

Entwicklung von Anwendungsstrategien für BlossomProtect gegen Feuerbrand

Abschlussbericht

Fördernde Institution:	Ministerium für Ernährung und Ländlichen Raum Baden Württemberg
Förderkennzeichen (Projektnr.):	0288F
Titel:	Entwicklung von Anwendungsstrategien für BlossomProtect gegen Feuerbrand.
Auftragnehmer:	Bio-Protect GmbH, Lohnerhofstr. 7, 78467 Kon- stanz
Projektleiter:	Dr. Stefan Kunz
Zeitlicher Rahmen:	01.02.2006-31.12.2007
Schlagworte:	Apfel, Feuerbrand, <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Aureobasi-</i> <i>dium pullulans</i> , Pflanzenstärkungsmittel, BlossomProtect, Berostung
Kurztitel:	BlossomProtect gegen Feuerbrand

1. Zusammenfassung.....	4
2. Problemstellung.....	5
3. Ziele des Projekts.....	6
4. Untersuchungsmethoden	6
4.1 Mikroorganismen	6
4.2 Mikrobiologische Methoden.....	7
4.2.1 Zellzahlbestimmung	7
4.3 Produktion der Testpräparate	7
4.3.1 Labormaßstab	7
4.3.2 Technischer Maßstab.....	7
4.3.3 Berechnung der Pufferkapazität	7
4.4 Haltbarkeit der Testpräparate.....	7
4.5 Messung der Acetatbildung.....	8
4.6 Nachweis der Bildung antibakterieller Substanzen	8
4.6.1 Kultivierung der <i>A. pullulans</i> Stämme.....	8
4.6.2 Hemmhoftest	8
4.7 Blüteninfektion	8
4.8 Freilandversuche	9
4.8.1 Blütenentnahme zur Inokulation im Labor.....	10
4.8.2 Blütenentnahme zur Bestimmung der Populationsentwicklung.....	10
4.8.3 Pflanzenverträglichkeit der Testpräparate	10
5. Ergebnisse.....	11
5.1 Formulierung von BlossomProtect	11
5.1.1 Coating	11
5.1.2 Zusammensetzung der Pufferkomponente	12
5.1.3 Haltbarkeit der Komponente B.....	15
5.2 Wirkmechanismus.....	17
5.3 Etablierung von <i>A. pullulans</i> auf Apfelblüten	17

5.3.1	Acetatbildung in Flüssigkultur	18
	DSM14941	19
	DSM14940	19
5.3.2	Acetatbildung auf Blüten.....	20
5.3.3	Überprüfung der Bildung von antibakteriellen Substanzen	21
6.	<i>Applikationstermin von BlossomProtect.....</i>	28
7.	<i>Wirksamkeit und Phytotoxizität von BlossomProtect</i>	31
7.1	Wirksamkeit an Topfbäumen	31
7.2	Wirksamkeit und Phytotoxizität von BlossomProtect im Freiland	32
7.3	Einfluss der Wasseraufwandmenge auf Wirkung und Phytotoxizität	35
7.4	Freilandversuche zur Phytotoxizität.....	37
8.	<i>Freilandversuche anderer Versuchsansteller.....</i>	37
8.1	Versuche zur Wirksamkeit	37
8.1.1	Exaktversuche 2006	37
8.1.2	Exaktversuche 2007	39
8.1.3	Praxisversuche.....	40
8.2	Versuche zur Phytotoxizität	41
9.	<i>Konsequenzen für die Praxis</i>	44
10.	<i>Literatur</i>	47

1. Zusammenfassung

In diesem Forschungsprojekt sollte die Eignung des Pflanzenstärkungsmittels BlossomProtect als Alternative zu Streptomycin bei der Feuerbrandbekämpfung überprüft werden. Dazu wurden Versuche zur Verbesserung der Formulierung, zur Klärung des Wirkmechanismus, zum Nachweis der Pflanzenverträglichkeit und zur Erarbeitung einer praxistauglichen Anwendungsstrategie durchgeführt.

BlossomProtect besteht aus zwei Komponenten. Die Komponente A enthält Puffersubstanzen, die den pH-Wert der Spritzbrühe auf einen für die in Komponente B enthaltenen Blastosporen von *Aureobasidium pullulans* günstigen Wert von 3,5 bis 4,0 einstellen. Versuche, die Zusammensetzung der Pufferkomponente so zu ändern, dass die Aufwandmenge reduziert wird, waren nicht erfolgreich. Die hohe Aufwandmenge von 12kg/ha muss von der Praxis toleriert werden. Die Produktion der in Komponente B enthaltenen *A. pullulans* Stämme konnte im Rahmen des Projektes in Zusammenarbeit mit der Firma bio-ferm GmbH in Tulln, Österreich, standardisiert und in einen großtechnischen Maßstab überführt werden. Sowohl die Reinhefegränulate der *A. pullulans* Stämme als auch die formulierte Komponente B sind stabil lagerfähig.

