

Forschungsbericht

Nr. 113

Minderung von pilzlichem Pathogenbefall im organischen Obstbau durch Zufuhr von Antioxidantien

Verfasser:

Förschler A., Portz C., *Steiner U., Schmitz-Eiberger M. und Noga G.

Institut für Gartenbauwissenschaft
***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 2003

ISSN 1610-2460

Projektleitung: Prof. Dr. G. Noga
PD Dr. M. Schmitz-Eiberger

Projektbearbeiter: Dipl.-Ing. agr. A. Förschler, Dr. agr. C. Portz

Institut für Gartenbauwissenschaft
Auf dem Hügel 6
53121 Bonn

Kooperation: PD Dr. U. Steiner
Institut für Pflanzenkrankheiten
Nussallee 9
53115 Bonn

Zitiervorschlag:

FÖRSCHLER A., C. Portz, M. SCHMITZ-EIBERGER, U. STEINER UND G. NOGA (2003): Minderung von pilzlichem Pathogenbefall im organischen Obstbau durch Zufuhr von Antioxidantien. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL, 113, 41 Seiten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	2
1.1	Problemstellung.....	2
1.2	Zielsetzung	4
2	Material und Methoden	4
2.1	Versuche unter kontrollierten Bedingungen	4
2.2	Freilanduntersuchung	9
2.3	Statistik.....	10
3	Ergebnisse	11
3.1	Versuche unter kontrollierten Bedingungen	11
3.1.1	Inokulationsstudien	11
3.1.2	Infektionsverlauf von <i>V. inaequalis</i>	12
3.1.3	Modifikation der Blattoberflächen.....	17
3.1.4	Untersuchung der stressphysiologischen Parameter	18
3.2	Freilanduntersuchungen	23
3.2.1	Containerbaumversuche	23
3.2.2	Freilandversuch Klein-Altendorf	24
3.2.3	Auswirkungen der Applikationslösungen auf die Fruchtqualitätsparameter ...	24
4	Diskussion	27
5	Zusammenfassung.....	32
6	Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis.....	33
7	Literaturverzeichnis.....	34
8	Anhang	38
9	Konsequenzen für weitere Forschungsarbeiten.....	38
10	Mitteilung über schützenswerte Nutzungsrechte	38
11	Liste über Veröffentlichungen	38
12	Liste über Vorträge.....	38
13	Liste über Pressemitteilungen	39
14	Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen und Demonstrationen	39
15	Kurzfassung.....	40

1 Einleitung

1.1 Problemstellung

Der Apfelschorf *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. zählt weltweit zu den wichtigsten Krankheiten im Kernobstanbau der gemäßigten Klimate (MACHARDY 1996). Der Befall zeigt sich zunächst in Form von samtartigen, olivgrün bis schwarzgrünen Flecken auf den Blättern, die sich später vergrößern und zusammenlaufen. Im Laufe der Zeit trocknet das Zentrum der Befallsstellen aus oder es vernarbt. Blätter, die stark befallen sind, sterben ab, was bis zur Verkahlung der Bäume im Sommer führen kann. Eine Infektion wirkt sich ebenso negativ auf den Fruchtansatz aus. Befallene Früchte haben dunkle Flecken auf der Schale, die aufreißt und verkorkt; teilweise werden die Früchte vorzeitig abgestoßen.

Der Befall mit Apfelschorf führt somit zu großen wirtschaftlichen Einbußen. In Regionen mit nassen und kühlen Frühjahren können Ertragsverluste von bis zu 70 % auftreten. Die Verluste resultieren einerseits aus einer direkten Reduktion der Erntemenge durch geringeren Fruchtertrag. Andererseits können aber auch bei sehr hohen Befallsintensitäten Erntemengen über mehrere Jahre indirekt durch wiederholte Verringerung der Blattmasse und eine sich daraus ergebende Schwächung des Baumwachstums dezimiert werden. Die Schäden werden jedoch nur selten als lebensbedrohlich für den Baum erachtet (MACHARDY et al., 2001; KENNEL et al., 1983; JONES 1998).

Um Äpfel vermarkten zu können, bedarf es hoher Fruchtqualitäten, um mit den qualitativ hochwertigen und hohen Importmengen konkurrenzfähig zu bleiben. Deshalb wird die Pilzkrankheit unter Einsatz hoher Aufwandmengen an Pflanzenschutzmitteln bekämpft.

Besonders problematisch ist die Pflanzenschutzsituation im ökologischen Apfelanbau, da dem Erreger dort fast ausschließlich mit Kupferpräparaten entgegengewirkt werden kann. Pro Jahr werden mindestens 1,4 kg/ha zur Kontrolle von Pilzkrankheiten ausgebracht. Der Einsatz der Kupferpräparate ist jedoch im organisch-dynamischen Obstbau auf maximal 3 kg/ha Cu pro Jahr begrenzt (BBÖ 1998).

Cu-Konzentrationen von mehr als 400 ppm in Böden führen zur Anreicherung dieses Schwermetalls in verschiedenen Pflanzenorganen. Diese Maximalwerte werden aufgrund der Ausbringung hoher Mengen von Kupfersalzen erreicht oder überschritten, wie es im Wein- und Hopfenanbau sehr häufig zu beobachten ist (HOCK et al., 1995). Hohe Kupfergehalte in Boden und Pflanze stellen ein mögliches Toxizitätsproblem für Mensch und Umwelt dar (BBÖ 1999). Neben der akuten Toxizität liegen auch Erhebungen und Hinweise zur chronischen Toxizität (Karzinogenität, Teratogenität und Mutagenität) vor (BBA 1999).

Hinsichtlich der Anwendung der Kupferpräparate ergeben sich aufgrund des Toxizitätspotentials gesetzliche Beschränkungen, die zukünftig noch verschärft werden sollen. Aus diesem Grund sind Alternativen in der Schorfbekämpfung für den ökologischen Anbau zwingend notwendig.

In Feldversuchen auf integriert geführten Betriebsflächen am Standort Bavendorf (Deutschland) konnte gezeigt werden, dass die Applikation eines auf Vitamin E basierenden

Antioxidantien-Präparates den Schorfbefall auf Blättern um ein Drittel im Vergleich zu unbehandelten Apfelbäumen reduzierte (SCHMITZ et al., 2000).

Die Anwendung von Antioxidantien zur Kontrolle von Pathogen-Infektionen wurde bisher jedoch nur wenig untersucht. So beschrieb (ELAD 1992) die Möglichkeit der Bekämpfung von *Botrytis cinerea*- und *Sclerotinia sclerotiorum*-Infektionen durch exogene Zufuhr natürlicher und synthetischer Antioxidantien. Die Anwendung verschiedener Antioxidantien, wie z. B. Tocopherol (Vitamin E), Thioharnstoff, Tanninsäure oder Ferulasäure, hatte eine Minderung des *Botrytis cinerea*-Befalls zur Folge. Der Effekt von Radikalfängern auf das Wirt-Parasit System *Avena sativa*-*Drechslera avenae* wurde von (GÖNNER et al., 1993) untersucht. Dabei wurden die Verbindungen durch Vakuuminfiltration in das Gewebe eingebracht. Ascorbinsäure und Propylgallat hemmten die Entwicklung von *Drechslera avenae* deutlich. Andere geprüfte Verbindungen wie Mannitol, Diethyldithiocarbamat und Alloxan waren weniger effektiv.

VANACKER et al. (1998b) zeigten, dass Pilzinfektionen zu Veränderungen von Enzymaktivitäten wie der Superoxiddismutase, Catalase und/ oder Ascorbatperoxidase und der endogenen Antioxidantienghalte (Ascorbinsäure) führen können. Aktivitäten verschiedener Enzyme und Antioxidantienghalte wurden 24 h nach der Inokulation mit *Blumeria graminis* bestimmt. Die Inokulation von Gerstenblättern mit *Blumeria graminis* hatte 24 h später eine Verminderung verschiedener Antioxidantienghalte zur Folge. SUTHERLAND (1991) wies eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen nach Pilzinfektion in photosynthetisch aktivem Gewebe nach.

Einige der oben genannten Reaktionen können auch unter dem Einfluss abiotischer Stressfaktoren, wie UV-B-Stress (SCHMITZ-EIBERGER et al., 2001c) oder Kältestress (SCHMITZ-EIBERGER, noch nicht veröffentlicht) in der Pflanze auftreten. Dort löst die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen einen oxidativen Stress aus, der in der Zerstörung pflanzeigener Verbindungen, beispielsweise ungesättigter Fettsäuren, Proteine oder Nukleinsäure, resultiert (SIES 1986; SCHMITZ et al., 1997). Außerdem kann es Kettenreaktionen mit unterschiedlichen Zellmolekülen, wie z.B. Fettsäuren, Proteinen, Nukleinsäuren oder Carotinoiden initiieren, die zu einem starken oxidativen Stress im Gewebe führen können (LAMB et al., 1997). Die reaktiven Sauerstoffverbindungen werden auch während des normalen Zellstoffwechsels gebildet. Zuvor genannte Kettenreaktionen werden im gesunden Gewebe mit Hilfe eines effektiven antioxidativen Systems unterbrochen, welches reaktive Radikale und H₂O₂ inaktiviert. Pflanzenzellen enthalten also effiziente antioxidative Systeme, um die Toxizität der reaktiven Sauerstoff-Verbindungen zu unterbinden.

Die Hypothese, dass bei oxidativem Stress die antioxidative Kapazität überschritten wird, ist allgemein akzeptiert (WOJTASZEK 1997), aber noch nicht vollständig bewiesen.

1.2 Zielsetzung

Besonders im organischen Anbau stellt das Auftreten von *V. inaequalis* ein schwerwiegendes Problem dar. Zur Bekämpfung des Erregers werden dort hohe Aufwandmengen von Kupferpräparaten eingesetzt. Aufgrund des möglichen Toxizitätspotentials für Mensch, Tier und Umwelt durch Kupferrückstände in Lebensmitteln und Boden ist eine Alternative zur Schorfbekämpfung mit Kupfer dringend erforderlich. Vorstudien haben gezeigt, dass Antioxidantien-Präparate den Apfelschorfbefall unter kontrollierten wie auch unter Freilandbedingungen um bis zu 70 % reduzieren können. Ziel dieses Projektes war es daher, die biologische Wirkung eines Antioxidantien-Präparates mit dem Wirkstoff Vitamin E zur Minderung von Schorfbefall zu optimieren. Im Rahmen des Projektes sollen die optimalen Anwendungstermine und -konzentrationen ermittelt werden. Des Weiteren sollten Untersuchungen zum Wirkungsgrad, zur Wirkungsdauer und zur Wirkungsweise durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuche unter kontrollierten Bedingungen

2.1.1 *Malus domestica*

Für die Untersuchungen wurden Apfelsämlinge der Sorte 'Golden Delicious' im Vier- bis Sechsstadium verwendet. Die Anzucht erfolgte nach mindestens 3-wöchiger Stratifikation bei 4°C in einer Klimakammer bei 19°C, 65-70 % relativer Luftfeuchte und einem 14/10-stündigen Tag/Nachtrhythmus. Die Samen wurden dort zunächst in Saatschalen ausgelegt und nach Erscheinen der ersten Laubblätter in Kunststofföpfe (150 cm³) getopft. Es wurden keine zusätzlichen Pflanzenschutzmaßnahmen durchgeführt.

2.1.2 *Venturia inaequalis*

V. inaequalis wurde von unbehandelten und unter natürlichen Bedingungen wachsenden Apfelbäumen isoliert. Die Konidiensuspension wurde hergestellt, indem entweder frische oder bei -18°C gelagerte Blätter in Leitungswasser suspendiert wurden. Anschließend wurde die Suspension auf eine Inokulumdichte von durchschnittlich 150 000 Sporen ml⁻¹ eingestellt. Das Inokulum wurde mittels einer Handspritze auf die Apfelsämlinge gesprüht. Danach wurden die Pflanzen für 48 h bei 100 %iger Luftfeuchte gehalten, um dem Pilz die optimalen Bedingungen für die Infektion zu gewährleisten. Für die Befallsentwicklung wurden die Sämlinge bei 19°C, 65-70 % relativer Luftfeuchte und 14/10-stündigem Tag/Nachtrhythmus aufgestellt.

2.1.3 Antioxidantien

Das antioxidativ wirksame α -Tocopherol (Vitamin E) wurde in 0,5 %iger Konzentration unter Zugabe von 0,03 % Ascorbinsäure verwendet. Die Ascorbinsäure diente der Stabilisierung der Lösung und zeigt eine synergistische Wirkung zum Tocopherol (SCHMITZ und NOGA, 1998). Um das lipophile Vitamin E in Lösung zu bringen, wurde der Formulierungshilfsstoff Lecithin S 20, Fa. Lipoid, (Ludwigshafen, Germany) (2,5 %) als Emulgator zugesetzt. Vorversuche haben gezeigt, dass sich Vitamin E bei einer niedrigeren Lecithinkonzentration nicht mehr löst. Lecithin besteht aus verschiedenen, organischen Phosphatidylsäuren und enthält Spuren von Tocopherol (0,00125-0,0025 %). Die Bestandteile dieser Formulierung entsprechen den Richtlinien der ökologischen Anbauverbände. Um die Wirksamkeit der beiden Bestandteile differenziert betrachten zu können, wurde das Lecithin auch ohne Tocopherol als sogenannte Leerformulierung mitgeprüft.

Die Behandlungsgruppen werden im Folgenden mit ' α -Tocopherol/Lecithin' für das in Lecithin gelöste α -Tocopherol, bzw. mit 'Lec.' für das wirksubstanzfreie Lecithin bezeichnet. Die Applikation erfolgte mit einer Handspritze bis zum Abfließen der Tropfen von den Blättern.

Beide Lösungen wurden hinsichtlich optimalem Anwendungszeitpunkt, Wirkungsgrad und der Wirkungsdauer untersucht.

2.1.4 Bonitur des Schorfbefalls auf Blättern

Bei der Bonitur wurde die sichtbar befallene Blattfläche in Prozent 3, 7 und 14 Tage nach der Inokulation (dpi = days post inoculationem) ermittelt. Dazu wurden folgende Boniturklassen verwendet: 0, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100 %.

2.1.5 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Probenahme und Fixierung

Infektionsstrukturen des Pilzes auf bzw. unterhalb der Cuticula konnten durch eine modifizierte Methode von (ORTEGA 1999) sowie (HOOD ET AL., 1996) sichtbar gemacht werden. Vom 2. bis zum 7. Tag nach Inokulation wurden täglich mit einem Korkbohrer (Durchmesser 0,8 mm) von mind. drei verschiedenen Pflanzen fünf Blattscheiben pro Variante aus dem zweit- bzw. drittjüngsten Blatt ausgestanzt.

Die Blattscheiben wurden sofort für mind. 48h in Rollrandgläsern mit ca. 5 ml ECM-Lösung (99%iges Ethanol + Chloroform + Milchsäure im Verhältnis 6:3:1) gelegt. Auf diese Weise konnten die Proben gleichzeitig fixiert und entfärbt werden. Durch mehrmaliges Spülen der entfärbten Blattscheiben mit einer auf pH 9 eingestellten 0,067 M K_2HPO_4 -Lösung wurde der pH-Wert des Blattgewebes auf 9 eingestellt.

Färbetechnik

Zur Färbung mit Anilinblau wurden die Blattscheiben zur Sicherstellung des pH-Wertes 9 der Proben für eine Minute in 1 M Kalilauge (KOH) gelegt. Anschließend erfolgte das Anfärben der Blattscheiben für ca. drei Minuten in der nachfolgend beschriebenen Anilinblau-Färbelösung. Nachdem die gefärbten Blattscheiben mit der Blattoberseite nach oben auf

Objektträger montiert und mit einem Deckgläschen abgedeckt wurden, konnten sie fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

Herstellung der Anilinblau-Färbelösung (pH 9):

50 mg	Anilinblau (0,05%)
0,067 M	K ₂ HPO ₄ (~1,167g)
100ml	Entionisiertes Wasser

Mikroskopie

Für die Beobachtungen der Pathogenentwicklung wurde das Photomikroskop DMRB von LEICA (Wetzlar) verwendet, welches für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit einem Filterblock des Typs A (BP 340-380 nm, LP 425 nm) ausgestattet war. Eine Videokamera der Fa. SONY sowie das Bildanalyse-System ‚DISCUS‘ der Fa. HILGERS (Königswinter) ermöglichten die Photoaufnahmen und das Ausmessen der Keimschlauchlängen.

