzels.
7. Elektronenmikroskopische Bilder verdeutlichten, daß Applikationen des Extraktes aus *P. erecta* starke Veränderungen an den Zellen von unterschiedlichen Pathogenen hervorrufen. An Hyphen von *P. infestans* ließen sich bereits ab Konzentrationen von 0,01 Prozent neben einer starken Vakuolisierung des Cytoplasmas auch deutliche Degenerationserscheinungen der Zellen beobachten. Dies führte in einigen Fällen zu einem vollständigen Absterben der Hyphen. An den Hyphen von *A. solani* und *B. cinerea* verursachte der Extrakt eine starke Vakuolisierung des Cytoplasmas sowie Zellwandverdickungen und -ablösungen. Daneben zeigte sich bei *B. cinerea*, daß in abgestorbenen Zellen neue Pilzstrukturen gebildet werden. Dies verdeutlicht, daß es sich bei dem Einfluß des Extraktes aus *P. erecta* um eine fungistatische Wirkung handelt.
8. Untersuchungen zur Optimierung des Extraktionsverfahrens zeigten, daß die Extraktion bei 60 °C unter Verwendung von 70 %-igem Äthanol als Lösungsmittel die höchste

Ausbeute an wirksamen Inhaltsstoffen ergab. Extrakte aus *Cinnamomum camphora*, die bei Temperaturen von 90 °C oder in der Soxhlet - Apparatur extrahiert wurden, wiesen eine deutlich geringere Wirksamkeit auf, als die die bei niedrigeren Temperaturen im Wasserbad extrahiert waren.

9. Die Überprüfung bekannter Inhaltsstoffe von *S. officinalis* auf ihr Vorkommen im Extrakt sowie ihre Wirksamkeit gegenüber phytopathogenen Pilzen ergab, daß keine dieser Substanzen für die Wirksamkeit des Extrakts verantwortlich war. Dies verdeutlicht, daß neben den bekannten Inhaltsstoffen noch weitere Substanzen in dem Extrakt vorliegen, die für die gute Wirksamkeit gegenüber pilzlichen Erregern verantwortlich sind.
10. Zur Isolierung der wirksamen Inhaltsstoffe erfolgte eine Dünnschichtchromatographie des Extrakts mit anschließender Bioautographie. Dabei konnten drei aktive Bereiche identifiziert werden. Anschließende analytische Untersuchungen mittels HPLC und GC - MS bestätigten, daß es sich bei den drei isolierten Bereichen um unterschiedliche Substanzmischungen handelt. Weiterhin zeigte sich, daß die Anzahl der Substanzen in den Fraktionen unterschiedlich war. Eine Identifizierung der aktiven Substanzen konnte weder anhand ihrer UV - Spektren noch aufgrund ihrer Massenspektren durchgeführt werden. Dennoch zeigte sich auch in diesen Untersuchungen, daß es sich bei den aktiven Substanzen um bisher noch nicht beschriebene Inhaltsstoffe handelt.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen das Potential von Pflanzenextrakten zur Auffindung von aktiven Substanzen. Pflanzliche Metabolite könnten einerseits als Leitstrukturen für neuartige fungizide Wirkstoffe, andererseits aber auch als Resistenzinduktoren genutzt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß auch in bereits untersuchten Pflanzen Substanzen vorkommen können, die bisher noch nicht auf ihre Eignung als Pflanzenschutzmittel bewertet wurden.

6 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, W. S., 1925:** A method of computing the effectiveness of an insecticide. - J. Econ. Entomol, 18, 265-267.
- ABELSON, P. H., 1990:** Medicine from plants. - Science (USA). 247, p. 513.
- ADAMS S., 1996:** Untersuchungen über physiologische Wirkungsmechanismen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe bezüglich der morphologischen Veränderungen ausgewählter Schimmelpilze. - Diss Universität Bonn.
- ALBERT, G., THOMAS, A., & GUEHNE, M., 1991:** Fungicidal activity of Dimethomorph on different stages in the life cycle of *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola*. – ANPP –Third International Conference on Plant Diseases, Bordeaux.
- ARGÜL, A., & MIVANC, M., 1989:** Sensitivity of four foodborne moulds to essential oils from Turkish spices, herbs and citrus peel. – J. Sci. Fd. Agric.. 47, 129-132.
- AMES, B. N., PROFET, M., & GOLD, L. S., 1990:** Nature's chemicals and synthetic chemicals: comparative toxicology. Proceedings of National Academy of Sciences USA 87. 7782-7786.
- ANKE, T. & STEGLICH, W., 1988:** Neue Wirkstoffe aus Basidiomyceten. - Forum Mikrobiologie, 2, 21-25.
- ASTHANA, A., DIXIT, K. & KISHORE, N., 1988:** Toxicity of citral and eugenol against some storage fungi. - Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz, 24, 417-421.
- BENNER, J. P., 1993:** Pesticidal compounds from higher plants. – Pestic. Sci. 39, 95-102.
- BIANCHI, A., 1997:** Ultrastructural studies of the effect of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*. – Plant Disease. 81, 1241-1246.
- BLAESER, P.; & STEINER, U. 1998a:** Antifungal activity of plant extracts against potato late blight (*Phytophthora infestans*). - 12th International Reinhardsbrunn Symposium, In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds II (Lyr, H., Russell, P. E., Dehne, H.-W., & Sisler, H. D.), p. 491-500.
- BLAESER, P.; STEINER, U. & DEHNE, H. W., 1998b:** Fungizide Wirkstoffe aus Pflanzen. – Mitt. a. d. Biol. Bundesanst. 357, 167.
- BRENNER; J. P., (1993):** Pesticidal compounds from higher plants. - Pesticid Sciene. 39, 95-102.