Der Wirkmechanismus konnte nicht letztendlich geklärt werden. Die Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass eine pH-Absenkung durch das Ausscheiden von Acetat das Erregerwachstum im Nektar verhindert und damit das Eindringen des Erregers in die Blüten hemmt. Möglich ist aber auch eine Resistenzinduktion. Für eine bakterizide Wirkung wurden keine Hinweise gefunden.

Versuche an Einzelblüten zum geeigneten Applikationszeitpunkt zeigen, dass dieser parallel zu Streptomycin zu wählen ist. Leider war es nicht möglich, einen bestimmten CDH18 Wert im Maryblyt zu benennen, an dem spätestens appliziert werden muss, da der geeignete Applikationszeitpunkt zwar von der Temperatur, nicht aber vom CDH18 abhängig ist. Dies galt in diesen Versuchen allerdings auch für Streptomycin.

Neben den im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Freilandversuchen zur Berostung und zur Wirksamkeit wurde BlossomProtect auch anderen Versuchsanstellern zur Verfügung gestellt. In Freilandversuchen zeigte sich, dass bei parallel zum Streptomycin gewählten Einsatzzeitpunkten am Tag der Infektion die Wirkung von BlossomProtect geringer war als die von Streptomycin. Sehr gute Ergebnisse wurden in Freilandversuchen erzielt, wenn BlossomProtect nach Phänologie 3-4 mal eingesetzt wurde. In 6 Freilandversuchen der

Universität Konstanz wurde eine durchschnittliche Befallsreduktion von 82% erreicht (Kunz et al., 2008). In diesen Versuchen konnte auch gezeigt werden, dass eine Integration der BlossomProtect Behandlungen in die Schorfbekämpfung möglich ist (Kunz et al., 2008). Fungizide können am Tag vor oder zwei Tage nach der Behandlung mit BlossomProtect eingesetzt werden.

Eine Mehrberostung der Früchte kann bei bestimmten Sorten durch BlossomProtect ausgelöst werden. Berostungsempfindlich ist vor allem Golden Delicious gefolgt von Jonagold und Elstar. Bei Gala, Topaz und Pinova wurde keine Mehrberostung festgestellt.

Im ökologischen Anbau wird BlossomProtect zur Feuerbrandbekämpfung eingesetzt. Im Integrierten Anbau wird BlossomProtect trotz der positiven Versuchsergebnisse nicht als Alternative zu Streptomycin angesehen. Solange Streptomycin für den Integrierten Anbau zur Verfügung steht, wird sich BlossomProtect dort nicht durchsetzen.

2. Problemstellung

Zur Bekämpfung des Feuerbranderregers *Erwinia amylovora* wird im Obstbau bisher das Antibiotikum Streptomycin eingesetzt. Dessen Einsatz in der Landwirtschaft ist umstritten. Das BMVEL hat in einem Strategiepapier zur Feuerbrandbekämpfung 2003 den Ausstieg aus dem Plantomycineinsatz beschlossen (BMVEL, 2003). Es wird dringend nach einer Alternative bei der Feuerbrandbekämpfung gesucht. Als Alternative können Mikroorganismen eingesetzt werden, die die Obstbaublüte besiedeln.

Im Jahr 2002 ergab die Verwendung von Hefen anstelle der bis dahin eingesetzten Bakterien in Freilandversuchen eine Steigerung der Wirksamkeit. Eine weitere Wirkungssteigerung konnte seit 2003 durch Anpassung der Formulierung erreicht werden. So wurden in Freilandversuchen ähnliche Wirkungsgrade wie mit Streptomycin erreicht (Fried et al., 2004; Haug and Kunz, 2005; Kunz et al., 2004; Kunz et al., 2006).

Damit die seit 2003 eingesetzten wirksamen Testpräparate in die obstbauliche Praxis eingeführt werden können, müssen alle Details der Produktion und Haltbarkeit getestet werden. Weitere Wirkungsnachweise unter unterschiedlichen klimatischen Bedingungen sind notwendig, um eine sichere Anwendung zu gewährleisten. Für die Einführung in die obstbauliche Praxis muss die Integration der Hefebehandlungen während der Blüte in die bestehenden Pflanzenschutzmaßnahmen (Insekten, Apfelschorf) gelingen.

3. Ziele des Projekts

Die Firma Bio-Protect GmbH entwickelte mit Unterstützung durch das Ministerium für Ernährung und ländlicher Raum Baden-Württemberg das Hefepräparat BlossomProtect zum Einsatz gegen den Feuerbranderreger *Erwinia amylovora*. In Freilandversuchen zur Bekämpfung von Feuerbrand wurde seit 2003 BlossomProtect als einzige wirksame Alternative zu Streptomycin identifiziert.

Im Rahmen dieses Projektes sollten deshalb alle Grundlagen für eine baldige Einführung von BlossomProtect in die obstbauliche Praxis erarbeitet werden.