2.1.6 Auswertung der Pathogenentwicklung

Keimung und Keimschlauchwachstum

Die Keimraten der Konidien von *V. inaequalis* wurden mikroskopisch durch Auszählen von 10 * 10 zufällig gewählten Konidien pro Platte bei mind. 2 Platten pro Variante bestimmt. Auf den Blattscheiben wurde die Keimfähigkeit der Konidien durch Auszählen von mind. 3 * 10 Konidien pro Blattscheibe bei fünf Blattscheiben pro Variante ermittelt. Als gekeimt galten Konidien, deren Keimschlauch mindestens der Konidienbreite entsprach.

Unter Verwendung eines Plattentests wurde das Keimschlauchwachstum 24 Stunden nach Inokulation durch Ausmessen von mind. 50 Keimschläuchen pro Variante (bei mind. zwei Platten pro Variante) mikroskopisch bestimmt. Auf der Blattoberfläche wurden die Keimschlauchlängen von 20 gekeimten Konidien je Blattscheibe sowie der Anteil deformierter Keimschläuche aufgrund der zur Infektion notwendigen Blattfeuchtedauer für 48 Stunden erst zwei Tage nach der Inokulation erfasst. Pro Blattscheibe wurden 20 zufällig ausgewählte Keimschläuche auf fünf Blattscheiben pro Variante ausgemessen.

Appressorienbildung

Am zweiten bis dritten Tag nach der Inokulation wurde die Anzahl gebildeter Appressorien durch Bonitur von 20 Konidien pro Blattscheibe und fünf Blattscheiben pro Variante ermittelt.

2.1.7 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Erfassung von Blattoberflächenveränderungen

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops XL 30 ESEM der Firma FILK/PHILLIPS (Kassel) konnten die Veränderungen auf der Blattoberfläche sichtbar gemacht werden. Die Untersuchungen der unfixierten Blattproben erfolgte 2 bis 24 h nach Applikation von 0,5 µl – Tropfen der Wirkstofflösungen unter Verwendung des 'Gaseous Secondary Electrons' (GSE)-Detektors bei 4°C und max. 1 Torr.

2.1.8 Chlorophyllfluoreszenz

Mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenz (CF) ist es möglich, Teilprozesse der Photosynthese im Bereich des Elektronentransportes in den Chloroplasten quantitativ zu erfassen. Somit ist sie eine sensitive Methode für die Früherkennung von stressbedingten Pflanzenschäden vor der ersten Symptomausprägung. Die CF wurde an Apfelsämlingsblättern mit einem Pulsamplituden-Modulations-Fluorometer (PAM 2000, Walz, Effeltrich, Germany) nach 30 Minuten Dunkeladaptation der Pflanzen bei 25°C und einem CO₂-Gehalt von 500-600 ppm an 3, 7 und 14 Tagen nach der Inokulation gemessen. Die Messung wurde an der adaxialen Blattoberfläche nach (SCHREIBER ET AL., 1995) durchgeführt. Das Blatt wird zunächst mit photosynthetisch nicht aktivem Messlicht (0,1 µmol Photonen m⁻²s⁻¹) belichtet, woraufhin sich die Grundfluoreszenz (F₀) einstellt. Anschließend wird das Blatt einem 800ms Sättigungsimpuls aus weißem Licht ausgesetzt, wobei die Fluoreszenz auf ihren Maximalwert F_m ansteigt. Das Quotient (F_m-F₀)/F_m = F_v/F_m ist ein geeignetes Maß um das maximale Ertragspotential von PSII einer bestimmten Probe messen zu können. Die maximale Fluoreszenz steht in engem Zusammenhang mit der Elektronentransportrate. Eine Reduktion lässt auf eine Blockierung des Elektronentransportes auf der PS II-Donorseite bzw. eine Störung des Energietransfers auf dem Pigmentlevel schließen ((RENGER ET AL., 1986).

2.1.9 Chlorophyllgehalte

Für die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurden jeweils 2 Blattscheiben definierter Größe mit DMSO (Dimethylsulfoxid) extrahiert. Nach 14 h wurden die Extrakte spektrophotometrisch bei den Wellenlängen 663 nm für Chlorophyll a und 645 nm für Chlorophyll b nach (BLANKE 1992; BLANKE 1990) gemessen.

2.1.10 Nachweis der Antioxidantiengehalte

Bei den folgenden Untersuchungen erfolgten die Probenahmen 3, 7 und 14 Tage nach der Inokulation.

Tocopherol

Die Tocopherolanalyse erfolgte mittels einer HPLC-Methode nach (SCHMITZ-EIBERGER et al., 2001b). Dafür wurde zunächst das zerkleinerte Blattmaterial mit Aufschlusspuffer (10 mM Tris(Hydroxymethyl)aminomethan, 1 mmol EDTA, 1 mmol 1,4-Dithioerythrit, 150 mmol Natriumchlorid) versetzt und 2 min. geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml Aufschlusspuffer sowie 3 ml Extraktionslösung (Hexan/Isopropanol 1:2 unter Zusatz von 0,125 g/l Di-tert-butyl-p-kresol (BHT)) wurden die Proben 10 min. bei 5000 U/min.

zentrifugiert. Zur zweiten Extraktion wurden 2,1 ml Hexan und 0,125 g BHT zugesetzt. Nach erneuter Zentrifugation und Überführung des Überstandes wurde der Extrakt auf 1 ml eingengt. Die Analyse erfolgte chromatographisch auf einer Lichrospher Si-60 Säule. Die Fluoreszenzsignale der Tocopherole/Tocotrienole wurden bei 285 nm (Anregungswellenlänge) und 320 nm (Emissionswellenlänge) detektiert. α -, β -, γ - und δ -Tocopherole und Tocotrienole wurden auf der Basis ihres Fluoreszenzspektrums charakterisiert. Quantitative Bestimmungen wurden auf die Fluoreszenzemission von reinen Standards (Merck, Darmstadt) bezogen.

Ascorbinsäure

Die Bestimmung der L-Ascorbinsäure (L-AA) und der Dehydroascorbinsäure (DHA) erfolgte mittels eines kommerziellen Testsatzes der Fa. Boehringer in Mannheim. Dafür wurden die schockgefrorenen Blätter zerkleinert, mit Metaphosphorsäurepuffer extrahiert und der Extrakt durch Zentrifugation von festen Bestandteilen befreit. Zur Ermittlung der DHA wurde Dithiothreit als reduzierender Wirkstoff verwendet.

2.1.11 Nachweis der Enzymaktivitäten

Peroxidase (PO)

Für die folgenden Enzym- und Vitaminbestimmungen wurden die Blätter gewogen und bei -30°C tiefgefroren. Die Blattgewichte betragen im Durchschnitt 1 g. Zur Aufbereitung wurden die Blätter in gekühlte Teflonzellen eingebracht und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. In einem Dismembrator wurde das Pflanzenmaterial bei einer Drehzahl von 5000 U/min. unter Verwendung einer Stahlkugel zu einem feinen Pulver zerkleinert.

Für die Peroxidasebestimmung wurden die zerkleinerten Blätter sowohl in 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer (pH 6) als auch in 1 M NaCl extrahiert. Die Probelösung enthielt 0,7 ml 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer, 0,15 ml 20 mM Guaiacol, 50 μl 0,6 M H_2O_2 , den Extrakt und wurde auf 1 ml aufgefüllt. Die Messung erfolgte spektrophotometrisch gegen eine Blindprobe ohne H_2O_2 bei 420 nm bei Raumtemperatur in Intervallen von 15 s für 3 Minuten (DAI et al., 1997). Eine Einheit Peroxidase ist als die Aktivität definiert, die eine optische Dichte von 1 bei 420 nm / 3min /mg Protein in einer Inkubationslösung von 1 ml produziert.

Lipoxygenase (LOX)

Die Probelösung zur Bestimmung der LOX enthielt 3 ml Phosphatpuffer (pH 7), 1 % Polyvinylpyrrolidone, 0,1 % Triton X-100, 0,04 % Natriummetabisulfit und den Blattextrakt in einem Gesamtvolumen von 5 ml (CROFT et al., 1990). Der LOX-gehalt wurde nach Surrey (1964) bestimmt, indem zu der Probelösung ein Substrat mit Linolsäure (0,25 %) und Tween 20 (0,25 %) hinzugefügt wurden. Die Reaktion fand bei Raumtemperatur und unter ständiger Zufuhr von Sauerstoff statt. Anschließend wurde je 1 ml davon in Zentrifugengläser mit 2 ml absolutem Alkohol gegeben und auf ein Volumen von 10 ml mit 60%igem Ethanol aufgefüllt, um die Reaktion zu stoppen. Die spektrophotometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 234 nm.

Eine Einheit LOX-aktivität entspricht der Aktivität, die eine optische Dichte von 1 bei 234 $\text{nm}\cdot\text{min}^{-1}$ in einem Gesamtvolumen von 10 ml einer 60%igen Ethanolösung produziert.

2.2 Freilanduntersuchung

2.2.1 Applikationslösungen siehe 2.1.3

2.2.2 Containerbaumversuche

Erste Freilanduntersuchungen wurden an einjährigen Veredelungen der Sorte 'Golden Delicious' auf M9-Unterlagen 2001 durchgeführt. Die Bäume wurden mehrmals behandelt und anschließend inokuliert.

Behandlungstermine: 23.07., 30.07. und 06.08;

Die Inokulation erfolgte jeweils 24 h nach der Behandlung. Um die hohe Luftfeuchtigkeit zu erzielen, die für eine optimale Keimung der Sporen von Bedeutung ist, wurden die inokulierten Äste für 48 h in eine Plastiktüte eingepackt.

Ein weiterer Versuch wurde 2003 unter natürlichen Infektionsbedingungen durchgeführt. Das Versuchsjahr war durch eine für den Erreger sehr ungünstige Witterung (hohe Temperaturen, kaum Niederschlag) gekennzeichnet und der Schorfdruck war somit sehr gering.

2.2.3 Freilandversuch Klein-Altendorf

Auf der Versuchsstation des Instituts für Gartenbauwissenschaft in Klein-Altendorf wurde im Jahr 2002 ein Versuch mit 'Golden Delicious' - Bäumen unter natürlichen Infektionsbedingungen durchgeführt. Der Versuch wurde als Blockanlage mit je 3 Varianten (eine unbehandelte Kontrolle, eine Behandlung mit α -Tocopherol/Lecithin und eine mit Lecithin) und je 3 Wiederholungen angelegt. Die Anwendungszeitpunkte für die Behandlungen wurden unter Berücksichtigung des Schorfwarndienstes der Landwirtschaftskammer Rheinland durchgeführt. Die erste Spritzung erfolgte am 20.03. und damit noch vor der ersten Schorfwarnung, da sich schon vor Beginn des Ascosporenfluges ein Schutzfilm auf den Knospen befinden sollte. Es folgten 7 weitere Spritzungen im ca. 2-wöchigen Abstand bis zum 17. Mai.

2.2.4 Bonitur des Krankheitsbefalls

An zwei Zeitpunkten (13.05. und 05.06.) wurden die Blätter bonitiert. Hierbei wurden von jedem Baum 3 Äste zufällig ausgewählt, die dann getrennt nach Blattober- und Unterseite in "befallen" oder "nicht befallen" eingeteilt wurden. Auch die Ost- und die Westseite wurde getrennt betrachtet. Die Infektionsgefahr war Mitte April klimabedingt durch länger anhaltenden Dauerregen und einem konzentrierten Hauptsporenausstoß verbunden mit sehr starkem Blatt- und Triebwachstum extrem hoch.

2.2.5 Einfluss der Applikationslösungen auf Fruchtqualitätsparameter

Vor der Ernte von unbehandelten und behandelten Äpfeln der Sorte 'Jonagold' aus einem Freilandversuch aus dem Jahr 2001 in Klein-Altendorf erfolgte die Bestimmung der folgenden Fruchtqualitätsparameter. Alle Messungen wurden an 8 Früchten pro Variante wiederholt.

Gewicht und Umfang

Nach der Ernte wurden die reifen Apfelfrüchte gewogen und anschließend der Umfang mit einer Schieblehre gemessen.

Festigkeit

Die Festigkeitsmessungen [kg/cm^2] wurden mit einem Handpenetrometer (Modell FT 327 für Äpfel und Birnen, Agritec Griesser AG, Kleinandelfingen, Deutschland) an zwei sich gegenüberliegenden Seiten (Sonnen- und Schattenseite) durchgeführt.

Farbe

Die Farbe der Apfelschale wurde mit einem Colorimeter (Minolta Chroma Meter II) nach dem CIELAB-System (L^* , a^* , b^*) (McGUIRE 1992) bestimmt. Die Lichtreflexion wurde im rechten Winkel zur Fruchtoberfläche auf einer Fläche von $1,5 \text{ cm}^2$ Durchmesser am Fruchtäquator bestimmt.

Zucker und Säure

Zur Bestimmung des Zucker- und Säuregehalts wurde der aus den Früchten gewonnene Saft verwendet. Die Messung des Zuckergehaltes erfolgte mit einem Refraktometer (Zeiss, Germany). Es wurden einige Tröpfchen auf das Refraktometer gegeben und der Refraktometerwert R in Gewichtsprozenten auf einer Skala abgelesen.

Der Säuregehalt wurde anhand der Bestimmung des pH-Wertes und der titrierbaren Säure bestimmt. Dazu wurde der Saft mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 10 ml verdünnt und der pH-Wert gemessen. Anschließend wurde mit 0,1 mol NaOH bis zum pH-Wert von 8,1 titriert. Der Säuregehalt S errechnet sich wie folgt:

$$S [\%] = (\text{Verbrauch } 0,1 \text{ mol NaOH} * \text{Äquivalentgewicht}) / 3 * 100$$

Die Äquivalentgewichte errechnet man durch Division des Molekulargewichtes durch die Anzahl der Carboxygruppen im Molekül.

2.3 Statistik

Bei Vorliegen von Normalverteilung und Varianzhomogenität wurden die Versuchsdaten einer Varianzanalyse unterzogen. Die Signifikanzen zwischen den unterschiedlichen Varianten wurden mit Hilfe multipler Mittelwertsvergleiche (Grenzdifferenztest nach ‚Tukey‘) ermittelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Statistiksoftware SPSS 11.0 für Windows, München, Deutschland.

3 Ergebnisse

3.1 Versuche unter kontrollierten Bedingungen

3.1.1 Inokulationsstudien

a) Optimaler Anwendungszeitpunkt

Versuche an Apfelsämlingen ergaben bei protektiver Applikation des Tocopherol-Präparates (0,5 % α -Toc. + 2,5 % Lecithin + 0,03 % Ascorbinsäure) zu den Terminen 48, 24 oder 2 Stunden vor Inokulation keinen Unterschied der Befallsminderung in Abhängigkeit des Anwendungszeitpunktes (Ergebnisse nicht dargestellt).