- BRUCK, R. I., FREY, W. E., & APPLE, A. E., 1980:** Effect of metalaxyl, an acylalanine fungicide, on developmental stages of *Phytophthora infestans*. – *Phytopathology* 70, 597-601.
- BICKERS, U., 1997:** Einfluß von Formulierung und Ausbringung auf die Wirksamkeit von Pflanzenschutzmitteln. - Diss. Universität Bonn
- BIRATU, T., OMONDI, C. & HINDORF, H., 1996:** Caffeine content in relation to resistance of *Coffea arabica* L. to coffee berry disease (*Colletotrichum coffeanum* Noack). - *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz.* 103, 15-19.
- BUCHENAUER, H., 1996:** Tendenzen in der Entwicklung neuer Wirkstoffe mit antifungalen Eigenschaften aus Naturstoffen. - *Mitt. Biol. Bundesanst.* 321, 487.
- BURCK, H.C., 1973:** Histologische Technik. - Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- CASPERSON, G. & LYR, H., 1982:** Wirkung von Pentachlornitrobenzol (PCNB) auf die Ultrastruktur von *Mucor mucedo* und *Phytophthora cactorum*. - *Z. Allg. Mikrobiol.* 22, 219-226.
- CASTOR, A. S.; & TOME, M. E. P., 1998:** *In vivo* effect of makabuhay (*Tinospora rumphii*) stem extract on mango anthracnose pathogens (*Colletotrichum gloeosporoides* Penz). – *Philippine Journal of Crop Science.* 23, p. 92.
- CHOWDHURY, A., MUKHERJEE, N., & ADITYACHAUDHURY, M., 1974:** Sensitivity of some plant pathogenic fungi towards plant metabolites: Antifungal activity of some chalcones, dihydrochalcones and flavanones. - *Experienta* 30, 1022-1024.
- CHUNG, I. L. L. MIN., MILLER, D. A., & CHUNG, I. M., 1995:** Natural herbicide potential of alfalfa residue on selected weed species. – *Agronomy Journal.* 87, 920-925.
- CLOUGH, M. J., & GODFREY, C. R. A., 1998:** The strobilurin Fungicides. In: *Fungicidal Activity* (Hutson, D., & Miyamoto, J.). Chemical and biological approaches to plant protection. pp. 87-108.
- COHEN, Y., GISI, U., & MOSINGER, E., 1991:** Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. – *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38, 255-263.
- COHEN, Y., 1994:** Local and systemic control of *Phytophthora infestans* in tomato plants by DL-3-amino-n-butanoic acid.- *Phytopathology* 84, 55-59.
- CRUTE, I. R., 1979:** Lettuce mildew – Destroyer of quality. – *Agric. Res. Counc. (U.K.) Res. Rev.* 5,9-12.

- DELLAR, J. E., COLE, M. D., GRAY, A. I., GIBBONS, S., & WATERMAN, P. G., 1994:** Antimicrobial sesquiterpenes from *Prostanthera* aff. *melissifolia* and *P. rotundifolia*. - *Phytochemistry*. 36, 957-960.
- DALTON, A.J., 1955:** A chrome-osmium fixative for electron microscopy. - *Ant. Rec.* 121, 281.
- DAVIDSE, L. C., 1995:** Phenylamide fungicides – Biochemical action and resistance. In: *Modern selective fungicides* (Lyr, H.). - 2nd Edition. - Gustav Fischer Verlag, New York. 347-352.
- DERCKX, W., 1984:** Untersuchungen zu den Wirkungsmechanismen von Aluminiumfosetyl bei verschiedenen *Phytophthora* – Arten *In vitro* sowie in den Pathogen-Wirt-Beziehungen *Phytophthora infestans* – Erdbeere, *Plasmopara viticola* – Weinrebe. - Diss. Universität Bonn.
- DEY, P. M., HARBORNE, J. B., 1991:** *Methods of Plant Biochemistry*. - Academic Press, London. Volume 6.
- EDLICH, W.; & LYR, H., 1995:** Mechanism of action of dicarboximide fungicides. – In: *Modern selective fungicides* (Lyr, H.). - 2nd Edition. - Gustav Fischer Verlag, New York. 119-131.
- ELMER, H. W., MATTINA, M. J. I. & MAC EACHERN, G., 1994:** Sensitivity of plant pathogenic fungi to taxane extracts from ornamental yews. - *Phytopathology Society*, 84, 1179-1185.
- EL-GHAOUTH, A., WILSON, C., & WISNIEWSKI, M. E., 1995:** Sugar analogs as potential fungicides for postharvest pathogens of apple and pear. - *Plant Disease* 79, 254-258.
- EL-GHAOUTH, A., WILSON, C., & WISNIEWSKI, M. E., 1997:** Antifungal activity of 2-Deoxy-D-glucose on *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Rhizopus stolonifer*: Ultrastructural and cytochemical aspects. - *Phytopathology*. 87, 772-779.
- EVANS, D. A. & LAWSON, K. R., 1992:** Crop protection chemicals - research and development perspectives and opportunities. - *Pestic. Outlook*, 3, 10-17.
- FAVARON, F., CASTIGLIONI, C. & DI-LENNA, P., 1993:** Inhibition of some rot fungi polygalacturonases by *Allium cepa* L. and *Allium porrum* L. extracts. - *J. Phytopathology*, 201-206.
- FARAG, R. S., DAW, Z. Y., HEWEDI, F. M. & EL-BAROTY, G. S. A., 1989A:** Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. – *J. Fd. Prod.* 52, 665-667.