Dazu gehören:

- Verbesserung der Formulierung, um die Haltbarkeit des Präparates und damit die gleich bleibende Qualität bei Anwendung sicher zu stellen.
- Klärung des Wirkmechanismus als Grundlage für eine Registrierung.
- Nachweis der Pflanzenverträglichkeit
- Erarbeiten einer praxistauglichen Anwendungsstrategie. Die Applikationshäufigkeit muss minimiert und die Termine müssen an der Feuerbrandprognose ausgerichtet werden.

4. Untersuchungsmethoden

4.1 Mikroorganismen

Die verwendeten Mikroorganismen (Tab. 1) wurden zur Stammerhaltung in Schüttelkulturen vermehrt und mit Glycerin vermischt bei -20°C gelagert.

Tabelle 1: Verwendete Mikroorganismen

Bezeichnung	Art	Herkunft
DSMZ 14940	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Apfel, Universität Konstanz
DSMZ 14941	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Apfel, Universität Konstanz
Ea385	<i>Erwinia amylovora</i>	Landespflanzenschutzamt Baden-Württemberg

4.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.1 Zellzahlbestimmung

Die Gesamtzellzahl von Hefesuspensionen wurde mit der Thoma-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. Die Gesamtzellzahl von Bakteriensuspensionen wurde anhand der Extinktion bei 660nm im Photometer bestimmt. Ea385: OD 0,2 entspricht $2,6 \times 10^8$ Zellen/ml

Die Lebendkeimzahl (cfu) von Hefe- und Bakteriensuspensionen wurde durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen auf geeigneten Nährböden nach dem Tropfplattenverfahren (Baumgart, 1999) bestimmt .

4.3 Produktion der Testpräparate

4.3.1 Labormaßstab

Die beiden Antagonistenstämme wurden im Laborfermenter angezogen, zentrifugiert und mit Trägerstoff versetzt gefriergetrocknet. Auf diese Weise konnten definierte Hefepulver hergestellt werden.

4.3.2 Technischer Maßstab

Das scale-up für die Großproduktion wurde in entsprechenden Produktionsanlagen extern untersucht.

4.3.3 Berechnung der Pufferkapazität

Zur Verbesserung der Wirksamkeit der Hefen wurden den Testpräparaten Puffer zugegeben, die die Spritzbrühe auf einen pH-Wert zwischen 3,5 bis 4,0 ansäuern. Für die Entwicklung der verschiedenen Pufferzusammensetzungen wurden Pufferkapazitäten wie folgt berechnet:

$$\text{net: Pufferkapazität } \beta = \frac{\text{Volumen an Natronlauge}}{\text{Änderung pH - Wert}}$$

4.4 Haltbarkeit der Testpräparate

Verschiedene Chargen der Produktionsstämme wurden unterschiedlich formuliert sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 4°C gelagert. In regelmäßigen Abständen wurde die Lebendkeimzahl (cfu) bestimmt.

4.5 Messung der Acetatbildung

Zum Nachweis von Acetat wurden aus Kulturen der beiden Produktionsstämme in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und abzentrifugiert. Der Überstand wurde im Gaschromatographen analysiert. Acetat hat bei der verwendeten Säule eine Retentionszeit von 1,4.

4.6 Nachweis der Bildung antibakterieller Substanzen

4.6.1 Kultivierung der *A. pullulans* Stämme

Vorkulturen der *A. pullulans* Stämme DSM14940 und 14941 wurden in YM-Medium (3 g/l Hefeextrakt, 3 g/l Malzextrakt, 5 g/l Pepton, 10 g/l Glucose) 48h lang bei 27°C geschüttelt, um Inokulum für die Testkulturen zu liefern.

Die Testkulturen wurden mit 10^6 Zellen/ml angeimpft und zur Überprüfung der Bildung von antibakteriellen Substanzen in Produktionsmedium oder in NB+ (8 g/l Nutrient Broth, 50 g/l Saccharose) 7d lang bei 27°C geschüttelt.

Fermenterkulturen wurden im belüfteten Laborfermenter in Produktionsmedium bei 27°C angezogen. Inokuliert wurde der Fermenter mit 100 ml Vorkultur. Zur pH-Regulierung wurde NaOH automatisch dosiert, wenn der pH im Fermenter unter 5 absank und HCl wurde automatisch dosiert, wenn der pH über 7,0 anstieg.

4.6.2 Hemmhofstest

Die Bildung antibakterieller Substanzen wurde auf Agarplatten überprüft: NB⁺A (8 g/l Nutrient Broth, 50 g/l Saccharose, 20 g/l Agar) und NB⁺APuf (8 g/l Nutrient Broth, 50 g/l Saccharose, 5,4 g/l KH₂PO₄, 10,6 g/l K₂HPO₄, 20g/l Agar). 1×10^5 Zellen von *E. amylovora* Ea385 wurden je Agarplatte verteilt. Nach 1h wurden 10 µl Streptomycin (250 mg/l Streptomycinsulfat), Kultur oder Kulturüberstand auf die Agarplatten getropft. Die Platten wurden 48h lang bei 27°C bis zum Ausmessen der Hemmhöfe inkubiert. Jeder Test wurde auf zwei separaten Platten durchgeführt.