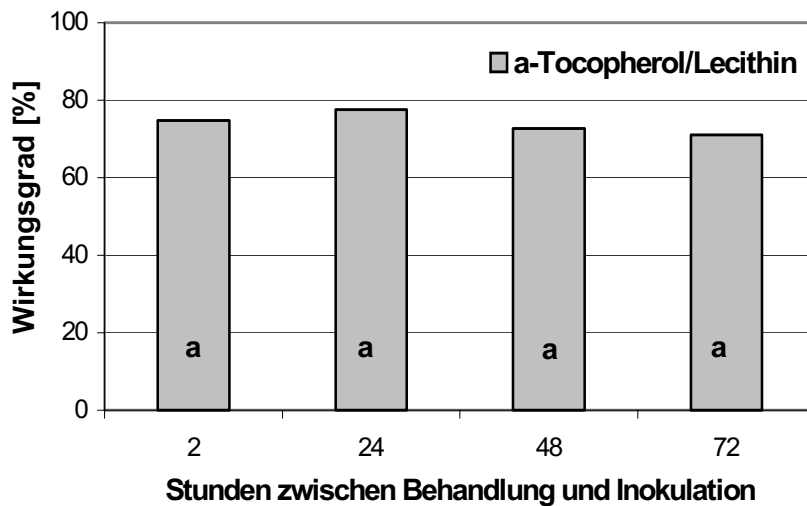


Abb. 1: Einfluss des Applikationszeitpunktes von α -Tocopherol/Lecithin auf den Wirkungsgrad gegenüber dem Befall mit *Venturia inaequalis* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 17 Tage nach Inokulation (Wirkungsgrad, Tukey-Test, $p = 0,05\%$).

b) Wirkungsgrad und Wirkungsdauer

Am dritten Tag nach der Inokulation waren erwartungsgemäß keine Symptome auf den Blättern sichtbar. Sieben Tage nach der Inokulation waren 15 % der unbehandelten Blattfläche infiziert, wohingegen bei den mit α -Tocopherol/Lecithin und Lec. vorbehandelten Pflanzen nur 1 % durch *V. inaequalis* geschädigt wurde. Somit konnte für beide Behandlungen ein Wirkungsgrad von ca. 90 % ermittelt werden. Zum 3. Messtermin (14 dpi) waren bereits 41 % der unbehandelten Blätter befallen und teilweise nekrotisiert. Die Behandlung mit den beiden Präparaten reduzierte den Befall um ca. 80 % verglichen mit der unbehandelten Variante (Abb. 1). Auch 23 Tage nach Inokulation wurde ein Wirkungsgrad von 50 % ermittelt. Hieraus ergibt sich eine Wirkungsdauer von mindestens 14 Tagen.

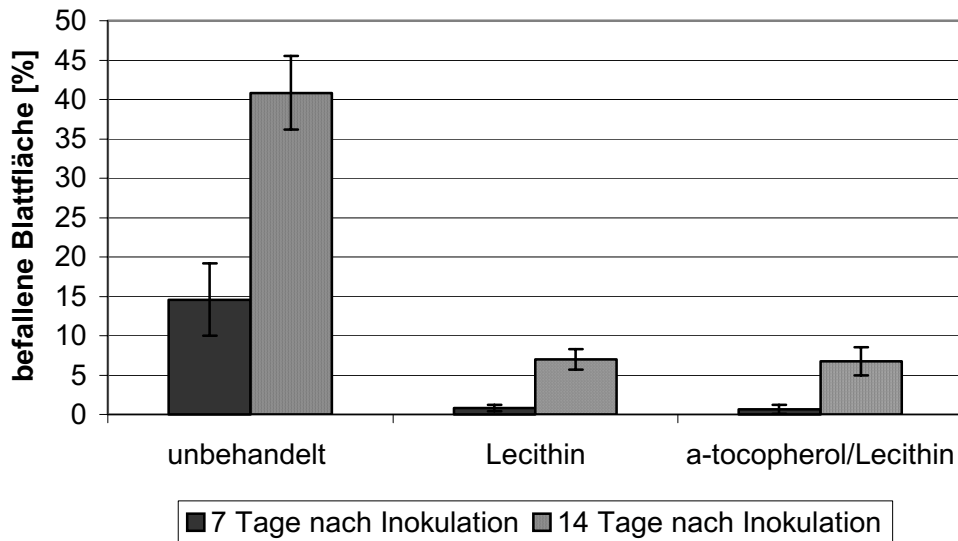


Abb. 2: Befallene Blattfläche [%] 7 und 14 Tage nach Inokulation mit *Venturia inaequalis* und Vorbehandlung mit Lecithin and α -toc./Lecithin. MW \pm SF, Tukey $p \leq 0,05$; n=30.

3.1.2 Infektionsverlauf von *V. inaequalis*

Keimung und Keimschlauchwachstum

Die Keimfähigkeit der Konidien bzw. deren Keimrate wurde weder auf Wasseragar-Platten noch auf der Blattoberfläche von Apfelsämlingen durch die Behandlung mit Tocopherol bzw. Lecithin beeinflusst.

Auf der Blattoberfläche waren sowohl bei Lecithin, als auch bei α -Tocopherol/Lecithin die Keimschläuche deutlich länger, als bei der unbehandelten Variante. Hier war kein Unterschied zwischen den beiden Applikationslösungen zu erkennen.

Tab. 1: Einfluss von α -Tocopherol und Lecithin auf Keimschlauchlänge und den Anteil deformierter Keimschläuche von *V. inaequalis*-Konidien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle 3 Tage nach Inokulation von Apfelsämlingsblättern

Variante	Ø Keimschlauchlänge [μ m]	Konidien mit deformierten Keimschläuchen [%]
unbehandelt	44 (a)	26 (a)
α -Tocopherol/Lecithin	86 (b)	81 (b)
Lecithin	87 (b)	74 (b)

Zusätzlich zum Längenwachstum wurde auf der Blattoberfläche der Anteil deformierter Keimschläuche erfasst. Als deformiert wurden Keimschläuche bezeichnet, die verzweigt, verdreht und/ oder in ihrer Fluoreszenz deutlich verändert waren (Abb. 2). Durch exogene Applikation von α -Tocopherol/Lecithin wurde der Anteil deformierter Keimschläuche drei Tage nach Inokulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht. Diese Beobachtung deutete auf eine direkte Wirkung des Wirkstoffes α -Tocopherol auf die Bildung der Keimschläuche hin. Besonders deutlich wurde der Anteil deformierter Keimschläuche durch Applikation des α -Tocopherol-Präparates sowie der Leerformulierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht. Nur wenige Keimschläuche blieben unbeeinflusst und waren weder stark verzweigt noch anderweitig deformiert (Tab. 1; Abb. 3 u. 4).

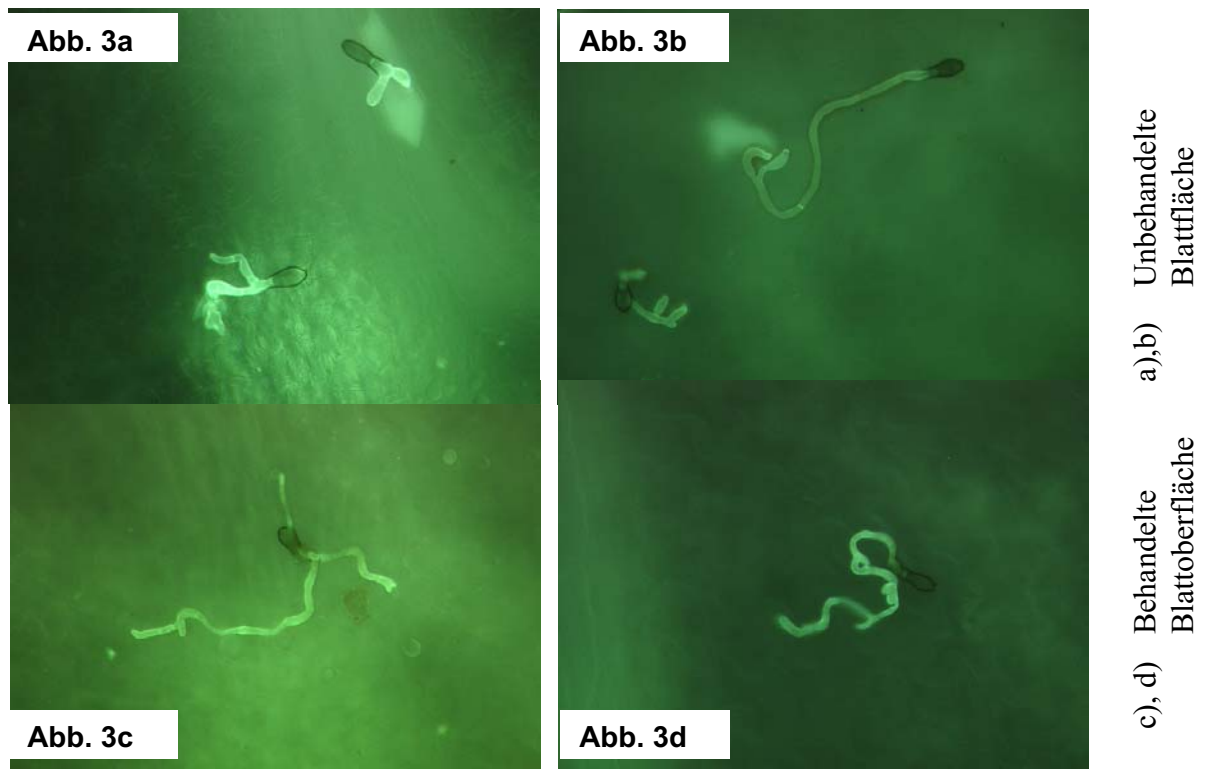


Abb. 3: Einfluss des Antioxidantienpräparates auf die Keimschläuche von *Venturia inaequalis*-Konidien drei Tage nach Inokulation (Sämlinge von ‚Golden Delicious‘, Tukey-Test bei $p = 0,05$)

Appressorien- und Primärstromabildung

Die Anzahl der Konidien, welche Appressorien ausbildet, war zwei Tage nach Inokulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle durch die α -Tocopherol-Behandlung reduziert (Abb. 4). Das Ausmaß dieser Reduktion betrug ca. 30 %. Sowohl die Applikation von α -Tocopherol/Lecithin als auch die Leerformulierung alleine verringerte die Bildung von Appressorien deutlich (Abb. 4).

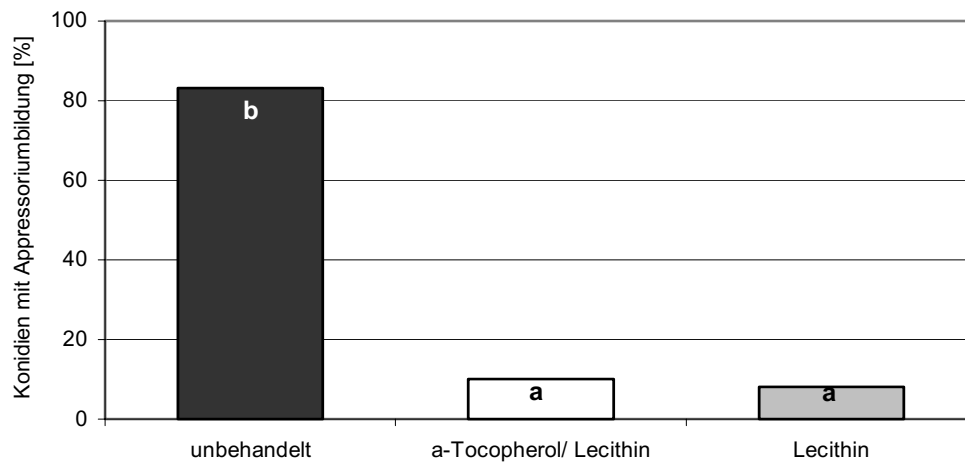


Abb. 4: Einfluss von α -Tocopherol und Lecithin auf den Anteil von *Venturia inaequalis*-Konidien mit Appressorien im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle drei Tage nach Inokulation (Sämlinge von ‚Golden Delicious‘, Tukey-Test bei $p = 0,05$)

Die Primärstromabildung wurde drei Tage nach Inokulation sowohl durch α -Tocopherol/Lecithin als auch durch die Leerformulierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verringert. Demnach konnten bei behandelten Pflanzen deutlich weniger Konidien das Blattgewebe erfolgreich infizieren (Abb. 5).

Besiedelung und Sporulation

Eine mögliche Beeinflussung der subcuticulären Entwicklung von *Venturia inaequalis* in Sämlingsblättern konnte fluoreszenzmikroskopisch unter Verwendung der unter 2.1.4 beschriebenen Boniturklassen durchgeführt werden. Die Gesamtanzahl von Infektionsstellen mit Laufhyphendifferenzierung war als Folge der verminderten Anzahl erfolgreicher Infektionsstellen mit Primärstromabildung sowie der Zunahme gescheiterter Infektionsstellen durch die Tocopherol- und Lecithinapplikation deutlich reduziert (Abb. 6).

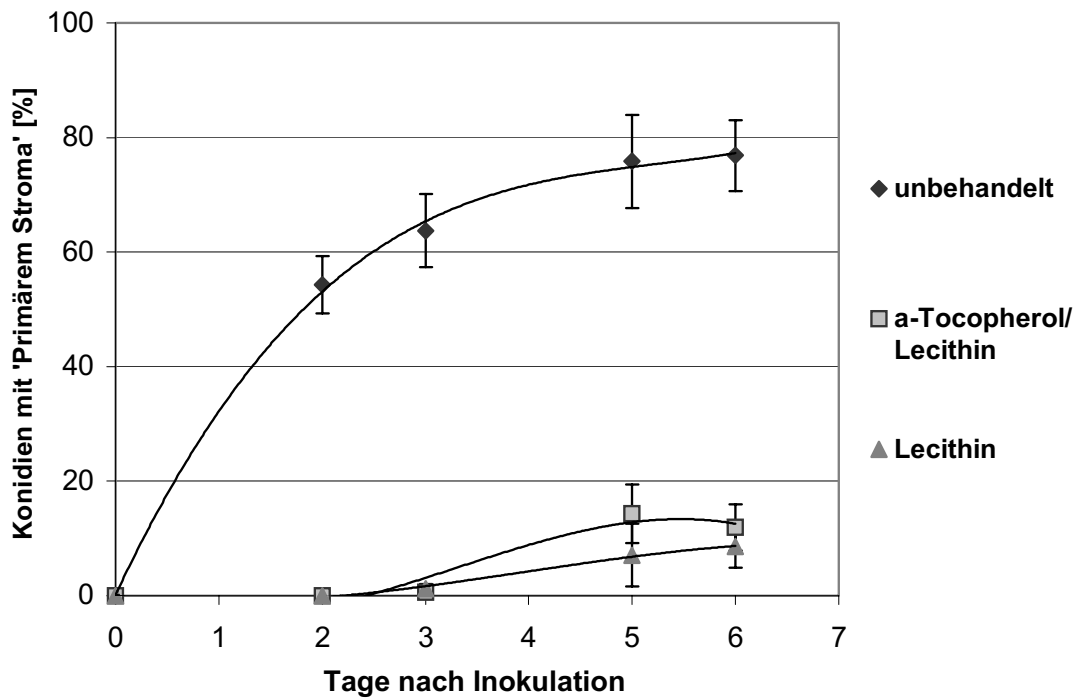


Abb. 5: Einfluss von α -Tocopherol auf die Bildung von Infektionsstellen mit Primärstromabildung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Sämlinge von ‚Golden Delicious‘, Standardfehler bei $p = 0,05$)

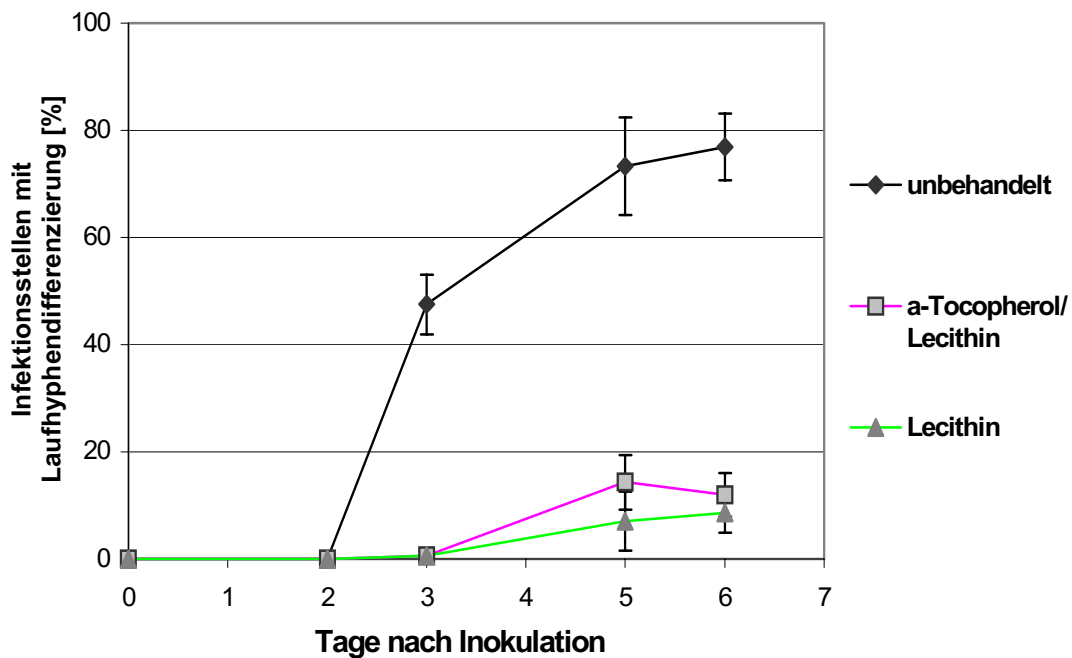


Abb. 6: Einfluss von α -Tocopherol auf die Laufhyphendifferenzierung von *V. inaequalis* (Sämlinge von ‚Golden Delicious‘, Standardfehler bei $p = 0,05$)

Nach Verrechnung des Anteils der einzelnen Boniturklassen an allen erfolgreichen Infektionsstellen konnte eine Verzögerung der subcuticulären Entwicklung durch die α -Tocopherol-Applikation um ein bis zwei Tage festgestellt werden. Als Folge der Behandlung von Sämlingen mit der Formulierung 2 war sechs Tage nach Inokulation eine vollständige Unterdrückung der Sekundärstromabildung zu beobachten (Abb. 7).