- FARAG, R. S., DAW, Z. Y. & ABO-RAYA. S. H., 1989B:** Influence of some spice oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of Aflatoxin in synthetic medium. - J. Fd. Sci.. 54, 74-76.
- FRIEDLAND, J., 1997:** Arzneiformenlehre für pharmazeutisch-technische Assistenten. - Gustav Fischer Verlag, Frankfurt.
- FRIEDRICH, L., LAWTON, K., RUESS, W., MASNER, P., SPECKER, N., GUT RELLA; M., MEIER, B., DINCHER, S., STAUB, T., UKNES, S., KESSMANN, H. & RYALS, J., 1996:** A Benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. Plant J. 10, 61-70
- FROHNE, D., & JENSEN, U., 1992:** Systematik des Pflanzenreichs. - Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. 4 Auflage.
- FUGMANN, B., LIEB, F., MOSCHLER, H., NAUMANN, K., & WACHENDORF, U., 1991:** Natürliche Pflanzenschutzwirkstoffe. Teil I: Eine Alternative zu synthetischen Pflanzenschutzmitteln ?. – Chemie in unserer Zeit. 6, 317-330.
- GÄRTEL, W., 1967:** Schalen-Diffusionstest zur Prüfung der Wirksamkeit von Fungiziden gegen *Botrytis cinerea*. - Weinberg und Keller 14, 410-413.
- GIBBONS, S., & GRAY, A. I., 1998:** Isolation by planar chromatography. In: Natural products isolation. (R. J. P. CANNELL). – Humana Press Inc. New Jersey. p. 209-246.
- GLOGER., K., 1995:** Pflanzliche Rohextrakte und Pflanzeninhaltsstoffe mit nematizider Wirkung gegen *Xiphinema index* Thorne & Allen 1950 und *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood 1949. – Diss. Universität Hohenheim
- GORRIS, L. G. M., & SMID, E. J., 1995:** Crop protection using natural antifungal compounds. – Pest. Outlook. 10, 20-24.
- GÖRLACH, J., VOLRATH, S., KNAUF-BEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K. H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H., & RYALS, J., 1996:** Benzothiadiazole, a novel class of inducer of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell. 8, 629-643.
- GROVE, S. N., & BRACKER, C. E., 1970:** An ultrastructural basis of hyphal tip growth in *Pythium ultimum*. – Am J. Bot. 57, 245-266.
- GRÄFF, S., HERGER, G., LORENZ, G., MANGOLD, D., POMMER, E.-H., SCHERER, M. & KLINGAUF, F., 1990:** Die Wirkung ätherischer Öle und weiterer leichtflüchtiger Naturstoffe auf verschiedene Schadpilze. - Mitt. Biol. Bundesanst. 266, 220.

- GROHMANN, U., & HOFFMANN, G. M., 1982:** Licht- und Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Wirkung von Metalaxyl bei *Pythium*- und *Phytophthora*- Arten. – Z. Pflkrankheiten Pfschutz 89, 435-446.
- GULATI, M. K., KOCH, E., & ZELLER, W., 1998:** Isolation and identification of antifungal methabolites produced by fluorescent *Pseudomonas*, antagonist of red core disease of strawberry. In: Modern fungicides and antifungal compounds II (Lyr. H., Russell. P. E., Dehne. H.-W., & Sisler. H. D.). Intercept, Andover. p. 437-444.
- HEDIN, P. A., & WAAGE, S. K., 1986:** Roles of flavonoids in plant resistance to insects. In: Plant Flavonoids in Biology and Medicine (Cody, V., Middleton, Gr. E., Harborne, J. B., & Alan, R.). New York, pp. 87-100.
- HERGER, G., KLINGAUF, F., POMMER, M. D. & SCGERER, M., 1988:** Die Wirkung von Auszügen aus Sachalin-Staudenknöterich, *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt Nakai, gegen Pilzkrankheiten, insbesondere Echte Mehлтаupilze. - Nachrichtenblatt d. Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 40, 56-60.
- HERGER, G., 1991:** Die Wirkung von Auszügen aus dem Staudenknöterich *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai gegen Pilzkrankheiten, insbesondere Echte Mehлтаupilze. – Diss. Universität Darmstadt.
- HIPPE, S., & GIESEN, U., 1987:** The effect of triadimenol on the cytology and growth of sensitive and resistant strains of *Ustilago avenae*. - Annals of Applied Biology. 112, 79-90.
- HIRANO, M., 1989:** Characteristics of pyrethroide for insect pest control in agriculture. – Pesti. Sci. 27, 353.
- HITOKOTO, H., MOROZUMI, S., WAUKE, T., SAKAI, S., & KURATA, H., 1980:** Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. - Appl. Environ. Microbiol. 39, 812-822.
- HILDEBERT, W., 1993:** Pharmazeutische Biologie, Drogen und ihre Inhaltsstoffe. - Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- HOFFMANN, G. M., NIENHAUS, F., POEHLING, H.-M., SCHÖNBECK, F., WELTZIEN, H. C., & WILBERT, H., 1994:** Lehrbuch der Phytomedizin. - 3 Auflage. Blackwell Wissenschafts Verlag. Berlin.
- HOLT, R. J., 1975:** Laboratory tests of antifungal drugs. - J. Clin. Pathol. 28, 767-774.
- HOMANS, A. L., & FUCHS, A., 1970:** Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. - J. Chromatogr. 51, 327-329.