4.7 Blüteninfektion

Das *in vivo* Testsystem zur Untersuchung der Wirksamkeit von Mikroorganismen gegen den Feuerbranderreger wurde in Anlehnung an Arbeiten von Pusey in den USA (Pusey, 1997, 1999, 2000) durchgeführt. Anstelle der dort verwendeten Zierapfelsorten, wurden blühfähige Apfelbäume der Sorte Gala auf M9 veredelt verwendet. Der Zeitpunkt der Blüte wurde ent-

weder durch Aufstellen der Pflanzen im Gewächshaus unter künstlicher Beleuchtung vorgezogen oder durch Lagerung des Pflanzmaterials bei Dunkelheit im Kühlraum verzögert. Auf diese Weise konnten von Januar bis August Blüten für Versuche bereitgestellt werden.

Die Blüten wurden abgenommen und mit dem Blütenstiel in eine 10% ige Saccharoselösung gestellt (Abb. 1). Dies gewährleistete, dass die Blüten über den Versuchszeitraum intakt blieben. Die Blüten wurden in feuchten Kammern inkubiert. Die Behandlung mit den Testpräparaten wurde 1h nach der Inokulation mit dem Erreger (1×10^6 Zellen/ml) durchgeführt. Nach 6 Tagen Inkubation bei 20-23°C wurden Blüten mit Feuerbrandsymptomen ausgezählt. Der Wirkungsgrad wurde anhand der Symptomreduktion im Vergleich zu einer mit Wasser besprühten Kontrolle errechnet.



Abbildung 1: *In vivo* Test-System zur Untersuchung der Wirksamkeit von Hefepreparaten gegenüber dem Feuerbranderreger *E. amylovora*. Apfelblüten wurden in 10% Saccharoselösung gestellt und bei 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert (A). Nicht befallene Blüte nach 6d Inkubation (B). Blüte mit Feuerbrandsymptomen. Am Blütenstiel tritt Bakterien Schleim aus (C).

4.8 Freilandversuche

Freilandversuche zur Feuerbrandbekämpfung unter natürlichen Infektionsbedingungen wurden organisiert und durchgeführt. Aus diesen Versuchsflächen werden regelmäßig Blüten entnommen und im Labor auf die Besiedelung mit Antagonisten und auf Ihre Anfälligkeit gegenüber Feuerbrand im Vergleich zu unbehandelten Blüten getestet.

Die Testpräparate wurden auch anderen Versuchsanstellern zur Verfügung gestellt, die die Präparate unter natürlichen Infektionsbedingungen oder mit dem Kombinationsverfahren nach Fried (Fried, 1999) testeten.

4.8.1 Blütenentnahme zur Inokulation im Labor





Um herauszufinden, ob die Blüten zu einem bestimmten Zeitpunkt durch die Behandlung gegen Feuerbrandinfektionen geschützt waren, wurden regelmäßig aus jeder Parzelle 24 Blüten zur Inokulation mit dem Feuerbranderreger entnommen. Die Blüten wurden in Zuckerlösung gestellt und mit Feuerbrandbakterien besprüht (10^6 /ml). Die Blüten wurden bei 24°C inkubiert. Nach 6d wurde die Anzahl der Blüten mit Bakterien Schleim bestimmt.

4.8.2 Blütenentnahme zur Bestimmung der Populationsentwicklung

Die Populationsentwicklung der Wirkorganismen auf den Blüten im Freiland wurde verfolgt, indem von jeder Parzelle 40 Blüten entnommen und in 300 ml 0,6 % NaCl abgewaschen wurden. Die Waschlösung wurde zur Bestimmung der Keimzahl auf YM-Agar ausplattiert und die jeweiligen Kolonien gezählt.

4.8.3 Pflanzenverträglichkeit der Testpräparate

Tabelle 2: Einteilung der Äpfel in Berostungsklassen

Berostungsklasse (BK)	1	2	3	4
Berostete Fruchtoberfläche	0%	bis 10%	10-30%	30-100%
				

Die Testpräparate wurden in Freilandversuchen auf ihre Pflanzenverträglichkeit geprüft. Dabei wurde vor allem die Auswirkung auf die Berostung der Früchte untersucht. Bei ent-

sprechendem Reifegrad wurden die Früchte in den einzelnen Parzellen auf Berostung bonitiert. Dazu wurden die Äpfel in Berostungsklassen (BK) eingeteilt (Tab. 2) und daraus der Berostungsindex berechnet.

$$\text{Berostungsindex} = \frac{1 \times nBK1 + 2 \times nBK2 + 3 \times nBK3 + 4 \times nBK4}{n \text{ alleBK}}$$

n: jeweilige Anzahl an Äpfeln

5. Ergebnisse

5.1 Formulierung von BlossomProtect

BlossomProtect besteht aus zwei Komponenten. Komponente A enthält Puffersubstanzen, die den pH-Wert der Spritzbrühe absenken. Komponente B enthält Blastosporen des Hefepilzes *Aureobasidium pullulans*. Die Blastosporen können nicht mit den Puffersubstanzen gemischt gelagert werden, da dies die Haltbarkeit der Blastosporen stark beeinträchtigt. BlossomProtect wird mit einer Aufwandmenge von 12kg/ha verwendet. Da diese hohe Aufwandmenge ein Kritikpunkt aus der Praxis war, wurde versucht die Zusammensetzung der Pufferkomponente (Komp. A) zu optimieren.