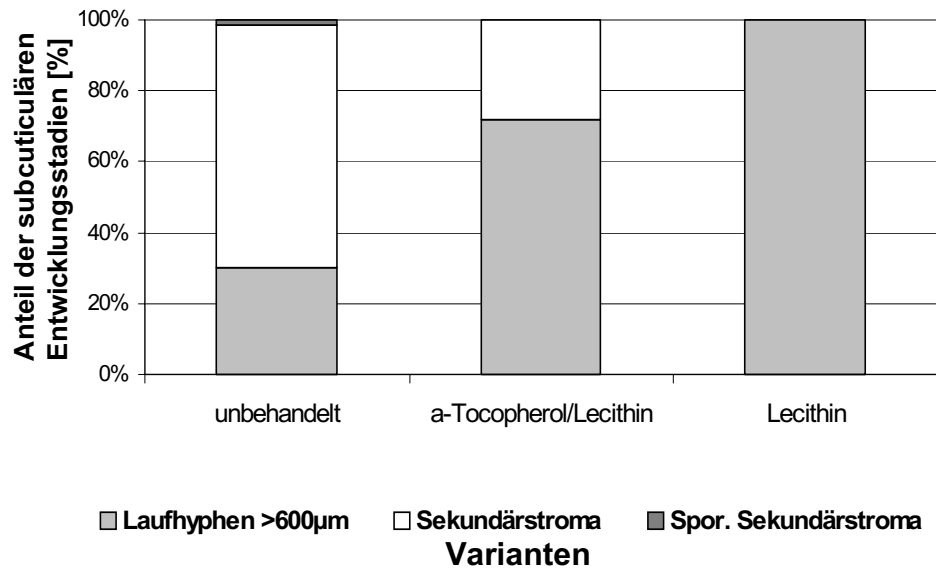


Abb. 7: Einfluss von α -Tocopherol und Lecithin auf die subcuticuläre Entwicklung von *V. inaequalis* (Sämlinge von ‚Golden Delicious‘, 6 Tage nach Inokulation)

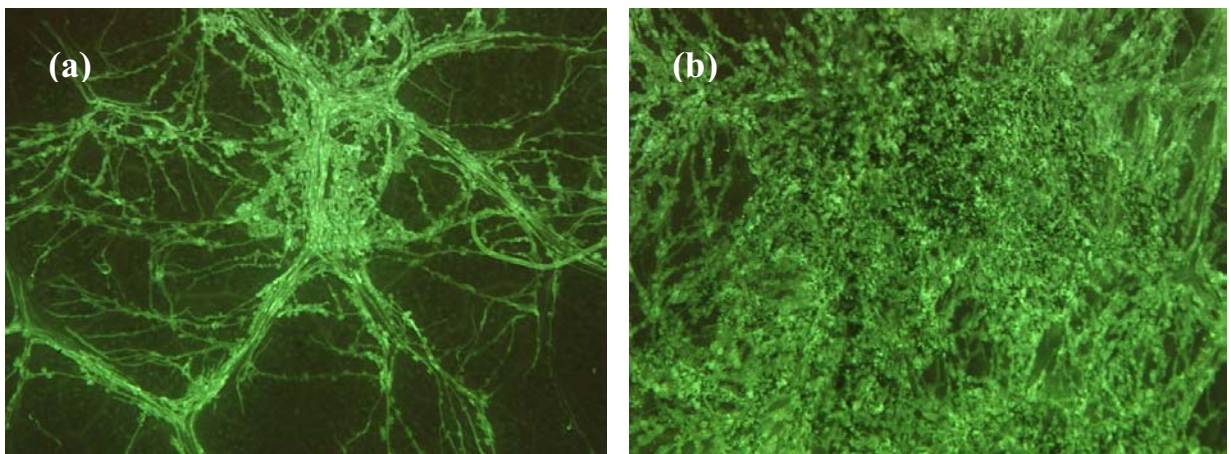


Abb. 8: Einfluss des Antioxidantienpräparates (a) auf die Sekundärstromabildung und Sporulation von *Venturia inaequalis* im Vergleich mit einem unbehandelten Blatt (b).

Die Sporulationsrate, d.h. die Menge gebildeter Konidien pro cm² befallener Blattfläche, wurde durch exogene Applikation von α -Tocopherol im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 80 % reduziert. Die Leerformulierung minderte die Bildung von Konidien/cm² befallener Blattfläche ebenfalls deutlich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Tab. 2).

Tab. 2: Einfluss von α -Tocopherol und Lecithin auf die Sporulationsrate von *Venturia inaequalis* (Sämlinge von ‚Golden Delicious‘, 14 Tage nach Inokulation, Tukey-Test bei $p = 0,05$)

Variante	Konidien/cm ² befallene Blattfläche [%]
Unbehandelt	100 % (b)
α -Tocopherol/Lecithin	39 % (a)
Lecithin	26 % (a)

3.1.3 Modifikation der Blattoberflächen

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops wurden die Spritzbeläge, welche die typischen Wachstrukturen der Blattoberfläche von Apfelsämlingen überdeckten, sichtbar (Abb. 9). Die Anlagerung des α -Tocopherols war in den Vertiefungen der Blattoberfläche besonders intensiv und reflektierte die Elektronen sehr stark, so dass diese Stellen auf den Bildern weiß erschienen (Abb. 11). Bei der Applikation der Konidiensuspension während der Inokulation wurde bei den behandelten Pflanzen im Gegensatz zur Kontrolle keine Tropfenbildung beobachtet (Abb. 10).



Abb. 9: Oberflächenveränderungen als Folge der Applikation von α -Tocopherol und Lecithin.

- a) unbehandeltes Blatt
- b) Behandlung mit α -Tocopherol/Lecithin
- c) Behandlung mit Lecithin



Abb. 10: Veränderungen der Tropfenspreitung der Konidiensuspension nach der Inokulation als Folge der Applikation von α -Tocopherol und Lecithin.

- a) unbehandeltes Blatt
- b) Behandlung mit α -Tocopherol/Lecithin
- c) Behandlung mit Lecithin

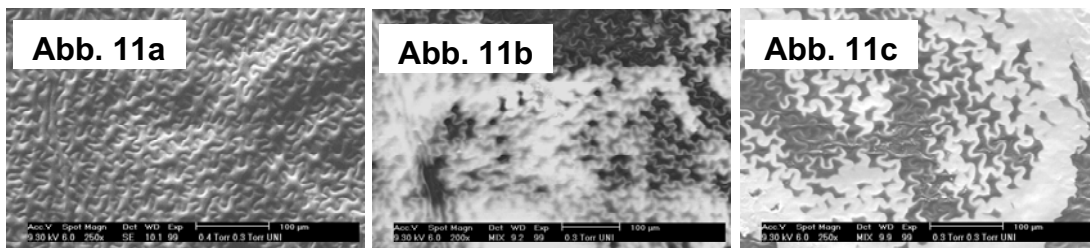


Abb. 11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unbehandelter und behandelter Blattoberflächen zur Darstellung von Oberflächenveränderungen als Folge der Applikationslösungen (250-fache Vergrößerung).

- a) unbehandelte Blattoberfläche
- b) Behandlung mit α -Tocopherol/Lecithin
- c) Behandlung mit Lecithin

3.1.4 Untersuchung der stressphysiologischen Parameter

Chlorophyllfluoreszenz

Drei Tage nach der Inokulation gab es noch keine Unterschiede im Parameter F_v/F_m zwischen den Behandlungsgruppen, die auf Störungen im Photosyntheseapparat hinweisen würden (Abb. 12). Sieben Tage nach der Inokulation sank der F_v/F_m -Wert der unbehandelten und inokulierten Pflanzen im Vergleich zu den anderen leicht ab. Ein signifikanter Abfall der unbehandelten, infizierten Gruppe im Vergleich zu den behandelten und der nicht inokulierten Gruppe wurde 14 Tage nach der Inokulation gemessen. Die Pflanzen, die mit α -Tocopherol und Lecithin behandelt wurden, blieben während des gesamten Beobachtungszeitraums auf dem gleichen Niveau wie die nicht infizierten Pflanzen. Dies liegt wahrscheinlich an der Befallsreduktion der behandelten Pflanzen, die geringere Schäden an den Blättern aufwiesen, als die unbehandelten und inokulierten Pflanzen. Relative Werte von F_m waren vergleichbar mit denen von F_v/F_m ; F_o veränderte sich in den vier verschiedenen Gruppen nicht (Ergebnisse nicht gezeigt.)

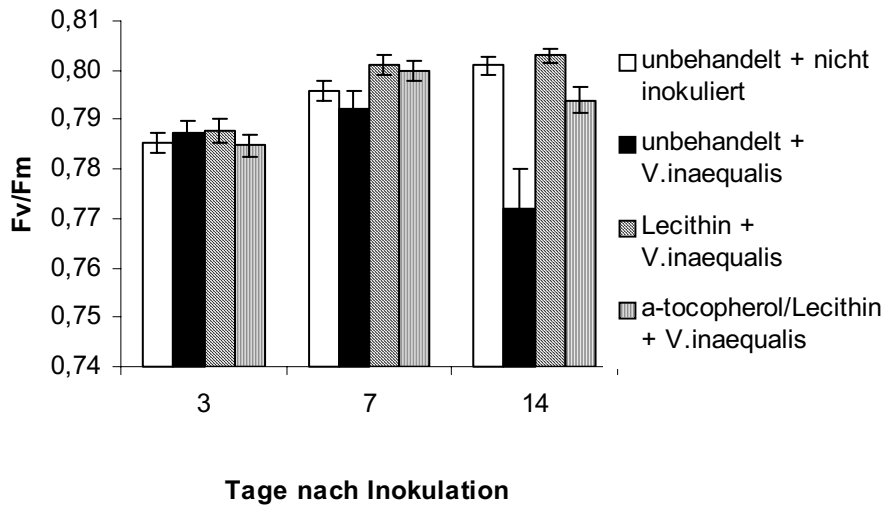


Abb. 12: Einfluss von α -Tocopherol und Lecithin auf die Chlorophyllfluoreszenz (F_v/F_m) von Apfelsämlingsblättern nach Infektion mit *V. inaequalis* 3, 7 and 14 Tage nach Inokulation (MW \pm SF, Tukey $p \leq 0,05$; n = 16.)

Chlorophyllgehalte

Chlorophyll a und b stiegen während der Messperiode leicht an. Zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen waren bei keinem der Messtermine signifikante Unterschiede im Gesamtchlorophyllgehalt (a+b) zu verzeichnen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Endogene Antioxidantiengehalte

A) Enzymaktivitäten

Peroxidase

Die Peroxidaseaktivität war drei Tage nach der Inokulation bei allen Gruppen auf dem gleichen Niveau (nicht dargestellt). Sieben Tage nach der Inokulation stieg die PO-Aktivität der unbehandelten und infizierten Gruppe im Vergleich zur nicht infizierten Gruppe deutlich an. Dieser Effekt war 14 Tage nach der Inokulation noch deutlicher zu erkennen (Abb. 13). Während die PO-Aktivität 7 dpi auch in der Lecithin-Variante erhöht war, sank die Aktivität 14 dpi auf den gleichen Wert wie bei der α -Tocopherol/Lecithin-Variante, die an beiden Terminen, 7 und 14 dpi im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle nur leicht erhöht war.

Lipoxygenase

Am dritten Tag nach der Inokulation war die LOX-Aktivität in den nicht inokulierten Pflanzen genauso hoch, wie in den infizierten Pflanzen. Ein signifikanter Anstieg in der Aktivität des Enzyms wurde bei den unbehandelten und infizierten Pflanzen 7 und 14 dpi beobachtet. Zu diesen Terminen war die LOX-Aktivität signifikant erhöht, verglichen mit den anderen Varianten (Abb. 14).

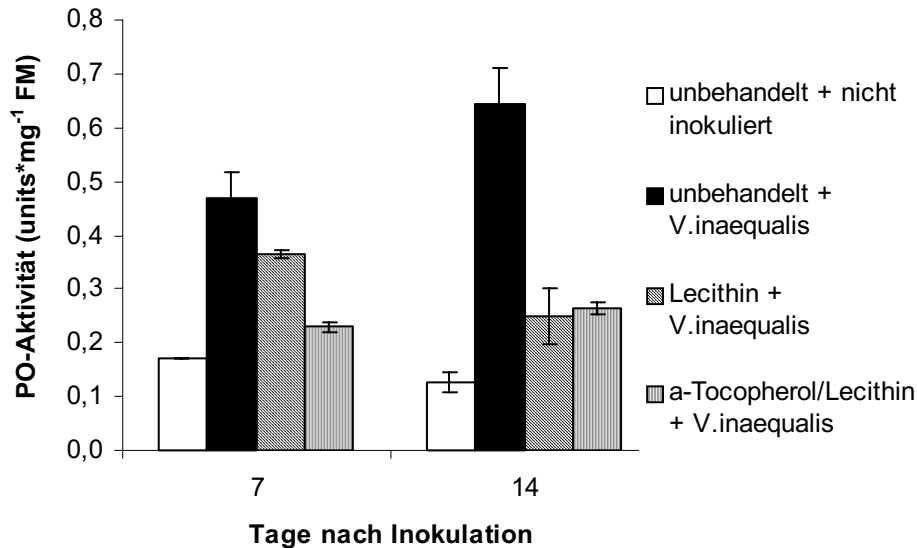


Abb. 13: Einfluss von α -Tocopherol und Lecithin auf die Peroxidase-Aktivität ($\text{units} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ FM}$) von Apfelsämlingsblättern nach *Venturia inaequalis* Infektion 7 und 14 Tage nach Inokulation ($\text{MW} \pm \text{SF}$, Tukey $p \leq 0,05$; $n=6$).