- HOSTETTMANN, K., 1991:** Assay for bioactivity. – In: Methods in plant biochemistry (Dey, P. M., & Harborne J. B.), Galliard Ltd., Academic Press, London
- HOSTETTMANN, K., & MARSTON, A., 1994:** Search for new antifungal compounds from higher plants. - Pure Appl. Chem. 66, 2231-2234.
- JAGLAN, M. S., KHOKHAR, K. S., MALIK, M. S., & TAYA, J. S., 1997:** Standardization of method for extraction of bioactive components from different plants for insecticidal property. - Indian-Journal-of-Agricultural-Research. 31, 167-173.
- JESPERS, A. B. K., & DE WAARD, M. A., 1993:** Natural products in plant protection. Neth. J. Pl. Path. 99, 109-117.
- JEYARAJAN, R., DORAISWAMI, R., BHASKARAN, R., & JAYARAJ, S., 1986:** Effect of Neem and other plant products in the management of plant disease in India. - Proc. 3rd. Int. Neem Conf., Nairobi, 635-644.
- JOCHOVA, J., RUPES, I., & PEBERDY, J. F., 1993:** Effect of the microtubule inhibitor benomyl on protein secretion in *Aspergillus nidulans*. - Mycol. Res. 97, 23-27.
- KABARA, J. J., & EKLUND, T., 1991:** Organic acids and esters. In: Food Preservatives. N. J. Russel & G. W. Gould (Eds.), Blackie, Glasgow & London. 200-214.
- KARAPINAR, M., 1985:** The effect of citrus oils and some spices on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. - NRRL 2999. Int. J. Fd Microbiol. 2, 239-245
- KARAPINAR, M., 1990:** Influence of menthol and thymol on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. - Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.. 81, 287-295.
- KARNOVSKY, M. J., 1965:** A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. - Journal Cell. Biol. 27, 137-138
- KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMANN, C., MAETZKE, J., HERZOG, E., WARD, E., UKNES, S., & RYALS, J., 1994:** Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. – Annu. Rev. Phytopathol. 32, 439-459.
- KISHORE, N., DIXIT, S. N., & DUBEY, N. K., 1989:** Fungitoxic studies with *Chenopodium ambrosioides* for control of damping-off in *Phaseolus aureus* (Moong) caused by *Rhizoctonia solani*. – Tropical Science. 29, 171-176.
- KLINGAUF, F., & HERGER, G., 1985:** Die Wirkung von Pflanzenextrakten auf den Echten Mehltau an Wintergerste, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. - Mededel. Fac. Landbouwwetenschap. Rijksuniv. Gent. 50 (2b), 270-274.

- KLINKENBERG, H. J., & DEHNE, H. W., 1998b:** Comparative studies on oomycetes fungicides.) - 12th International Reinhardsbrunn Symposium, In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds II (Lyr, H., Russell, P. E., Dehne, H.-W., & Sisler, H. D.), in press.
- KNÜPPEL, P. C., LANTZSCH, R., & WOLLWEBER, D., 1992:** Synthesis of fungicidal phenylpyrroles. – Synthesis and chemistry of agrochemicals III, ACS-Symp. 504, 405-413.
- KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS, S., & SCHMITT, A., 1998:** Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. - Crop Protection. 17, Nr. 8, 649-656.
- KOWALEWSKI, A., 1992:** Die resistenzinduzierenden Inhaltsstoffe von *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai: Vorkommen, Charakterisierung und Wirkungsmechanismus. – Diss. Universität Darmstadt.
- KOWALEWSKI, A. & SCHMITT, A., 1993:** Pflanzenextrakte und ihre Verwendung in der Phytomedizin. - Gesunde Pflanze, 2, 43-47.
- KRASKA, T., 1996:** Vergleichende Untersuchungen von Resistenzinduktoren, deren Wirkungsweise und der Einfluß auf die DNS - Methylierung. Diss. Universität Hannover.
- KUHN, P. J., ALBERT, G., LOYNESS, L. E., LEE, S. A., & LINDSLEY, M. C., 1991:** Studies on the antifungal activity *In vitro* of dimethomorph, a novel fungicide active against downy mildews and *Phytophthora* . - 9th International Reinhardsbrunn Symposium, Modern fungicides and antifungal compounds. p. 229-238.
- KURT, H. B. 1997:** Pharmazeutische Technologie. – Gustav Fischer Verlag. Frankfurt.
- KURITA, N., MIYAJI, M., KURANE, R., & TAKAHARA 1981:** Antifungal activity of components of essential oils. - Agric. Biol. Chem. 45, 945-952.
- KWOK, D.; & SHETTY, K., 1998:** Effect of proline and proline analogs on total phenolic and rosmarinic acid levels in shoot clones of thyme (*Thymus vulgaris* L.). – Journal of food biochemistry (USA). 22 (1), 37-51.
- LAKSHMANAN, P., MOHAN, S., & JEYARAJAY, R., 1990:** Antifungal properties of some plant extracts against *Thanatephorus*, the causal agent of collar rot disease of *Phaseolus aureus*. - Madras Agricultural Journal 77, 1-4.