Bei der Produktion und der Formulierung der Komponente B (Blastosporen) wurde die Haltbarkeit der Blastosporen weiter untersucht.

5.1.1 Coating

Da die Blastosporen bislang nicht zusammen mit dem Puffer gelagert werden können, wurden Möglichkeiten recherchiert, die Mikroorganismen zu coaten.

Man unterscheidet beim Coating drei Verfahren:

Beim **Filmcoaten** werden hauchdünne funktionale Schichten als Schutzfilm zur Beeinflussung der Partikeleigenschaften aufgetragen. Die Coatingflüssigkeit wird auf die vorgelegten Feststoffe aufgesprüht. Die zugeführte Prozessluft verdunstet die Flüssigkeit und trocknet die Filmschicht. Kleine Tropfen und eine niedrige Viskosität sichern eine gleichmäßige Verteilung.

Beim **Lipid Hot Melt coaten** werden Wachse und Schmelze als Schutzfilme aufgetragen. Die zugeführte Prozessluft führt zum Erstarren der Filmschicht. Durch den Einsatz von

Schmelzen als Coatingflüssigkeit entfällt das zeitintensive und energieaufwändige Verdampfen von Lösungsmitteln.

Das **Zuckerdragieren** ist ein effektives Verfahren zum Auftragen von großen Coatingschichten vorrangig zur Geschmacksmaskierung. Der Sirup wird auf die Partikel aufgesprüht. Die zugeführte Prozessluft verdunstet die Flüssigkeit und trocknet die Zuckerschicht. Bei diskontinuierlicher Zugabe der Dragierlösung verweilen die Partikel solange im Prozess, bis die gewünschte Schichtdicke erreicht ist.

Recherchen und Anfragen bei unterschiedlichen Herstellern und Produzenten ergaben, dass Coating bislang ausschließlich in der Pharma-, Food-, Feed-, und Feinchemieindustrie eingesetzt wird. Da sich die separierte Hefecreme der beiden in BlossomProtect enthaltenen Hefestämme *Aureobasidium pullulans* DSM 14940 und DSM 14941 nicht lagern lässt, müsste das Coating unmittelbar am Produktionsstandort nach der Filtration bei oder nach der Trocknung erfolgen. Aus Gründen der strengen Hygienevorschriften dürfen in Anlagen der Pharma- oder Lebensmittelindustrie jedoch keine fremden Mikroorganismen produziert werden.

In technischen Hefeanlagen, die Mikroorganismen produzieren dürften, wird bislang kein Coating eingesetzt, da diese Technik für Backhefe einerseits nicht notwendig ist, und andererseits das Produkt unnötig verteuern würde. Die Möglichkeit des Coatings wurde daher nicht weiter verfolgt.

5.1.2 Zusammensetzung der Pufferkomponente

Die Pufferkomponente von BlossomProtect (Puffer P) muss in einer hohen Anwendungskonzentration (AWK) von 1,05% eingesetzt werden. Eine Zusammenfassung der bisherigen Daten zeigt, dass eine Reduktion der AWK des Puffers P die Wirksamkeit von BlossomProtect reduziert (Abb. 2).

Deshalb wurden weitere Puffergemische mit niedrigerer AWK hergestellt und die Pufferkapazitäten verglichen. In die Versuche wurde auch ein Flüssigpuffer auf der Basis von Ameisen- bzw. Essigsäure mit einbezogen. Die Puffer mit Ameisensäure zeigten dabei im relevanten Bereich von pH 4 die höchsten Pufferkapazitäten und pufferten somit deutlich besser als der bisherige Puffer P (Abb. 3). Der Essigsäurepuffer pufferte im Bereich von 4-6 besser als der Puffer P, hatte sein Maximum jedoch bei ca. 4,7, d.h. im Bereich des pK_S-Wertes von Essigsäure. Damit ist er weniger geeignet als der Ameisensäurepuffer, wurde als Alternative jedoch in weitere Untersuchungen mit einbezogen. Die Überprüfung der Überlebensrate der

Blastosporen ergab jedoch, dass diese Essig- und Ameisensäurepuffer *A. pullans* abtöten. Damit ist keiner dieser Flüssigpuffer praxistauglich.