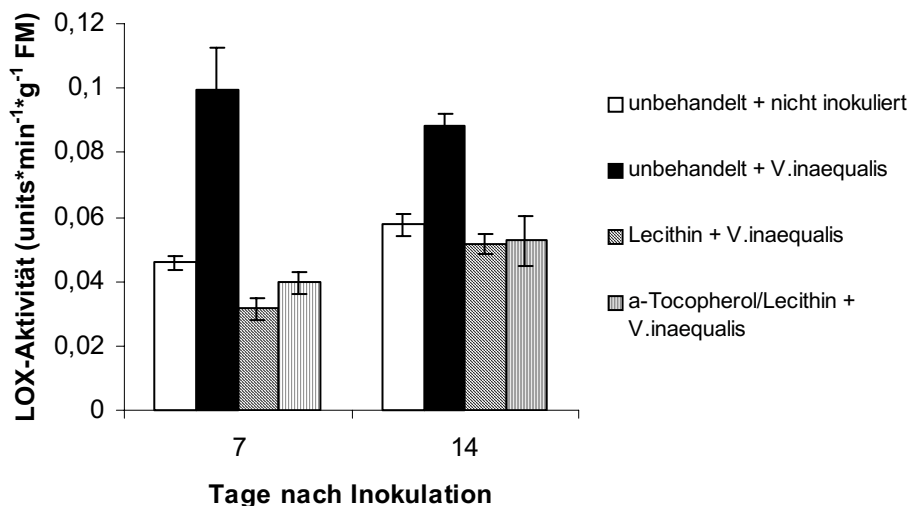


Abb. 14: Einfluss von α -Tocopherol und Lecithin auf die LOX-Aktivität ($\text{units} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) von Apfelsämlingsblättern nach Infektion mit *Venturia inaequalis* 7 und 14 Tage nach Inokulation ($\text{MW} \pm \text{SF}$, Tukey $p \leq 0,05$; $n=6$).

B) Antioxidative Substanzen

α -Tocopherol

Der Tocopherolgehalt stieg im Beobachtungszeitraum an. Am dritten und siebten Tag nach der Inokulation war der Tocopherolgehalt der mit α -Tocopherol/Lecithin behandelten Pflanzen wesentlich höher, als in den anderen Apfelsämlingen. Am letzten Probenahmetermin (14 dpi) konnte zwischen den mit dem Antioxidantienpräparat behandelten und den nicht infizierten Pflanzen kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden. Im Vergleich zu diesen Sämlingen war der Tocopherolgehalt in den unbehandelten und infizierten und den mit Lecithin behandelten Pflanzen wesentlich niedriger (Abb. 15).

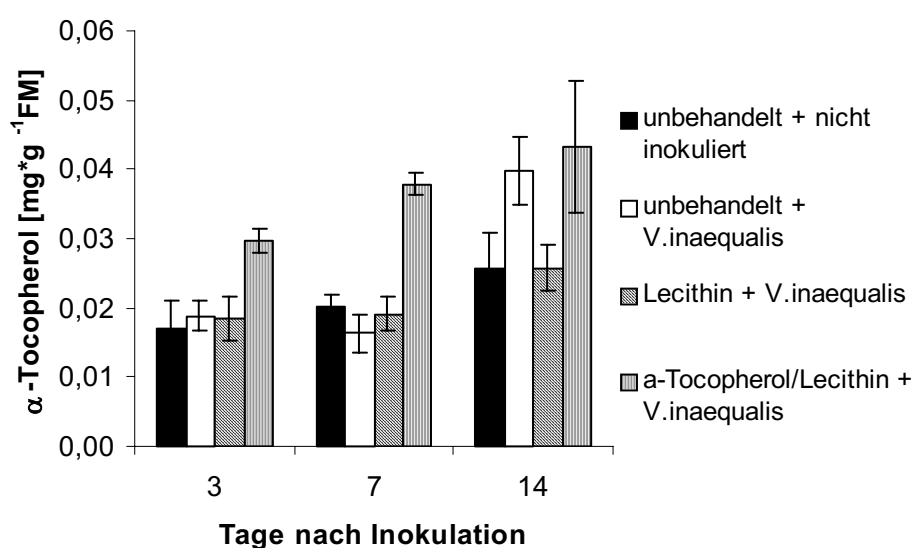


Abb. 15: Einfluss der Behandlungslösungen auf den α -Tocopherol Gehalt ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FM) von Apfelsämlingsblättern nach *Venturia inaequalis* Infektion 3, 7 and 14 Tage nach Inokulation ($\text{MW} \pm \text{SF}$, Tukey $p \leq 0,05$; $n=6$).

Ascorbinsäure

Die Infektion mit *V. inaequalis* resultierte in einem Anstieg der L-Ascorbinsäure bei der unbehandelten, infizierten Gruppe 3 Tage nach Inokulation. Es folgte ein schwächerer Anstieg der mit Lecithin vorbehandelten Pflanzen. Die L-Ascorbinsäure der mit Tocopherol behandelten Pflanzen war auf dem gleichen Niveau wie in den nicht infizierten Blättern. Diese Ergebnisse stimmten mit denen des Gesamtascorbings Gehaltes 3 Tage nach Inokulation überein.

Sieben Tage nach Inokulation konnte kein Unterschied hinsichtlich der L-AA, DHA und des Gesamtascorbats während des Pathogenbefalls festgestellt werden. Nach 14 Tagen resultierte der Befall in den unbehandelten und mit Lecithin behandelten Blättern in einem signifikanten Abfall von L-AA und Gesamtascorbat. In den unbehandelten Blättern sank zusätzlich der DHA-Gehalt verglichen mit allen anderen Varianten. Die Ascorbinsäuregehalte in nicht

infizierten Blättern waren höher als in den infizierten Varianten. Der Ascorbinsäuregehalt der mit α -Tocopherol/Lecithin behandelten Blätter war fast auf dem gleichen Niveau wie der der nicht inokulierten Blätter (Tab. 3).

Tab. 3: Einfluss der Behandlungslösungen auf L-Ascorbinsäure, Dehydroascorbinsäure and Gesamtascorbinsäure [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ FM] von Apfelsämlingsblättern nach *Venturia inaequalis* Infektion 3, 7 and 14 Tage nach Inokulation (MW \pm SF, Tukey $p \leq 0,05$; n=6.)

	L-AA	DHA	L-AA+DHA
	<i>3 dpi</i>		
unbehandelt+ nicht inokuliert	0.287 \pm 0.09 a	0.398 \pm 0.02 a	0.686 \pm 0.07 a
unbehandelt+ <i>V.inaequalis</i>	0.740 \pm 0.06 b	0.712 \pm 0.05 b	1.452 \pm 0.12 b
Lecithin+ <i>V.inaequalis</i>	0.548 \pm 0.06 ab	0.406 \pm 0.05 a	0.954 \pm 0.10 a
α -Tocopherol/Lecithin+ <i>V.inaequalis</i>	0.407 \pm 0.08 a	0.424 \pm 0.07 a	0.831 \pm 0.15 a
	<i>7 dpi</i>		
unbehandelt+ nicht inokuliert	0.325 \pm 0.04 a	0.365 \pm 0.02 a	0.689 \pm 0.06 a
unbehandelt+ <i>V.inaequalis</i>	0.253 \pm 0.03 a	0.312 \pm 0.02 a	0.565 \pm 0.04 a
Lecithin+ <i>V.inaequalis</i>	0.321 \pm 0.03 a	0.364 \pm 0.01 a	0.685 \pm 0.04 a
α -Tocopherol/Lecithin+ <i>V.inaequalis</i>	0.234 \pm 0.12 a	0.409 \pm 0.06 a	0.642 \pm 0.18 a
	<i>14 dpi</i>		
unbehandelt+ nicht inokuliert	0.397 \pm 0.09 b	0.406 \pm 0.05 c	0.803 \pm 0.14 b
unbehandelt+ <i>V.inaequalis</i>	0.109 \pm 0.03 a	0.164 \pm 0.01 a	0.272 \pm 0.04 a
Lecithin+ <i>V.inaequalis</i>	0.104 \pm 0.01 a	0.221 \pm 0.00 ab	0.326 \pm 0.01 a
α -Tocopherol/Lecithin+ <i>V.inaequalis</i>	0.276 \pm 0.05 ab	0.307 \pm 0.02 bc	0.584 \pm 0.07 ab

3.2 Freilanduntersuchungen

3.2.1 Containerbaumversuche

Im Freiland durchgeführte Containerbaumversuche an einjährigen Veredlungen der Sorte 'Golden Delicious' bestätigten die Beobachtungen der Sämlingsversuche unter kontrollierten Bedingungen. So wurde bei einmaliger Behandlung 17 Tage nach der Inokulation ein Wirkungsgrad von durchschnittlich 80% der behandelten Bäume im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ermittelt. Nach 30 Tagen konnten keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Bäumen festgestellt werden (Abb. 16). Dies ist auf die natürliche Weiterverbreitung des Apfelschorfs unter Freiland-Bedingungen zurückzuführen.

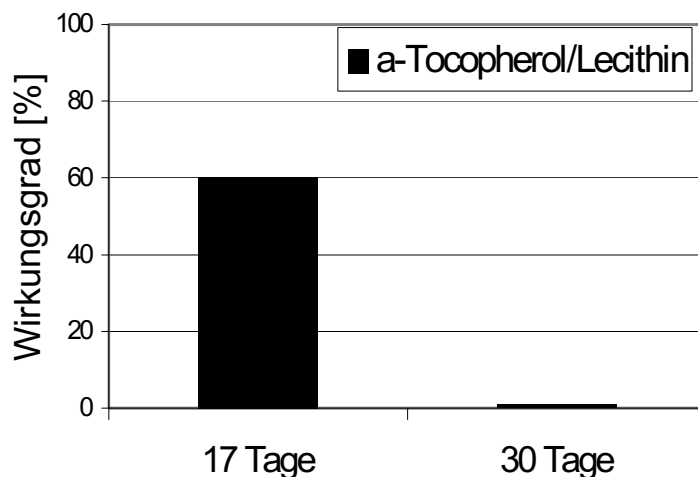


Abb. 16: Wirkungsgrad [%] von α -Tocopherol/Lecithin bei Containerbäumen 17 und 30 Tage nach Inokulation mit *V. inaequalis*.

Wirkungsgrad und Wirkungsdauer

Bei einmaliger Behandlung und Inokulation wurde eine Minderung der befallenen Blattfläche um ca. 80 % erzielt. Bei 2-maliger Behandlung, wobei nach jeder Behandlung jeweils am darauffolgenden Tag inokuliert wurde, ergab sich immer noch ein sehr hoher Wirkungsgrad von ca. 87 % (Tab. 4).

Tab. 4: Einfluss von ein- und zweimaliger Behandlung mit α -Tocopherol und Lecithin auf die befallene Blattfläche (MW).

Variante	Befallene BF [%]	Anzahl Behandlung und Inokulation
unbehandelte Kontrolle	20,98	1
unbehandelte Kontrolle	33,13	2
α -Tocopherol/Lecithin	4,25	1
α -Tocopherol/Lecithin	7,44	2

3.2.2 Freilandversuch Klein-Altendorf

Die Anwendungszeitpunkte für die Behandlungen wurden unter Berücksichtigung des Schorfwarndienstes der Landwirtschaftskammer Rheinland durchgeführt. Die erste Spritzung erfolgte am 20.03.2002 und damit noch vor der ersten Schorfwarnung, da sich schon vor Beginn des Ascosporenfluges ein Schutzfilm auf den Knospen befinden sollte. Es folgten 7 weitere Spritzungen im ca. 2-wöchigen Abstand bis zum 17. Mai. An zwei Zeitpunkten (13.05. und 05.06.) wurden die befallenen Blätter bonitiert. Hierbei wurden von jedem Baum 3 Äste zufällig ausgewählt, die dann jeweils getrennt nach Blattober- und Unterseite in „befallen“ oder „nicht befallen“ bonitiert wurden (Abb. 17). Auch die Ost- und Westseite wurde getrennt betrachtet. Die Infektionsgefahr war Mitte April klimabedingt durch länger anhaltenden Dauerregen und einem konzentrierten Hauptsporenausstoß verbunden mit sehr starkem Blatt- und Triebzuwachs extrem hoch. Aus diesem Grund konnte durch Applikation der beiden Spritzlösungen nur eine geringe Reduktion im Vergleich zur unbehandelten Variante erzielt werden. In diesem Versuchsjahr war es jedoch allgemein sehr schwierig, eine wirksame Schorfbekämpfung vorzunehmen. Auch nach Fungizidbehandlungen kam es teilweise noch zu einem starken Befall. Die weitere Ausbreitung des Befalls wurde darüber hinaus durch die unbehandelte Variante, die schon zu einem frühen Zeitpunkt befallen war, und von wo aus sich der Erreger in großer Geschwindigkeit auf die umliegenden, behandelten Bäume ausbreiten konnte, begünstigt. Der Versuch wurde aus diesem Grund auf der Versuchsanlage abgebrochen und die Früchte nicht geerntet.

3.2.3 Auswirkungen der Applikationslösungen auf die Fruchtqualitätsparameter

Die Behandlung mit den Applikationslösungen 2001 hatte keinen Einfluss auf die Fruchtqualitätsparameter Gewicht, Umfang (Ergebnisse nicht gezeigt), Festigkeit (Abb. 18), Zucker und Säure der Äpfel aus dem Versuch in Klein-Altendorf (Abb. 19). Lediglich bei der Fruchtfarbe wurden Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet. Die Festigkeit und die L* a* b*-Farbwerte wurden auf der grünen (Schatten-) Seite des Apfels gemessen, um Veränderungen durch die Sonne (evtl. Sonnenbrand) auszuschließen.

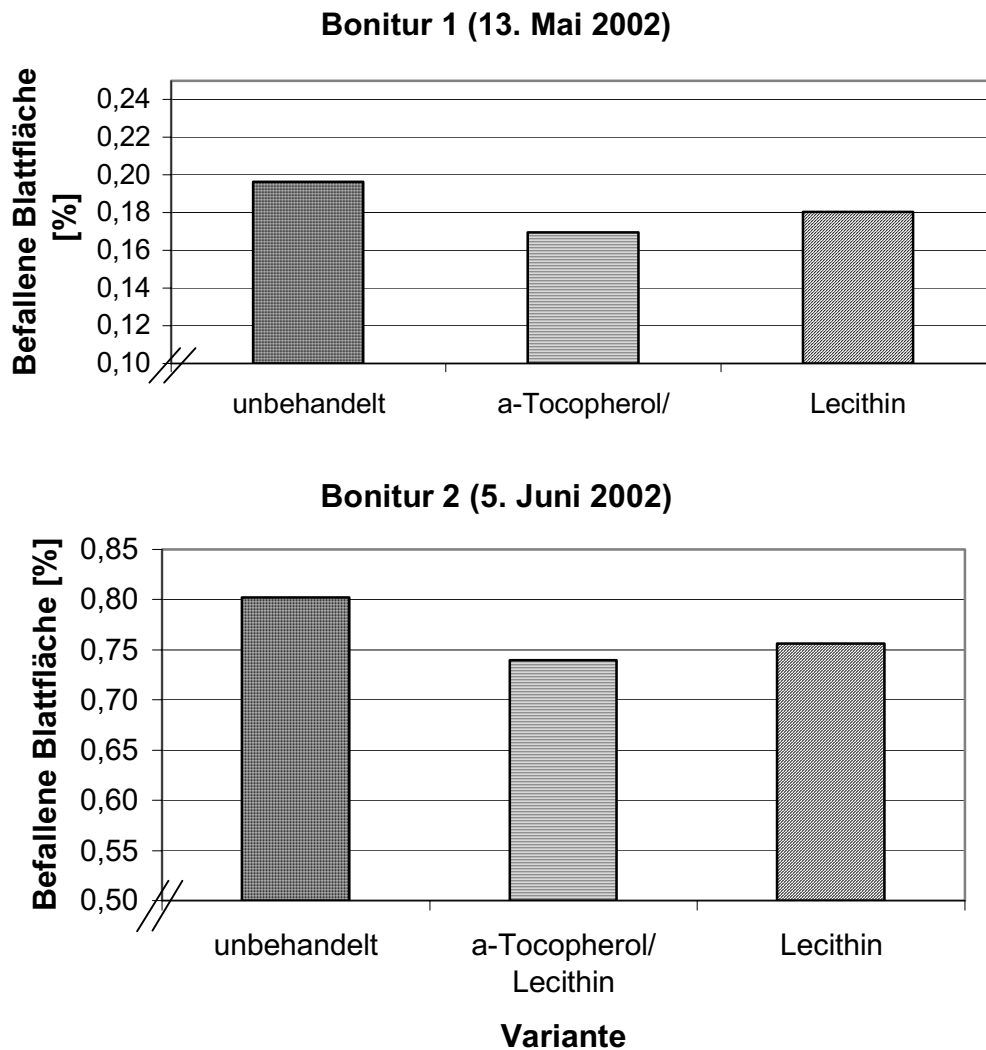


Abb. 17: Einfluss der Behandlungslösungen auf den Befall der Blattober- und Unterseite von Apfelbäumen im Freiland am 13. Mai (Bonitur 1) und am 5. Juni. $MW \pm SF$, Tukey $p \leq 0,05$; $n=12$.