- LATTEN, J., 1994:** Biologische Bekämpfung phytopathogener Pilze mit Hilfe von Pflanzenextrakten. – Diss. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- LAWTON, K. A., FRIEDRICH, L., HUNT, M., WEYMANN, K., DELANEY, T., KESSMANN, H., STAUB, T., & RYALS, J., 1996:** Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* 10, 71-82.
- LEVEN, M., VANDEN BERGHE, D. A., MERTENS, F., VLIETINCK, A., & LAMMENS, E., 1979:** Screening of higher plants for biological activity I. Antimicrobial activity. - *Plant Medica* 36, 311-321.
- LYR, H., & CASPERSON, G., 1982:** Anomalous cell wall synthesis in *Mucor mucedo* (L.) Fres. induced by some fungicides and other compounds related to the problem of dimorphism. – *Z. Allg. Mikrobiol.* 22, 245-254.
- LYR, H., 1995:** Selectivity in modern fungicides and its basis. – In: modern selective fungicides (Lyr, H.). 2nd Edition. Gustav Fischer Verlag, New York. 13-22.
- MATTINA; M. J. I., BERGER, W. A. I., & DENSON, C. L., 1997:** Microwave-assisted extraction of taxanes from *Taxus* biomass. – *Journal of agricultural and Food Chemistry.* 45, 4691-4696.
- MENON, S., 1994:** Smelly success for sorghum's savoir. - *New Scientist*, 1950, 22.
- METRAUX, J. P., AHL, P., STAUB, T. H., SPEICH, J., STEINMANN, A., RAYLS, J., & WARD, E., 1991:** Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-Dichloro-Isonicotinic acid and pathogens. – In: *Advances in Molecular genetics of plant microbe interactions* (Hennecke, H., & Verma, D. P. S.). Vol. 1. Kluwer academic, Netherlands. 432-439..
- MICHEL, A., PETERSEN, J., DOGAN, M. N. & ERNST, V., 1999:** Anleitung zur Anlage und Auswertung von Versuchen zur Erstellung quantitativer Dosis-Wirkungsbeziehungen am Beispiel der Wirksamkeit von Herbiziden. - *Gesunde Pflanzen.* 51, 10-19.
- MILLS, P., & WOOD, R., 1984:** The effect of polyacrylic acid, acetylsalicylic acid on resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. – *Phytopath. Z.* 111, 209-216.
- MISHRA, DH., & MISHRA, D., 1990:** Seed protectant property of essential oil of *Zingiber officinale* Roscoe. – *Indian Perfumer.* 34, 266-268.
- MISRA, N., MISHRA, D. & RATHORE, A. 1989:** Fungitoxic properties of the needle of *Pinus roxburghii* against *Aspergilli* causing mycotoxicoses. - *Pesticides*, 23-25.

- MOLEYAR, V., & NARASIMHAM, P., 1986:** Antifungal activity of some essential oil components. – *Fd. Microbiol.* 3, 331-336.
- MORCK, H., 1997:** Drogenkunde für pharmazeutischtechnische Assistenten. – Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- MORRIS, E., 1986:** „The molecular genetics of microtubule proteins in fungi“. - *Experimental Mycology.* 10, 77-82.
- MOSCH, J., & KLINGAUF, F., 1989:** *In-vitro* Untersuchungen über die Wirkung von Pflanzenextrakten auf den Erreger des Feuerbrandes, *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* - Nachrichtenblatt für den Deutschen Pflanzenschutzdienst (Braunschweig). 41(8/9), 121-123.
- MOSCH, J., & ZELLER, W., 1989:** Bekämpfung des Feuerbrandes (*Erwinia amylovora*) mit ausgewählten Pflanzenextrakten. - Nachrichtenblatt für den Deutschen Pflanzenschutzdienst (Braunschweig). 41(8/9), 149-151.
- MOHAMED, S., SAKA, S., EL-SHARKAWY, S. H., ALI, A: M., & MUID, S., 1996:** Antimycotic screening of 58 malaysian plants against plant pathogens. - *Pestic. Sci.*, 47, 259-264.
- MÜLLER-RIEBAU, F., BERGER, B. & YEGEN, O., 1994:** Untersuchungen zur fungitoxischen Wirkung von etherischen Ölen aus türkischen Wildkräutern auf phytopathogene Pilze. -. *Mitt. Biol. Bundesanst* 301, 385.
- MÜLLER-RIEBAU, F., BERGER, B. & YEGEN, O., 1995:** Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey.- *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 43, 2262-2266.
- MÜLLER-RIEBAU, F., BERGER, B., YEGEN, O. & CAKIR, C., 1996:** Fungitoxische ätherische Öle in türkischen Wildkräutern: Einfluß von Standort und Jahreszeit auf Gehalt, Zusammensetzung und Konzentration der Inhaltsstoffe. - *Mitt. Biol. Bundesanst.* 321, 424.
- MÜLLER-RIEBAU, F., BERGER, B., YEGEN, O. & CAKIR, C., 1997:** Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. – *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 45, 4821-4825; 23 ref
- OERKE, E. C., DEHNE, H.-W., SCHÖNBECK, F. & WEBER, A., 1994:** Crop producton and crop protection, estimated losses in major food and cash crops. - Elsevier Science, Amsterdam.