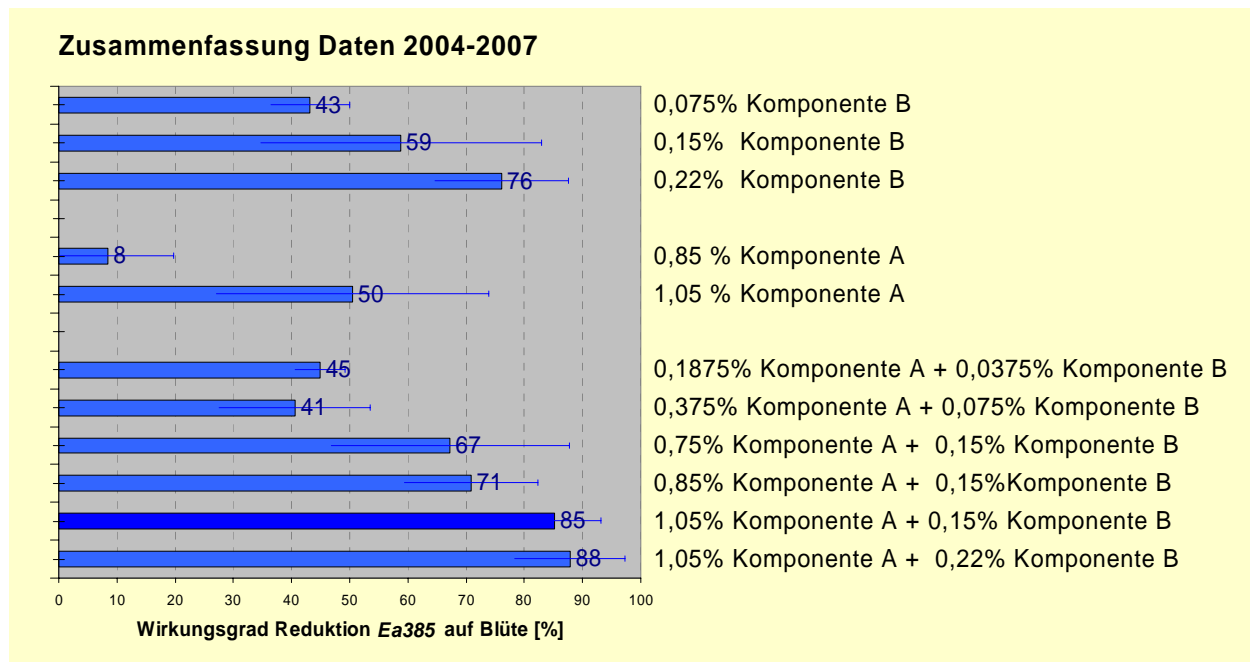


Abbildung 2: Einfluss der Gesamtkonzentration und der Konzentration der Einzelkomponenten auf die Wirkung von BlossomProtect auf Apfelblüten.

Die Puffer, die Zitronensäure als Säurekomponente enthielten, waren bezüglich ihrer Pufferkapazitäten vergleichbar. Die Pufferkapazität des Puffers P lag etwas über den Werten des Carbonatpuffers. Die beiden alternativen Zitronensäurepuffer lagen in einem ähnlichen Bereich wie der bisherige Puffer P. Alle Zitronensäurepuffer waren mit den Blastosporen verträglich und wären somit als Alternativen denkbar. Für diese Puffer errechneten sich die in Tabelle 3 aufgeführten Anwendungskonzentrationen. Vor allem für den Carbonatpuffer und für POM-Puffer würde sich eine deutliche Reduktion der Aufwandmenge ergeben.