Zucker- und Säuregehalt

Der Zuckergehalt der beprobten Äpfel lag bei durchschnittlich 12,5 %, der Säuregehalt bei 0,05 %. Bei keinem der Parameter konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abb. 19).

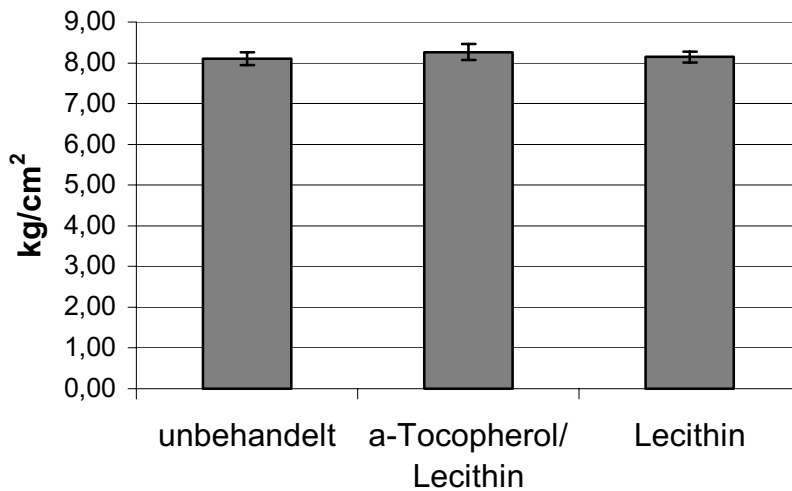


Abb. 18: Einfluss von α -Tocopherol und Lecithin auf die Festigkeit [kg/cm²] von Apfelfrüchten. MW \pm SF, Tukey $p \leq 0,05$; n=30.

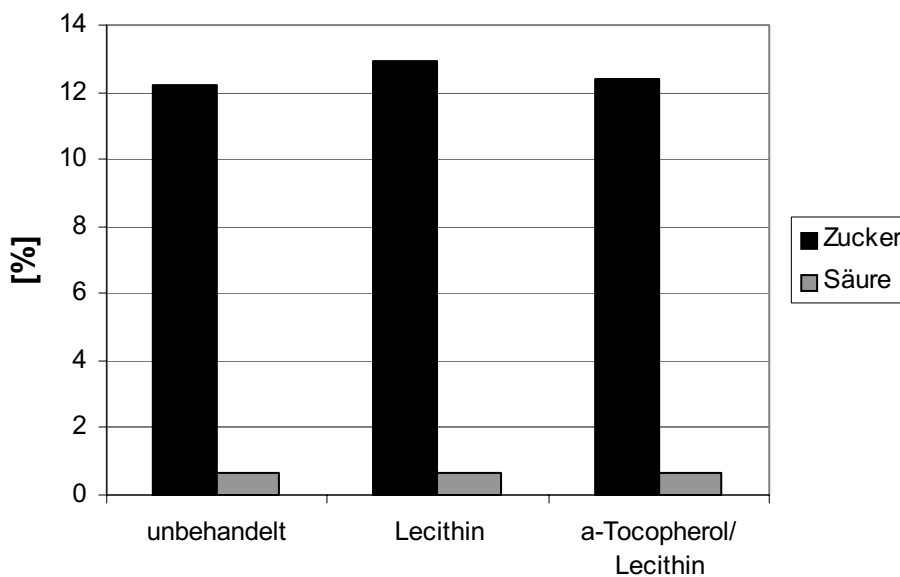


Abb. 19: Einfluss von α -Tocopherol und Lecithin auf den Zucker- und Säuregehalt [%] von Apfelfrüchten. MW, n = 30.

Farbe

Bei der Schalengrundfarbe der Äpfel wurden bei dem Parameter L* signifikante Unterschiede gemessen (Tab. 5). Der erhöhte L*-Wert der unbehandelten Äpfel gibt an, dass diese heller als die beiden behandelten Varianten sind. In den Parametern a* und b* wurden keine Unterschiede festgestellt.

Tab. 5: Einfluss der Behandlungslösungen auf die Schalengrundfarbe zum Erntetermin an Äpfeln (L* a* b*-Wert), gemessen an der grünfarbigen Seite. MW \pm SF, Tukey p \leq 0,05; n=32.

Variante	L*	a*	b*
Unbehandelt	71,76 \pm 0,4 b	-17,48 \pm 0,2 a	41,32 \pm 0,3 a
α -Tocopherol/Lecithin	68,93 \pm 0,4 a	-18,80 \pm 0,4 a	40,74 \pm 0,4 a
Lecithin	67,60 \pm 0,8 a	-16,75 \pm 0,5 a	41,85 \pm 0,6 a

L* = Helligkeit, a* = blau-grün/rot-lila Farbkomponente, b* = gelb/blau Farbkomponente.

4 Diskussion

Im ökologischen Obstbau wird der Apfelschorferreger *V. inaequalis* fast ausschließlich mit Hilfe von zahlreichen Kupferapplikationen bekämpft. Der Einsatz von Kupfer ist aus ökologischer Sicht jedoch besonders umstritten. Da gesetzliche Restriktionen hinsichtlich der Einsatzmenge (zurzeit maximal 3 kg a.i./ha) zu erwarten sind, werden Alternativen für den Einsatz von Kupfer gesucht.

In Vorversuchen zeigte sich, dass die Behandlung von Apfelbäumen mit α -Tocopherol zu einer Reduktion des Schorfbefalls führt. In weiteren Untersuchungen wurde die Wirksamkeit des Präparates getestet.

Das α -Tocopherol/Lecithin-Präparat reduzierte den Blattbefall von *Venturia inaequalis* bei protektiver Applikation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um bis zu 80%. Die Lecithinbehandlung wies eine sehr hohe Eigenwirkung Effekte auf. Die fungizide Wirkung des Lecithins ist bereits bekannt und wird im Bereich der Kontrolle 'Echter Mehlaupilze' und des 'Tabakmosaikvirus' an verschiedenen Wirten eingesetzt. (BOSSHARD et al., 1994) beobachteten unter kontrollierten Bedingungen nach Applikation von Lecithin deutliche Befallsreduktionen des Apfelschorfs. Bei der Übertragung dieser Versuche ins Freiland konnten die positiven Effekte nicht bestätigt werden. Diese reduzierte Wirksamkeit führen die Autoren auf eine geringe Regenfestigkeit des Präparates zurück.

Als Folge der Applikation von α -Tocopherol und Lecithin konnte in diesen Untersuchungen keine Beeinflussung der Keimrate der Sporen beobachtet werden. Hingegen wurden nachfolgende Entwicklungsstadien auf der Blattoberfläche, wie Keimschlauchentwicklung und Bildung von Appressorien, sehr wohl verändert. Der Infektionserfolg der Konidien von *V. inaequalis* wurde verringert und als Folge dessen die subcuticuläre Ausbreitung des Erregers eingeschränkt.

Durch Veränderungen der Blattoberfläche als Folge der Applikation der beiden Applikationslösungen verblieben nach der Inokulation nur etwa 10 % der Konidien auf den Sämlingsblättern. Die Oberflächeneigenschaften des Blattes wurden verändert, so dass anstelle der Tropfen, welche auf unbehandelten Blättern nach dem Aufsprühen der Inokulationssuspension zurückblieben, auf behandelten Blättern ein dünner Film entstand (Abb. 10). So liefen mehr Konidien ab, und zusätzlich trocknete der dünne Flüssigkeitsfilm

schneller an, wodurch die Blattnässedauer verkürzt wurde. Den wenigen verbliebenen Konidien stand demnach eine kürzere Zeit für Keimung, Ausbildung von Appressorien und Penetration der Cuticula zur Verfügung, da für diese Entwicklungsstadien eine ausreichende Blattnässedauer Grundvoraussetzung ist. Durch die schnellere Abtrocknung der Inokulationssuspension auf den behandelten Pflanzen wurde dieser Zeitraum teilweise unterschritten, wodurch weniger Konidien die Cuticula erfolgreich penetrieren konnten, und die Primärstromabildung deutlich reduziert wurde (MACHARDY 1996) (HARTMANN et al., 1999).

Das Tocopherol-Präparat wurde zudem nur zu einem sehr geringen Teil vom Blatt abgewaschen. Bisher unveröffentlichte Untersuchungen zur Regenfestigkeit (FÖRSCHLER und SCHMITZ-EIBERGER) haben gezeigt, dass der Spritzbelag in Kombination mit α -Tocopherol sich als sehr regenbeständig herausgestellt hat.

Nach Behandlung der Pflanzen mit α -Tocopherol/Lecithin und Lecithin wurden verlängerte Keimschläuche sowie eine reduzierte Anzahl von Konidien mit Appressorien beobachtet. Bei Sporenkeimung, Keimschlauchwachstum und Appressorien spielen häufig Signale auf der Pflanzenoberfläche eine bedeutende Rolle (DEAN 1997; TUCKER et al., 2001). Zur Initiation verschiedener Entwicklungsphasen auf der pflanzlichen Oberfläche benötigen zum Beispiel Rostpilze spezifische topographische Signale (HEATH 1997). Für *Venturia inaequalis* sind keine genauen Angaben zur Art der Oberflächensignale zu finden; aber auch dieses Pathogen muss seinen Wirt anhand bestimmter Eigenschaften auf der Cuticula identifizieren können. Diese spezifischen Signale werden durch α -Tocopherol und Lecithin möglicherweise so verändert, dass die Keimschläuche keinen Impuls für die Bildung des Appressoriums erhalten und deshalb suchend weiterwachsen (TUCKER et al., 2001). Möglicherweise kann in diesem Zusammenhang auch ein weiterer Interpretationsansatz für die geringe Retention der Konidien suspension nach der Inokulation angenommen werden. Die Veränderung der spezifischen Signale auf der Oberfläche der Apfelsämlinge könnte die Ausbildung von Substanzen, wie z.B. Melanin unterbinden, welche zur Haftung der Appressorien von *Venturia inaequalis* synthetisiert werden, so dass weniger Sporen auf der Oberfläche verbleiben (MACHARDY 1996; STEINER et al., 2001).

α -Tocopherol aber auch Phosphatidylsäuren bzw. Phospholipide (Lecithin) sind natürlich auftretende Bestandteile von pflanzlichen Zellmembranen und können aus diesem Grund nach exogener Applikation Verbindungen mit der Cuticula und der Plasmamembran eingehen und so die Eigenschaften der Blattoberfläche verändern (FRYER 1992; HESS 1993). Diese Modifikationen erschweren möglicherweise die Penetration des Erregers durch die obersten Schichten des Blattes, welche *V. inaequalis* von dem zwischen Cuticula und Epidermiszellen liegenden Lebensraum trennen. Dies ist ein weiterer Erklärungsansatz für die reduzierte Anzahl erfolgreicher Infektionsstellen als Folge der Behandlung von Apfelsämlingen mit den Applikationslösungen.

Als Folge exogener Applikation von α -Tocopherol bzw. der Leerformulierung traten auf der Blattoberfläche Deformationen an Keimschläuchen auf. Diese Veränderungen lassen eine direkte fungizide Wirkung der Substanzen auf die Keimschlauchbildung vermuten. Sowohl α -

Tocopherol als auch die Phosphatidylsäuren aus dem Lecithin sind Bestandteile biologischer Membranen und Zellwände und können auch in die Membranen des Pathogens eingelagert werden (PRIOR ET AL., 1993). Zwischen Vitamin E und freien Fettsäuren kann es zur Bildung höherer Aggregate kommen, deren Wirkungsweise nicht bekannt ist (ALSCHER et al., 1993). Möglicherweise verursachte diese Veränderung der Membranstabilität und -permeabilität Wachstumsstörungen während der Keimschlauchbildung und rief so die beobachteten geweihartigen Verzweigungen und andere Deformationen der Keimschläuche hervor.

Die erhöhte Stabilität der Membranen durch die erwähnte Einlagerung von α -Tocopherol und Phosphatidylsäuren bewirkte unter Umständen eine verringerte Verfügbarkeit von Wirtsassimilaten für den Erreger, als Folge derer die wenigen erfolgreichen Infektionsstellen ein verlangsamtes subcuticuläres Wachstum und eine deutlich verringerte Sporulation aufweisen. ORTEGA et al. (1998) beschreibt eine Verzögerung der subcuticulären Entwicklungsstadien von *Venturia inaequalis* durch eine verringerte Versorgung des Erregers mit Assimilaten des Wirtes nach Resistenzinduktion.

Die antioxidative Wirkung von α -Tocopherol als Radikalfänger zur Minderung oxidativen Stresses wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (FRYER 1992; SCHMITZ et al., 1998) (SCHMITZ-EIBERGER et al., 2001A). Pathogenstress bewirkt in Wirtspflanzen oftmals Veränderungen des antioxidativen Systems. Die Bedeutung der entstehenden Radikale wird in der Literatur vielfältig diskutiert (EDREVA et al., 1989; VANACKER et al., 1998a; ELSTNER et al., 1994). So kann durch H_2O_2 -Produktion der Erreger direkt getötet, eine Hypersensitivitätsreaktion hervorgerufen oder die Transkription der Gene, welche Enzyme der Phytoalexin- und Lignin-Biosynthese aktivieren, gefördert werden (EL-ZAHABY et al., 1995; BAKER et al., 1995). Die Folgen der Infektion können durch exogene Applikation verschiedener Antioxidantien unterbunden werden, welche die Wirkung der zur Infektion notwendigen oxidativen Sauerstoffspezies aufheben (GÖNNER et al., 1993). Im Gegensatz zu vielen anderen Erregern tötet *Venturia inaequalis* keine Wirtszellen ab, sondern verhält sich während seiner asexuellen Phase als obligater Parasit mit biotropher Ernährungsweise (MACHARDY et al., 2001). Aus diesem Grund ist ein Vergleich des Einflusses exogen applizierter Antioxidantien auf den Infektionszyklus von *Botrytis cinerea* mit der Wirkung von α -Tocopherol auf die Wirt-Parasit Beziehung *Malus domestica* – *Venturia inaequalis* nicht möglich.

Die Messung des CF-Parameters Fv/Fm ergab drei Tage nach Inokulation noch keine Störung im Photosyntheseapparat und sieben Tage nach Inokulation gab es nur einen leichten Abfall des Parameters Fv/Fm durch die Pilzinfektion. Vierzehn Tage nach der Inokulation war der Elektronentransport durch die Infektion mit *V. inaequalis* signifikant gestört. Der Chlorophyllgehalt veränderte sich nicht innerhalb der verschiedenen Varianten. Diese Ergebnisse weisen in diesem Experiment auf eine höhere Sensibilität der Chlorophyllfluoreszenzmessung verglichen mit der Chlorophyllgehaltsmessung bei der Beurteilung von Stresssituationen in der Pflanze hin. Die reduzierte photosynthetische Wirksamkeit kann mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies erklärt werden, die hier eine Folge der nekrotischen Läsionen sein könnten. RUSTERUCCI et al. (1996) vermuteten,

dass das Auftreten von Nekrosen, Lipidperoxidation und die Produktion von AOS miteinander verbunden sind.