- O'NEILL, T. M., & MANSFIELD, J. W., 1982:** Antifungal activity of hydroxyflavans and other flavonoids. - Trans. Br. Mycol. Soc. 79, 229-237.
- ONKAR, D., DHINGRA, PH. D., 1985:** Basic Plant Pathology Methods. - CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida P. 232
- ORTEGA, F., STEINER. U., & DEHNE, H. W., 1996:** Differentiation of SBI resistance and parasitic fitness components in german isolates of *Venturia inaequalis* (Cke.) with and interest of induced resistance for anti-resistance strategies. - Med. Fac. Landbouww. Uni. Gent, 61/2a, 413-423.
- ORTEGA, F., STEINER. U., & DEHNE, H. W., 1997:** Use of fungicide-resistance for the characterisation and differentiation of *Venturia inaequalis* strains – suitability for competitiveness studies. – In: Developments in plant Pathology; Diagnosis and identification of plant pathogens, Vol. 11. (Dehne, H.-W., Adam, G., Dickmann, M., Frahm, J., Mauler-Machnik, A., & Van Haltern. P.). Kluwer Academic Publishers, London. p. 329-332.
- PANDEY, C. M., SHARMA, R. J. & DIKSHIT, A., 1996:** Antifungal evaluation of the essential oil of *Cymbopogon pendulus* (Nees ex Steud.) Wats. Cv. Praman. - Flavour and Fragrance Journal. 11, 257-260.
- PASTER, N., MENASHEROV, M., RAVID, U. & KATZIR, I., 1996:** Control of molds attacking stored wheat grain using oregano essential oil and thymol, its major constituent. - *Phytoparasitica*, 6, 154.
- PILLMOOR., J. B., WRIGHT., K. & TERRY., A., 1993:** Natural Products as a Source of Agrochemicals and Leads for Chemical synthesis
- PINTO, C. M. F., MAFFIA, L. A., CASALI, D. W. V., & CARDOSO, A. A., 1998:** *In vitro* effect of plant leaf extracts on mycelial growth and sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*. *J. Phytopathology*. 146, 421-425.
- PLIMMER, J. R., 1993:** Regulatory problems associated with natural products and biopesticides. – *Pestic. Sci.* 39, 103-108.
- PRASAD, D., CADOGAN, B. L., 1992:** Influence of droplet size and density on phytotoxicity of tree herbicides. - *Ween Technology*. 6, 415-423.
- QASEM, R. J., & ABUBLAN, H. A., 1996:** Fungicidal activity of some common weed extracts against different plant pathogenic fungi. - *J. Phytopathology*, 144, 157-161.
- RAGSDALE, N. N., 1991:** Health and environmental associated with agricultural use of fungicides. USDA/ States National Agricultural Pesticide Impact Assessment

- Program (NAPIAP), Fungicide Assessment Profekt. – Dept. Of Agriculture, Washington, USA, 117.
- RAHALISON, L., HAMBURGER, M., HOSTETTMANN, K., MONOD, M., & FRENK, E., 1991:** A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem. Anol.* 2, 199-203.
- RATHMELL, W. G., & SMITH, D. A., 1980:** Lack of activity of selected isoflavonoid phytoalexins as protectant fungicides. – *Pestic. Sci.* **11**, 568-572.
- REICH, B., BUCHENAUER, H., BUSCHHAUS, H., & WENZ, M., (1992):** Wirkungsweise von Propamocarb gegenüber *Phytophthora infestans*. - *Mitt. Biol. Bundesanstalt Land- und Forstwirtsch.* 266, 423.
- REICH, B., 1994:** Zur Wirkung von Propamocarb-Hydrochlorid auf *Phytophthora infestans* an Kartoffeln und Tomaten. - Diss. Universität Hannover.
- REIMERS, F., SMOLKA, E. S., WERRES, S., PLANK - SCHUMANN, K. & WAGNER, G., 1993:** Effect of ajoene, a compound derived from *Allium sativum*, on phytopathogenic and epiphytic microorganisms. - *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz.* 100, 623-633.
- REYNOLDS, E. S., 1963:** The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. - *J. Cell. Biol.* 17, 208-212.
- RIOS, J. L., RECIO, M. C., & VILLAR, A., 1988:** Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literatur. *J. Ethnopharmacol.* 23, 127-149.
- ROVESTI, L. S., MARCO, D. I. & PANCALDI, D., 1992:** Effect of neem kernel extract on some phytopathogenic fungi under greenhouse conditions. - *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz.* 99, 293-296.
- RUESS, W., KUNZ, W., STAUB, T., MÜLLER, T., POPPINGER, N., SPEICH, J., & AHL GOY, P., 1995:** Plant activator CGA 245704, a new technology for disease management. - *Proc. XIII IPPC, The Hague.*
- RUESS, W., MÜLLER, K., KNAUF-BEITNER, G., & STAUB, T., 1996:** Plant activator CGA 245704: An innovative approach for disease control in cereals and tobacco. - *Proc. Bright. Crop Prot. Conf.* 53-60.
- SCHMID, O. & HENGELER, S., 1984:** *Biologischer Pflanzenschutz im Garten.* - Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- SCHOLZ, K., VOGT, M., & KUNZ, B., 1998:** Application of plant extracts for controlling fungal infestation of grains and seeds during storage. - 12th International