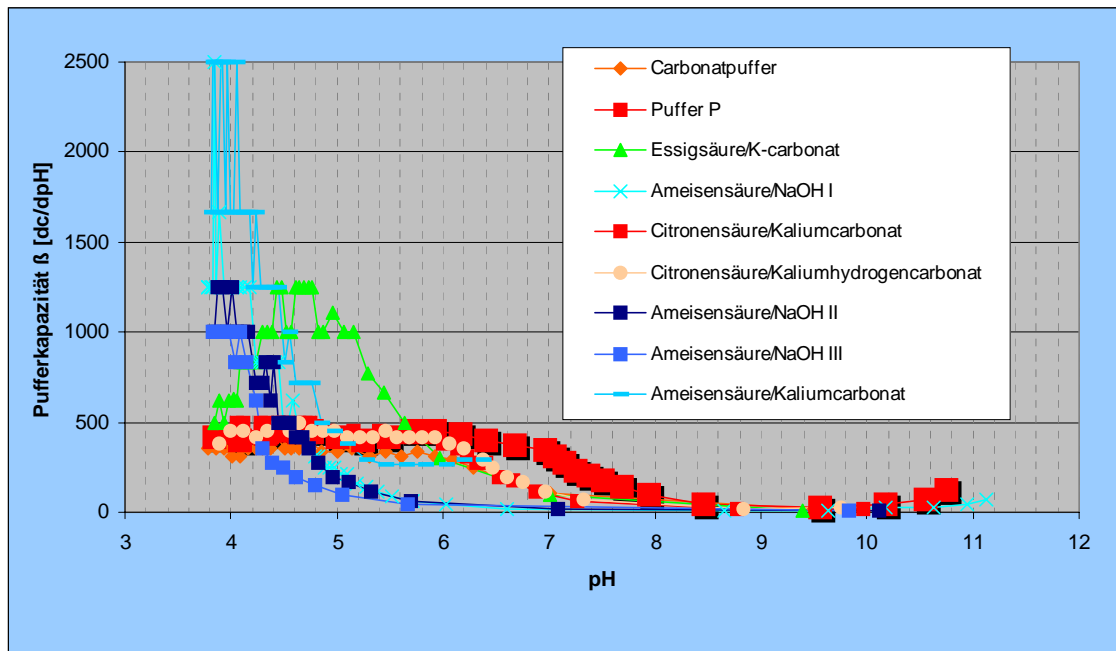


Abbildung 3: Pufferkapazitäten der untersuchten Alternativpuffer im Vergleich zu Standardpuffer P. Zu 50 ml der jeweiligen Pufferlösung wurde 2 M Natronlauge pipettiert und aus der Änderung des pH-Wertes die Pufferkapazität errechnet.

Tabelle 3: Aufgrund der Vorversuche verbliebenen Puffergemische mit Zusammensetzung und Anwendungskonzentration (AWK)

Präparat	AWK (%)	Pufferkomponente	AWK (%)
BlossomProtect	1,2	Puffer P (Komponente A)	1,05
BPASc4	1,2	Puffer C	1,05
BPASc6	0,75	Carbonatpuffer	0,60
BPG07	0,85	POM-Puffer	0,70

Bereits 2004 wurde das Testpräparat BPASc4 mit dem alternativen Puffer C im Freilandversuch in Karssee getestet. BPASc4 war mit 83% Befallsreduktion gleich wirksam wie BlossomProtect mit 85% (Kunz et al., 2004). Allerdings wurde festgestellt, dass der Puffer C sich nicht lagern lässt. Schon nach kurzer Zeit wird das Pulver hart. In 2006 wurde in Karssee der Carbonatpuffer im Versuchspräparat BPASc6 eingesetzt. Mit diesem Puffer würde eine deutliche Reduktion der Aufwandmenge erreicht. Allerdings war die Wirksamkeit gegenüber

BlossomProtect (86 %) um 23% geringer (Kunz et al., 2006) und auch dieser Puffer wurde nach kurzer Lagerung hart. Die alternativen Puffer auf Basis von Carbonat (Puffer C und Carbonatpuffer) wurden deshalb nicht mehr für weitere Versuche eingesetzt.

Der Puffer P wurde 2007 im Vergleich mit POM-Puffer in Blütenversuchen untersucht. Der POM-Puffer zeigte dabei sowohl allein als auch in Kombination mit der Hefekomponente B einen niedrigeren Wirkungsgrad als der bisherige Standardpuffer (Abb. 4). Trotzdem wurde der POM-Puffer 2007 sowohl im eigenen Freilandversuch als auch in externen Freilandversuchen im Versuchspräparat BPGP07 getestet, wo sich leider die gegenüber BlossomProtect geringere Wirkung bestätigte (Kunz et al., 2008).