Bezüglich des Tocopherolgehaltes zeigten Pflanzen, die mit α -Tocopherol/Lecithin vorbehandelt wurden, 3 und 7 Tage nach der Inokulation höhere Gehalte im Vergleich zu allen anderen Pflanzen. Grund für die erhöhten Tocopherolgehalte sind möglicherweise die äußerlich applizierten Fraktionen. Der Tocopherolgehalt sowohl der unbehandelten und infizierten als auch der mit Lecithin behandelten und infizierten Variante war während des gesamten Beobachtungszeitraum niedriger als in den beiden anderen Pflanzengruppen. Dies zeigte, dass hier die Infektion mit dem Pilz zu einer Abnahme des Tocopherolgehaltes führte. Der α -Tocopherolgehalt in den mit Tocopherol behandelten Blättern ist 14 Tage nach Inokulation, im Gegensatz zu den anderen infizierten Pflanzen, auf dem gleichen Niveau wie in den nicht infizierten Pflanzen. Somit stehen bei Anwendung der Antioxidantienlösung noch größere Tocopherolreserven zur Verminderung von oxidativem Stress zur Verfügung. Vitamin E ist ein hoch effizientes Antioxidans, welches als Radikalfänger fungiert, wobei es selbst zum Tocopheroxyradikal umgewandelt wird. Die Ascorbinsäure hat eine synergistische Funktion zum α -Tocopherol, da sie das Tocopheroxyradikal in seine Ursprungsform regenerieren kann (FOYER et al., 1991; SMIRNOFF et al., 2000). Durch diesen Prozess schützt α -Tocopherol Zellmembranen vor Beschädigungen (FRYER 1992). Sowohl der Tocopherol- als auch der Ascorbinsäurevorrat sinken bei der übermäßigen Produktion von singulärem Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) (SCHMITZ-EIBERGER et al., 2002). Vierzehn Tage nach der Inokulation sanken der Tocopherol- und der Ascorbatgehalt der unbehandelten und infizierten und mit Lecithin behandelten und infizierten Pflanzen als Folge der Bildung von freien Radikalen und der anschließenden Aktivierung des Abwehrsystems der Pflanze signifikant ab. Drei Tage nach der Inokulation bewirkte die Infektion mit *V. inaequalis* einen Anstieg der L-AA und DHA. Grund für diesen Anstieg könnte eine Reaktion der Pflanze auf die Infektion sein, bei der die Ascorbatproduktion aktiviert wird. Der Ascorbatvorrat der Pflanzen, die mit α -Tocopherol/Lecithin behandelt wurden, blieb fast auf dem gleichen Niveau wie die Kontrollpflanzen. Somit waren Pflanzen, die mit dem Antioxidans behandelt wurden, weniger stark von der Pilzinfektion und beeinträchtigt und schienen vitaler. Diese Annahme wird durch die Messungen des Pflanzenwachstums bestätigt, bei der die mit α -Tocopherol/Lecithin behandelten Pflanzen tendenziell ein verstärktes vegetatives Wachstum aufwiesen, als die unbehandelten und mit Lecithin behandelten Pflanzen.

Das Pflanzenenzym Peroxidase (PO) katalysiert die Zerlegung von Wasserstoffperoxid in Sauerstoff und Wasser und detoxifiziert somit die Pflanzenzellen. Die Peroxidaseaktivität der infizierten und unbehandelten Gruppe war vom 7. Tag nach der Inokulation an gestiegen. Der Grund dafür könnte ein höherer Gehalt an H_2O_2 sein, das häufig bei dem Auftreten von oxidativem Stress akkumuliert wird. Die geringe PO-Aktivität von nach α -Tocopherol/Lecithin- und Lecithin-Behandlungen ist mit den verringerten Pflanzenschäden aufgrund der Befallsreduktion zurückzuführen und demonstriert somit die Wirksamkeit der Applikationslösungen.

Das Enzym Lipoxygenase (LOX) katalysiert die Oxidation von vielfach ungesättigten Fettsäuren, wie Linolsäure und Linolensäure und deren Ester zu den dazugehörigen Peroxiden (SURREY 1964). Solche Fettsäurehydroperoxide sind mögliche Initiatoren von

Kettenreaktionen freier Radikale in biologischen Systemen (KACPERSKA et al., 1985). Unter anderem kann die Aktivität des Enzym durch Pathogenbefall reguliert werden. Es scheint ebenso eine Rolle während des hypersensitiven Zelltods zu spielen (ROSAHL 1995). Hohe LOX-Aktivitäten wie sie in der unbehandelten und infizierten Blättern gemessen wurden, weisen auf eine häufige Oxidation von ungesättigten Fettsäuren hin, was wiederum zu Membranschäden führen kann. Eine niedrige LOX-Aktivität kann sich bei der Anwesenheit von Antioxidantien einstellen (PINSKY et al., 1971; PINSKY et al., 1971; PRUSKY 1988). Auch in unseren Experimenten reduzierte die exogene Applikation von α -Tocopherol und Lecithin die LOX-Aktivität. Die geringeren LOX-Gehalte können ebenso mit der Befallsreduktion nach Vorbehandlung der Blätter, den damit verbundenen geringer ausfallenden Schaden an der Pflanze und dem damit wiederum vermindertem oxidativen Stress erklärt werden.

Da es viele Pathogene gibt, die bei der Infektion einen plötzlichen und starken Anstieg von aktiven Sauerstoffspezies (oxidative burst) verursachen, schien es möglich, dass dies auch bei dem Befall mit *Venturia inaequalis* der Fall ist. Es zeigte sich jedoch anhand von Messungen der Stressindikatoren CF, PO und LOX, dass ein oxidativer Stress frühestens 7 Tage nach der Inokulation in der Pflanze bemerkbar ist, wenn die ersten Konidiophoren die Cuticula durchbrochen hatten. Diese späte Reaktion der Pflanze auf die pilzliche Infektion könnte an dem subkutikulärem Wachstum und der Ernährungsweise des Pilzes liegen, bei der die Wirtszellen nicht abgetötet werden. Somit könnte es sein, dass die Pflanze den Erreger in den frühen Infektionsstadien nicht erkennt. Da erste Reaktionen der infizierten Apfelblätter erst aktiviert werden, wenn die Konidiophoren durch die Cuticula penetrieren, scheint diese keine Reaktion der HR (hypersensitive response) zu sein, sondern eher eine Konsequenz von Gewebeschäden, die durch *V. inaequalis* hervorgerufen wurden und zu Nekrosen an den Blättern führten. Dies bedeutet für die Pflanze eine Art Trockenstress, verbunden mit der Bildung von freien Radikalen, bei dem der Einsatz des Antioxidans α -Tocopherol durchaus sinnvoll ist.

Bei der Anwendung der Applikationslösungen im Freiland kann keine eindeutige Beurteilung abgegeben werden, da im Versuchsjahr 2002 mit optimalen Bedingungen für den Erreger eine wirksame Schorfbekämpfung allgemein sehr problematisch war. Durch die sehr schnelle Verbreitung des Erregers auf den unbehandelten Kontrollpflanzen wurde das Infektionspotential nochmals erhöht und breitete sich auf die nahe stehenden, behandelten Bäume aus. Aufgrund des übermäßigen Befalls wurde der Versuch frühzeitig abgebrochen. Bis zu diesem Zeitpunkt (17. Mai) wurden 7 Spritzungen durchgeführt, so dass bei den gegebenen Infektionsbedingungen von einer höheren Anzahl von Spritzungen bis zum Ende der Infektionsgefahr ausgegangen werden muss.

Die Untersuchungen des in Klein-Altendorf durchgeführten Versuches 2001 zu den Fruchtqualitätsparametern ergaben, dass es durch die Applikation mit dem Antioxidantienpräparat und der Leerformulierung zu keinen Veränderungen in den gemessenen Parametern Gewicht, Umfang, Festigkeit, Zucker und Säure kam.

5 Zusammenfassung

Die Vorbehandlungen mit α -Tocopherol und Lecithin minderten den Befall mit *Venturia inaequalis* an *M. domestica*-Sämlingen um 80 % und an Containerbäumen im Freiland um 50 % im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Untersuchungen auf dem Versuchsgelände in Klein-Altendorf ergaben keine zufriedenstellenden Ergebnisse, was an der feuchten, kühlen Witterung und dem damit verbundenen hohen Infektionspotential mit *V. inaequalis* lag.

Letztendlich ergaben sich mehrere Möglichkeiten, warum die Applikation mit Lecithin und α -Tocopherol durch *V. inaequalis* verursachte Schäden vermindert, die vermutlich alle an der Befallsreduktion beteiligt sind.

Zum einen (1) entstand durch die Applikationslösungen eine Veränderung der Membran, die einerseits dem Pilz die Orientierung nimmt. Andererseits (2) könnten Einlagerungen der Behandlungsmittel in die Cuticula und Plasmamembran den Lebensraum von *V. inaequalis* modifizieren. Ein weiterer Ansatz ist (3) das durch α -Tocopherol und Lecithin hervorgerufene, schnellere Abtrocknen der Blätter. Hierdurch wird sowohl die Zeit, die der Pilz zum Keimen benötigt, verkürzt, als auch ein Abfließen der Konidien vom Blatt verursacht. Bezüglich der antioxidativen Wirkung von Tocopherol tritt die positive Wirkung erst in einem sehr viel späteren Stadium auf, wenn die Konidiophoren bereits die Cuticula penetriert haben. In diesem Fall kommt es durch das Auftreten von freien Radikalen zu Nekrosen und zu einem sogenannten oxidativen Stress, und durch die antioxidative Tätigkeit des exogen zugeführten Tocopherols wird das antioxidative Abwehrsystem unterstützt.

Die Wirksamkeit der beiden Applikationslösungen scheint zunächst sehr ähnlich. Ein Vorteil der α -Tocopherol/Lecithin-Lösung gegenüber der Lecithinlösung alleine ist die antioxidative Wirkung des Vitamins, was zu einer Steigerung der pflanzlichen Abwehr, auch gegenüber abiotischen Stressoren (z. B. UV-Stress) führt (SCHMITZ-EIBERGER et al., 2000). Auch die sehr gute Regenbeständigkeit spricht für die Anwendung des α -Tocopherol-Präparates unter Praxisbedingungen im Freiland. Durch die gesteigerte Regenbeständigkeit würde eine geringere Anzahl an Behandlungen im Vergleich zur Lecithinformulierung benötigt.

6 Schlussfolgerungen für die Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis

Die Behandlung mit dem Tocopherol-Präparat zeigte sowohl unter kontrollierten Bedingungen also auch an Containerbäumen unter Freilandbedingungen eine gute Wirkung bei der Reduzierung der mit Apfelschorf befallenen Blattfläche. Der hohe Wirkungsgrad (50-90%) und die Wirkungsdauer von durchschnittlich 14 Tagen sind gute Voraussetzungen für die Bekämpfung von Apfelschorf im Freiland. Da die Applikationslösungen im biologisch dynamischen Anbau zugelassen sind, stellen sie somit eine mögliche Alternative für bislang verwendete Kupfersalze dar. Durch das Tocopherol-Präparat könnten auch andere nützliche Nebeneffekte, wie z.B. der Schutz vor UV-B-Strahlung (SCHMITZ et al., 1998) für den Anbauer von Interesse sein. Da die Nachfrage von organisch produzierten Erzeugnissen hoch ist, scheint die Anwendung der vorgestellten Präparate ökologisch wie ökonomisch sinnvoll. Es ist dabei allerdings zu berücksichtigen, dass in dem Freilandversuch im Jahr 2002 aufgrund des übermäßig hohen Infektionspotenzials weder durch das Tocopherolpräparat noch durch die LF ein hoher Wirkungsgrad erreicht werden konnte. Allerdings haben im Versuchsjahr 2002 auch die synthetischen Präparate (Fungizide) nur einen unzureichenden Wirkungsgrad ergeben. Aufgrund der vielversprechenden Effekte und der Kenntnis der Wirkungsmechanismen, die eine zielgerichtete Optimierung erlauben, ist eine weitere Verbesserung der Präparate auf der Basis bereits vorliegender Versuche im Interesse des ökologischen Obstbaus (Kupferverbot) zwingend geboten.

7 Literaturverzeichnis

- BBA. 1999: Richtwerte für Schwermetallrückstände in Lebensmitteln; Mitteilungen des Bundesgesundheitsamtes 1999.
- BBÖ. 1998: Beratungsdienst ökologischer Obstbau e.V., 1998: Marktübersicht über den Obstbau Weinbsberg.
- ALSCHER R.G. and HESS J.L. 1993: Antioxidants in higher plants. CRC press, Inc., Boca Raton.
- BAKER C.J. and ORLANDI E W. 1995: Active Oxygen in Plant Pathogenesis. Annu. Rev. Phytopathol., 33: 299-321.
- BLANKE M.M. 1990: Determination of chlorophyll with DMF. Vitic. Enol. Sci., 45: 76-78.
- BLANKE M.M. 1992: Determination of chlorophyll using DMSO. Vitic. Enol. Sci., 47: 32-35.
- BOSSHARD E. and SCHÜPP H. 1994: Die Wirkung natürlicher Substanzen für die Regulierung von Apfelschorf. Obst-Weinbau, 22: 528-530.
- CROFT K.P.C., VOISEY C.R., and SLUSARENKO A.J. 1990: Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 36: 49-62.
- DEAN R.A. 1997: Signal pathways and appressorium morphogenesis. Ann. Rev. Phytopathol., 35: 211-234.
- EDREVA A.M., GEORGIEVA I.D., and CHOLAKOVA N.I. 1989: Pathogenic and non-pathogenic stress effects on peroxidases in leaves of tobacco. Environmental and Experimental Botany, 29: 356-377.
- EL-ZAHABY H.M., GULLNER G., and KIRÁLY Z. 1995: Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host-pathogen interactions. Biochemistry and Cell Biology, 85: 1225-1230.
- ELAD Y. 1992: The use of antioxidants (free radical scavengers) to control grey mould (*Botrytis cinerea*) and white mould (*Sclerotinia sclerotiorum*) in various crops. Plant Pathology, 41: 417-426.
- ELSTNER E.F. and OSSWALD W. 1994: Mechanisms of oxygen activation during plant stress. Proceedings of the Royal Society of Edinburgh, 102B: 131-154.

- FOYER C.H., LELANDAIS M., EDWARDS E.A., and MULLINEAUX P.M. 1991: The role of ascorbate in plants, interactions with photosynthesis, and regulatory significance. *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism*, E Pell, K Steffen, eds, Copyright 1991 American Society of Plant Physiologists: 131-145.
- FRYER M.J. 1992: The antioxidant effects of thylakoid Vitamin E (α -tocopherol). *Plant, Cell and Environment*, 15: 381-392.
- GÖNNER v.M. and SCHLÖSSER E. 1993: Oxidative stress in interactions between *Avena sativa* L. and *Drechslera* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42: 221-234.
- HARTMANN J.R., PARISI L., and BAUTRAIS P. 1999: Effect of leaf wetness duration, temperature, and inoculum dose on apple scab infections. *Plant Dis.*, 83: 531-534.
- HEATH M.C. 1997: Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. *Ann. Botany*, 80: 713-720.
- HESS J.L. 1993: Vitamin E, α -Tocopherol. In: *Antioxidants in higher plants*. Alscher, R.G., Hess, J.L. (Eds). CRC Press, Inc., Boca Raton.
- HOCK B. und ELSTNER E.F. 1995: *Schadwirkungen auf Pflanzen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 3., überarb. Auflage, ISBN 3-86025-649-1.
- HOOD M.-E. and SHEW H.-D. 1996: Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathol.*, 86: 704-708.
- JONES A.L. 1998: Apple scab: role of environment in pathogen and epidemic development. In: *The Epidemiology of Plant Diseases*. Edited by D. Gareth Kluwer Publishers, Dordrecht, ISBN 0-89054-109-4.
- KACPERSKA A. and KUBACKA-ZEBALSKA M. 1985: Is lipoxygenase involved in the formation of ethylene from ACC? *Physiol. Plant.*, 64: 333-338.
- KENNEL W. und MOOSHERR W. 1983: Kelchblatt-Schorf, eine gefährliche aber wenig bekannte Erscheinungsform des Apfelschorfs. *Obstbau*, 8: 470-472.
- LAMB C. and DIXON R.A. 1997: The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 251-275.
- MACHARDY W.E. 1996. *Apple scab-biology, epidemiology, and management*. APS Press St. Paul; Minnesota; ISBN 0-89054-206-6.
- MACHARDY W.E., GADOURY D.M., and GESSLER C. 2001: Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: relationship to disease management strategies. *Plant Disease*, 85: 1036-1051.