- Reinhardsbrunn Symposium, In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds II (Lyr, H., Russell, P. E., Dehne, H.-W., & Sisler, H. D.), p. 429-435.
- SCHÖNBECK, F., STEINER, U., & KRASKA, T., 1993:** Induced resistance: criteria, mechanisms, practical application and estimation. - Z. Pfl.krank. Pfl.schutz, 100, 541 -557.
- SCHULZ, M., FRIEBE, A., KÜCK, P., SEIPEL, M., & SCHNABEL, H., (1994):** Allelopathic effect of living Quackgrass (*Agropyron repens* L.). Identification of inhibitory allelochemicals exuded from rhizome borne roots. - Angew. Bot. 68, 195 -200.
- SCHWINN, F. J., & STAUB., T 1987:** Phenylamides and other fungicides against oomycetes, . In: Modern selective fungicides (Lyr, H.). - Gustav Fischer Verlag, p. 259-273.
- SCHWINN. F., & STAUB. T., (1995):** Oomycetes fungicides. In: Modern selective fungicides. (LYR. H. ed.). - Gustav Fischer Verlag, 323-354
- SHAHI, S., SHUKLA, C. A. & DIKSHIT, A., 1996:** Fungitoxicity of the essential oil of *Eucalyptus* spp against the *Erysiphe cichoracearum* powdery mildew pathogen. - J. of Essential Oil Research. im Druck.
- SINGH. U. P., & CHAUHAN. V. B., (1992):** Effect of ajoene, a compound derived from garlic (*Allium sativum*), on *Phytophthora drechsleri* F. Sp. Cajani. - Mycologia 84(1), 105-108.
- SINGH. U. P., PANDEY.V. N., WAGNER. K. G., & SINGH. K.P., (1990):** Antifungal activity of ajoene, a constituent of garlic (*Allium sativum*). – Can. J. Bot. 68, 1354-1356.
- SITTE, H., 1982:** Ultramikrotomie, - Häufige Probleme und Fehler. Supplement Mikroskopie / Elektronenmikroskopie. - GIT Lab. Med. 9-32.
- SITTE, H., 1985:** Ultramikrotomie. - mta-journal extra 10, 9-25.
- SKIPP, R. A., SELBY, C., & BALEY, J. A., 1977:** Toxic effects of phaseollin on plant cells. - Physiol. Plant Path. 10, 221-227.
- SNOEK, H., 1984:** Naturgemäße Pflanzenschutzmittel, Anwendung und Selbstherstellung. - Pietsch Verlag, Stuttgart.
- SPURR. A. R., 1969:** A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. - J. Ultrastructure Research 26, 31-43.
- STAUB, T., Goy, A., & KESSMANN, H., 1992:** Chemically induced disease resistance in plants. – Proc. 10th Int. Symp. On systemic fungicides and antifungal compounds. Reinhardsbrunn, 1992. Lyr, H and Polter, C. (eds.). 239-249.

-
- STEDEN, C., 1992:** Untersuchungen zum Einfluß der Tropfengröße auf die Belagsbildung und die biologische Wirksamkeit gegen *Oidium tuckeri* Berk. An Reben. - Geisenheimer Berichte, Band 11.
- STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D., GROTHAUS, P., & BIGNAMI, E., 1995:** The search for a taxol producing micro-organism among the endophytic fungi of the Pacific yew *Taxus brevifolia*. - J. Nat. Prod. 58, 1315-1324.
- STILLE, B., 1965:** Das Keimverhalten der Sporangien von *Phytophthora infestans* in Abhängigkeit von Temperatur- und Hydraturbedingungen. - Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 72, 193-200.
- SU, H. C. F., 1991:** Laboratory evaluation of toxicity of calamus oil against four species of stored-product insects. – Journal of Entomological Science. 26, 76-80.
- THOMPSON, D. P., CANNON, C., PARTER, G., & TSEFAMICHAEL, T., 1987:** Mycoassay of fluorescent fractions from seven essential oils. – Bull. Environ. Contam. Toxicol.. 39, 688-695.
- TRIPATHI, S. C., SINGH, S. P., & DUBE, S., 1986:** Studies on antifungal properties of essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague. – J. Phytopath. 116, 113-120.
- UESUGI, Y., 1998:** Fungicide classes: Chemistry, uses and mode of action. – Fungicidal activity (Huston, D., & Miyamoto, J). Wiley. Chichester. 23-56.
- VOKOU, D., & MARGARIS, N. S., 1988:** The composition of terpens by soil microorganisms. – Pedobiologia 31, 413-417.
- WAGNER, H., 1993:** Pharmazeutische Biologie - Drogen und deren Inhaltsstoffe. - Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. 5 Auflage.
- WAGNER, J. L. & FLORES, E. H., 1994:** Effect of taxol and related compounds on growth of plant pathogenic fungi. - Phytopathology Society, 84, 1173-1178.
- WAGNER, H. & BLADT, S., 1997:** Plant drug analysis. – Springer Verlag. Second Edition.
- WALTER, H., NAU, K. L., & WELKER, O., 1977:** Pflanzenspezifische Anforderungen an Spritzflüssigkeit und Applikation. - Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz (SH VIII), 317-328.
- WALTERS, D. R., VONDRACKOVA, P. S., & MUSILEK, V., 1993:** The induction of systemic resistance in barley to powdery mildew infection using salicylates and various phenolic acids. – Ann. Appl. Biol. 122, 451-456.