- McGUIRE R.G. 1992: Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27: 1254-1255.
- ORTEGA F., STEINER U., and DEHNE H.-W. 1998: Induced resistance to apple scab: Microscopic studies on the infection cycle of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *J. Phytopathology*, 146: 399-405.
- PINSKY A., GROSSMAN S., and TROP M. 1971: Lipoxygenase content and antioxidant activity of some fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 36: 571-572.
- PRIOR S.L., CUNCLIFFE B.W., ROBSON G.D., and TRINCI A.P.J. 1993: Multiple isomers of phosphatidyl inositol monophosphate and inositol bis and triphosphates from filamentous fungi. *FEMS-Microbiology-Letters*, 110: 147-152.
- PRUSKY D. 1988: The use of antioxidants to delay the onset of anthracnose and stem end decay in avocado fruits after harvest. *Plant Disease*, 2: 381-384.
- RENGER G. and SCHREIBER U. 1986: Practical applications of fluorometric methods to algae and higher plants research. In: Govindjee, J.A. and Fork, D.C. (eds.): *Light Emission by Plant and Bacteria.*, Academic Press New York: 547-619.
- ROSAHL S. 1995: Lipoxygenases in plants – their role in development and stress response. *Z. Naturforsch.*, 51c: 123-138.
- RUSTERUCCI C., STALLAERT V., MILAT M.-L., PUGIN A., RICCI P., and BLEIN J.-P. 1996: Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.*, 111: 885-891.
- SCHMITZ-EIBERGER M., HAEFS R., and NOGA G. 2002: Calcium deficiency – influence on the antioxidative defense system in tomato plants. *J. Plant Physiol.*, 159: 733-742.
- SCHMITZ-EIBERGER M. and NOGA G. 2000: Quantification and reduction of UV-B induced plant damage in *Phaseolus vulgaris* leaves and *Malus domestica* fruits and leaves. *Proceedings 13th International IFOAM Scientific Conference*. Alföldi, T., Lockeretz, W. and Niggli, U. (eds.), VDF Hochschulverlag, Zürich.
- SCHMITZ-EIBERGER M. and NOGA G. 2001a: Quantification and reduction of UV-B induced plant damage in *Phaseolus vulgaris* leaves and *Malus domestica* fruits. *J. Applied Botany*, 75: 53-58.
- SCHMITZ-EIBERGER M. and NOGA G. 2001b: Reduction of paraquat-induced oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* and *Malus domestica* leaves by α -tocopherol. *Scientia Horticulturae*, 91: 153-167.
- SCHMITZ-EIBERGER M. and NOGA G. 2001c: UV-B radiation - Induced oxidative stress

- and antioxidative defence in *Phaseolus vulgaris* leaves. *J. Applied Botany*, 75: 210-215.
- SCHMITZ M. and NOGA G. 1997: Vorkommen, Chemie und Wirkungsweise bedeutender Antioxidantien in Pflanzen. *Erwerbsobstbau*, 39: 162-168.
- SCHMITZ M. and NOGA G. 1998: α -Tocopherol reduced environmental stress and improved fruit quality. *Acta Hort.*, 466: 89-94.
- SCHMITZ M. and NOGA G. 2000: Tocopherol and its potential for improving fruit quality in apple. *Acta Hort.*, 527: 111-117.
- SCHREIBER U., BILGER W., and NEUBAUER C. 1995: Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: E.-D. Schulze and M.M. Caldwell (eds.), *Ecophysiology of Photosynthesis*, 49-70. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- SIES H. 1986: Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.*, 98: 1061-1075.
- SMIRNOFF N. and WHEELER G.L. 2000: Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19: 267-290.
- STEINER U. and OERKE E.C. 2001: The role of melanin in the infection process of *Venturia inaequalis*. *Phytopathol.*, 91: 85.
- SURREY K. 1964: Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiology*, 39: 65-70.
- SUTHERLAND M.W. 1991: The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39: 79-93.
- TUCKER S.L. and TALBOT N.J. 2001: Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 39: 358-417.
- VANACKER H., FOYER C.H., and CARVER W.T.L. 1998a: Changes in apoplastic antioxidants induced by powdery mildew attack in oat genotypes with race non-specific resistance. *Planta*, 208: 444-452.
- VANACKER H., HARBINSON J., RUISCH J., CARVER T.L.W., and FOYER C.H. 1998b: Antioxidant defences of the apoplast. *Protoplasma*, 205: 129-140.
- WOJTASZEK P. 1997: Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.*, 322: 681-692.

8 Anhang

9 Konsequenzen für weitere Forschungsarbeiten

Für eine genauere Beurteilung des Wirkungsgrads der Applikationslösungen im Freiland müssten weitere Versuche durchgeführt werden, bei der eine unbehandelte Kontrollvariante durch eine Fungizidbehandlung ersetzt werden könnte, um nicht das Infektionspotential des Erregers unnötig zu erhöhen. Des Weiteren könnte eine Optimierung des α -Tocopherol/Lecithin-Präparates erfolgen, dass die positiven Eigenschaften (antioxidativ wirksames Potential Regenfestigkeit, Anwenderfreundlichkeit, Eignung für den biologischen Obstbau) vereint.

10 Mitteilung über schützenswerte Nutzungsrechte

Keine

11 Liste über Veröffentlichungen

FÖRSCHLER A., U. STEINER, M. SCHMITZ-EIBERGER, G. NOGA: Reactions of the antioxidant system of apple plants during infection with *Venturia inaequalis*. (submitted)

PORTZ C., 2002: *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. beim Apfel: Bedeutung der Konidien als Primärinokulum, Einfluss auf die Knospenentwicklung und Alternativen zum Kupfereinsatz bei der Kontrolle des Blatt- und Fruchtschorfbefalls. Inaugural-Dissertation, vorgelegt am 04.11.2002.

12 Liste über Vorträge

FÖRSCHLER A., M. SCHMITZ-EIBERGER, G. NOGA: Veränderung der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung ausgewählter Antioxidantien in Abhängigkeit eines *Venturia inaequalis*-Befalls bei Apfelsämlingen. Vortrag auf der 39. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung, 27.02.-01.03.2002, Braunschweig.

FÖRSCHLER A., U. STEINER, M. SCHMITZ-EIBERGER, G. NOGA: Wirkung von α -Tocopherol beim Apfel/*Venturia inaequalis* Wirt/Parasit-System. Vortrag auf der 40. Gartenbauwissenschaftl. Tagung, 26.02.-28.02.2003, Freising-Weißenstephan.

PORTZ C., M. SCHMITZ-EIBERGER, U. STEINER, G. NOGA: Einfluss eines Antioxidantien-Präparates auf die Entwicklung von *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.. Vortrag auf der 53. Deutschen Pflanzenschutztagung in Bonn, 16.-19. September 2002.

PORTZ C., M. SCHMITZ-EIBERGER, U. STEINER, G. NOGA: Einfluss von Tocopherol auf Befallsstärke und Entwicklungszyklus von *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. bei Apfelsämlingen. Vortrag auf der 39. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung, 27.02.-01.03.2002, Braunschweig.

13 Liste über Pressemitteilungen

Keine

14 Liste über Posterpräsentationen, Vorführungen und Demonstrationen

PORTZ, C., STEINER U., NOGA G., 2001: Nachweis und Kontrolle primärer Inokulumquellen von *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. bei Apfel. BDGL-Tagungsband 19/2001. Poster auf der 38. Gartenbauwissenschaftlichen Tagung, 28.02.-02.03.2001, Osnabrück.

Tag der offenen Tür in Klein-Altendorf (22.9.2002)

15 Kurzfassung

Im ökologischen Obstbau stellt der Apfelschorf (*Venturia inaequalis* (Cke.) Wint.) das mit Abstand größte Problem dar. Die Bekämpfung des pilzlichen Erregers trägt in erheblichem Maß zu den hohen Aufwandmengen an Kupfer bei (mind. 1,4 kg/ha Kupfersalze pro Jahr). Hohe Cu-Konzentrationen von mehr als 400 ppm in Böden führen zur Anreicherung dieses Schwermetalls in verschiedenen Pflanzenorganen. Solche Anreicherungen von Kupfer in Boden und Pflanze stellen ein mögliches Toxizitätsproblem für Mensch und Umwelt dar (BBÖ 1999). Da von gesetzlicher Seite her Restriktionen bezüglich der Aufwandmenge geplant sind, ist eine wirksame Alternative dringend erforderlich.

In Vorstudien wurde festgestellt, dass die Applikation des antioxidativ wirksamen α -Tocopherol (Vitamin E) an Apfel den Befall mit Apfelschorf um bis zu 70 % reduzieren konnte. Auch aus anderen Versuchen ist bekannt, dass die Applikation von Antioxidantien zur Bekämpfung von bestimmten Pathogenen eingesetzt werden kann (ELAD 1992; GÖNNER und SCHLÖSSER, 1992). Da Vitamin E lipophil ist, wurde α -Tocopherol (0,5 %) unter Zusatz des Emulgators Lecithin (2,5 %) eingesetzt. Lecithin wurde als sogenannte Leerformulierung mit getestet. Unter kontrollierten Bedingungen wurden die beiden Applikationslösungen jeweils 24 h vor Inokulation mit dem Erreger *Venturia inaequalis* auf die Apfelsämlinge bis zum Abtropfzeitpunkt gesprüht. Hierdurch konnte 14 Tage nach der Inokulation eine Befallsreduktion von ca. 80 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erzielt werden.

Die Messung des für Stresserkennung sensiblen Chlorophyllfluoreszenzparameters Fv/Fm zeigte, dass der Photosyntheseapparat frühestens 7 Tage nach der Inokulation durch die Infektion mit *Venturia inaequalis* beeinträchtigt wurde. Vierzehn Tage nach der Inokulation war Fv/Fm der unbehandelten und infizierten Pflanzen signifikant niedriger, im Vergleich zu Fv/Fm von mit Tocopherol und Lecithin vorbehandelten Pflanzen. Dies ist auf den geringeren Pathogenbefall bei den behandelten Pflanzen und die dadurch geringeren Schäden an den Blättern zurückzuführen. Die Messung der Chlorophyllgehalte ergab zu keinem der drei Messtermine (3, 7 und 14 Tage nach der Inokulation) einen signifikanten Unterschied und ist daher als Früherkennung von Stresssymptomen bei einer *V. inaequalis*-Infektion nicht geeignet. Die Untersuchung der Peroxidase- und Lipoxygenaseaktivitäten, die beide 14 Tage nach der Inokulation in den unbehandelten und infizierten Pflanzen signifikant höher war, als in den anderen Varianten, deutet auf eine Akkumulation von Wasserstoffperoxid, bzw. eine gesteigerte Oxidation ungesättigter Fettsäuren hin. Beides ist ein Zeichen für einen erhöhten oxidativen Stress in der Pflanze, der durch die Behandlung mit den Applikationslösungen und damit verbundenem reduzierten Befall vermindert werden konnte. Die Messung von Komponenten des pflanzeigenen Abwehrsystems, α -Tocopherol und Ascorbinsäure, ergab, dass der Tocopherolgehalt zunächst in den mit Vitamin E behandelten Pflanzen aufgrund der exogen zugeführten Fraktion anstieg. Während die endogenen Tocopherolgehalte in den anderen infizierten Apfelsämlingen absanken, waren die Tocopherolgehalte in den mit Tocopherol behandelten Sämlingen 14 Tage nach der Inokulation auf dem gleichen Niveau, wie bei den nicht infizierten Pflanzen. Der Abfall des Vitamingehaltes in den infizierten Pflanzen deutete auf einen Verbrauch des Tocopherols hin, das für die Inaktivierung von

entstehenden Radikalen von der Pflanze benötigt wird. Auch der Ascorbinsäuregehalt sank 14 Tage nach der Inokulation in diesen Varianten ab. Die mit dem Vitamin E synergistisch wirkende Ascorbinsäure wird benötigt, um die bei der Detoxifizierung von übermäßig auftretenden freien Radikalen entstehenden Tocopheryl-Radikalen wieder in Tocopherol umzuwandeln. Der abfallende Ascorbatgehalt 14 Tage nach Inokulation ist somit auch mit der antioxidativen Tätigkeit in den unbehandelten, infizierten und mit Lecithin behandelten und infizierten Pflanzen zu erklären. Anders als beim Tocopherol kam es beim Ascorbat zu einem Anstieg des Gehaltes in der unbehandelten und inokulierten Variante 3 Tage nach der Inokulation. Hierbei könnte es sich um eine Reaktion der Pflanze auf das Eindringen des Pilzes in das Pflanzengewebe handeln, die die Pflanze bei der Abwehr unterstützt.

Neben Veränderungen antioxidativ wirksamer Komponenten im Pflanzengewebe wurde auch die Veränderung der Blattoberfläche nach Applikation von α -Tocopherol und Lecithin beobachtet. Anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde sichtbar, dass der Spritzbelag die Oberfläche der Sämlingsblätter verändert. Somit könnte der reduzierte Befall mit *V. inaequalis* nicht nur durch die Tätigkeit antioxidativ wirksamer Substanzen, sondern auch durch für den Pilz erschwerte Penetrationsbedingungen erklärt werden. Pilze benötigen häufig bestimmte Signale für die Initiation bestimmter Entwicklungsphasen. Durch den Belag auf den Blättern könnte es dazu kommen, dass die Keimschläuche keinen Impuls für die Ausbildung des Appressoriums bekommen, und die Keimschläuche deshalb weiterwachsen. Des Weiteren ist es möglich, dass die Applikationslösungen vom Pathogen aufgenommen werden und es zu Störungen des pilzlichen Stoffwechsels kommt.

Ein weiterer Nebeneffekt der Applikationslösungen ist das schnellere Abtrocknen der Blätter nach der Inokulation mit der wässrigen Sporenlösung. Während es bei nicht behandelten Blättern zu einer Tröpfchenbildung der Inokulationssuspension kommt, "zerlaufen" die Tropfen auf vorbehandelten Blättern und tropfen teilweise direkt ab. Der daraufhin wesentlich dünnere Wasserfilm bewirkt ein schnelleres Abtrocknen der Inokulationssuspension. Die Folge ist ein verkürzter Zeitraum in dem der Pilz sich in der Pflanze etablieren kann. Durch die geringere Penetrationsrate ist schon hier der zukünftige Befall durch den Pilz im Gegensatz zur unbehandelten Variante dezimiert.

Unter Freilandbedingungen im Versuchsjahr 2002 konnten die unter kontrollierten Bedingungen gewonnenen sehr guten Ergebnisse bezüglich der Befallsreduktion nur teilweise wiedergespiegelt werden. Dies lag vor allem an dem extrem hohen Befallsdruck und der sich schnell verbreitenden Sporen von den unbehandelten Bäumen. Bei den beiden frühen Blattbonituren war jedoch ein vergleichsweise geringerer Befall der mit Tocopherol und Lecithin behandelten Bäume zu den unbehandelten Bäumen zu verzeichnen. Hinsichtlich der Fruchtqualitätsparameter gab es weder nach Behandlung mit der Antioxidantienlösung noch nach Behandlung mit der Leerformulierung signifikante Unterschiede.

In weiteren Freilandversuchen sollte die Anwendbarkeit der Applikationslösungen somit nochmals getestet werden.