- WEIDENBÖRNER, M., HINDORF, H., WELTZIEN, H. C., & JHA, H. C., 1992:** Aneffective treatment of legume seeds with flavonoids and isoflavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. *Seed Sci. & Technol.* 20, 447-463.
- WEIDENBÖRNER, M., & JHA, H. C., 1993:** Antifungal activity of flavonoids and their mixtures against different fungi occurring on grain. *Pesticide Science*. 38, 347-351.
- WIESENAUER, M., & WIDMAIER, W., 1991:** *Arzneipflanzen*. – Bionorica GmbH, Neumarkt/Opf.
- WOHLFAHRT-BOTTERMANN, K.E., 1957:** Die Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung an ultradünnen Schnitten. - *Naturwiss.* 44, 287-288.
- YAMAGUCHI, I., 1998:** Natural Product-derived fungicides as exemplified by the antibiotics. – In: *Fungicidal Activity. Chemical and biological approaches to plant protection* (Hutson, D., & Miyamoto, J.). Wiley, New York. p. 57-86.
- YEGEN, O., BERGER, B., & HEITEFUSS, R., 1992:** Untersuchungen zur fungitoxischen Wirkung der Extrakte sechs ausgewählter Pflanzen aus der Türkei auf phytopathogene Pilze. - *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 99, 349-359.
- YPEMA., H. L., & GOLD., R. E., 1999:** Kresoxim-methyl: Modification of a Natural Occurring Compound to Produce a New Fungicide. – *Plant disease*. 83, 4-17
- ZAMBONELLI, A., D'AULERIO, A. Z., BIANCHI, A., & ALBASINI, A., 1996:** Effect of essential oils on phytopathogenic fungi *In vitro*. – *Phytopathology* 144, 491-494.
- ZORNACH, W., 1994:** Lückenindikationen - Ein unlösbares Problem? - *Mitt. Biol. Bundesanst.* 301, 42.
- YALPANI, N., SILVERMAN, P., WILSON, T. M. A., KLEIER, D. A., & RASKIN, I., 1991:** Salicylic acid as a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Pl. Cell*. 3, 809-818.

KURZFASSUNG

Isolierung und Charakterisierung von Pflanzeninhaltsstoffen mit fungizider Wirkung

Peter Blaeser

Obwohl Pflanzen aufgrund ihres Sekundärstoffwechsels ein außerordentlich reiches Reservoir an Molekülen bieten, stellen sie eine noch weitgehend ungenutzte Quelle für Wirkstoffe dar. Pflanzliche Metabolite könnten einerseits als Leitstrukturen für neuartige fungizide Wirkstoffe dienen oder aber als Naturstoff im organischen Landbau eingesetzt werden.

Da es bis heute ausschließlich pflanzliche Inhaltsstoffe mit insektizider Wirkung sind, die in der Praxis eingesetzt werden, war es Ziel dieser Arbeit, Naturstoffe aus Pflanzen mit fungizider Wirkung zu isolieren und deren Wirkung zu charakterisieren.

Untersucht wurde die Wirksamkeit von Extrakten aus mehr als 30 verschiedenen Pflanzenarten *in vitro* und *in vivo* gegenüber perthotrophen und biotrophen Pathogenen. Hierzu wurden ethanolische Blatt- und Wurzelextrakte hergestellt und deren Wirkung gegenüber den Pathogenen *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans*, *Plasmopara viticola*, *Uromyces phaseoli* und *Erysiphe graminis* erfaßt. Es wurden Pflanzenextrakte gefunden, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gegenüber phytopathogenen Pilzen wirksam waren. In Gewächshaus- und Freilandversuchen konnte durch die protektive Applikation der Extrakte aus *Salvia officinalis* und *Potentilla erecta* eine deutliche Befallsreduktion gegenüber Oomyceten erzielt werden. In einigen Fällen erreichte die Wirksamkeit der Extrakte die von konventionellen Vergleichsfungiziden.

Untersuchungen zum Einfluß der Extrakte aus *S. officinalis* und *P. erecta* auf verschiedene Entwicklungsstadien pilzlicher Erreger ließen unterschiedliche Wirkungsweisen erkennen. Während der Extrakt aus *S. officinalis* den Schlupf, Beweglichkeit und Keimung der Zoosporen von Oomyceten stark reduzierte, bewirkten Behandlungen mit dem Extrakt aus *P. erecta* eine deutliche Hemmung des Myzelwachstums von *P. infestans* und *P. viticola*. Gegenüber *B. cinerea* ließ sich bei keinem der Extrakte ein Einfluß auf die Sporenkeimung beobachten. Das Myzelwachstum des Erregers wurde hingegen von beiden Extrakten deutlich beeinflusst. Extrakte aus *P. erecta* verursachten deutliche Veränderungen an den Hyphen von *P. infestans*, *A. solani* und *B. cinerea*. So konnte eine starke Vakuolisierung des Cytoplasmas, Zellwandverdickungen und –ablösungen beobachtet werden.

Die Überprüfung bisher bekannter Inhaltsstoffe von *S. officinalis* auf ihr Vorkommen im Extrakt sowie deren Wirksamkeit gegenüber phytopathogenen Pilzen ergab, daß keine dieser Substanzen für die Wirksamkeit des Extrakts verantwortlich sein kann. Dünnschichtchromatographische Untersuchungen zur Isolierung der wirksamen Inhaltsstoffe des Extraktes ließen drei aktive Fraktionen erkennen. HPLC und GC-MS bestätigten, daß es sich bei den drei isolierten Fraktionen um Gemische mit jeweils unterschiedlichen Substanzen handelt.