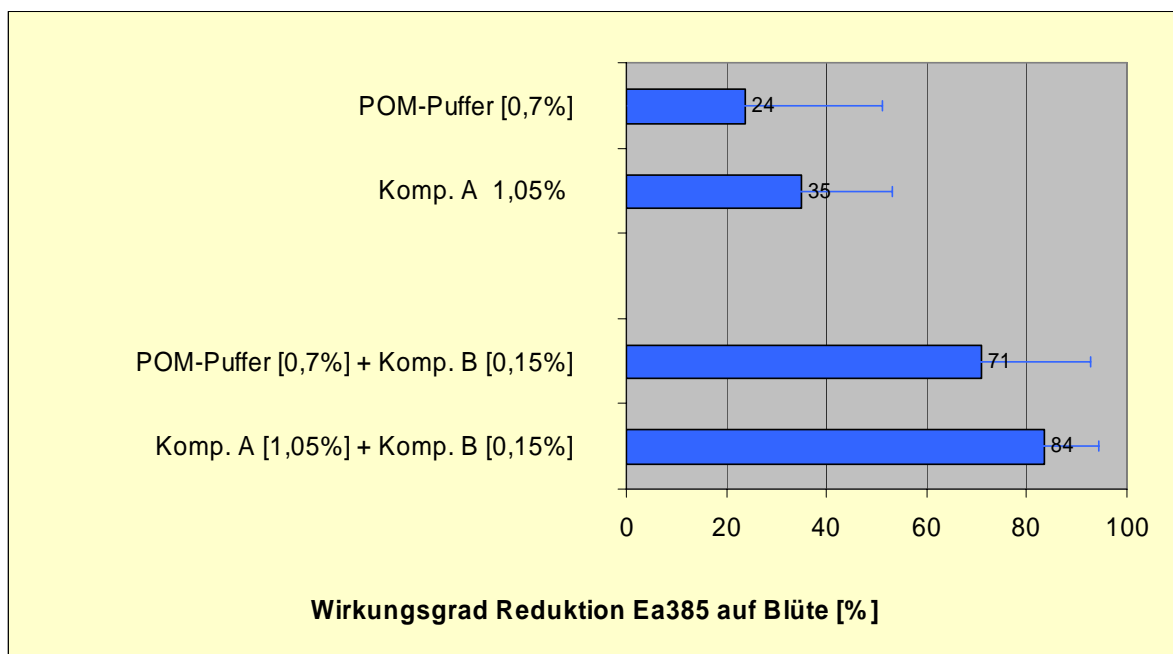


Abbildung 4: Vergleich von Komponente A von BlossomProtect mit POM-Puffer hinsichtlich der Wirkung auf Apfelblüten.

Bisher ist es also nicht gelungen, die hohe Aufwandmenge von BlossomProtect durch den Einsatz einer alternativen Puffermischung zu reduzieren. Im BlossomProtect wird deshalb weiterhin der Puffer P mit einer Aufwandmenge von 10,5 kg/ha (1,05%) verwendet.

5.1.3 Haltbarkeit der Komponente B

Seit 2005 werden die beiden in der Komponente B von BlossomProtect enthaltenen Stämme von *A. pullulans* von der Firma bioferm GmbH in Tulln produziert. Nach Fermentation, Separation und Filtration wird das Hefepellet mit einer Wirbelschichttrocknung zu Granulat ge-

trocknet. Granulate aus verschiedenen Chargen wurden sowohl ungemischt (DSM14940 Granulat, DSM14941 Granulat) als auch fertig formuliert (Komponente B) bei Raumtemperatur oder bei 8°C gelagert und in regelmäßigen Abständen wurde die Lebendkeimzahl (cfu) bestimmt.

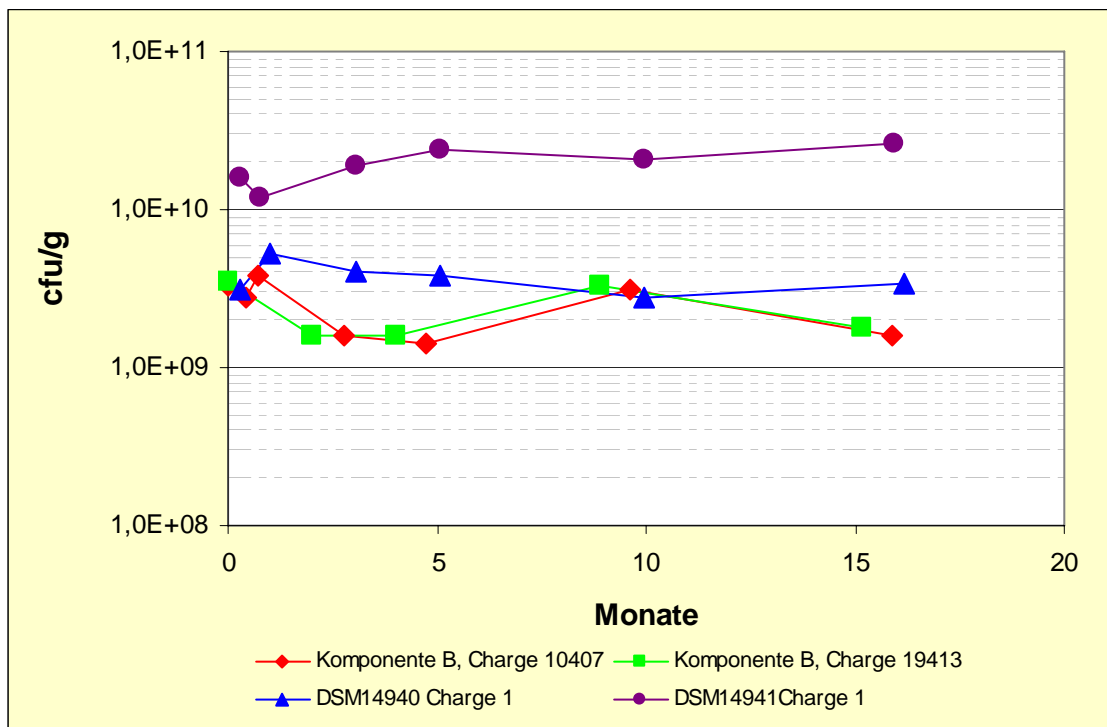


Abbildung 5: Lagerung von Hefegranulaten und verschiedenen Chargen von Komponente B aus der Produktion 2006 bei 8°C. Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurde jeweils 1 g Probe in 40 ml 0,6%igem NaCl eingewogen, gerührt und davon 10er Verdünnungsstufen auf YM-Agarplatten ausplattiert. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 27°C wurden die Kolonien ausgezählt und daraus die cfu errechnet.

Bei Granulaten und Chargen der Komp. B aus 2006 blieb die cfu sowohl bei Lagerung bei 8°C über einen Zeitraum von 16 Monaten konstant (Abb. 5). Die Lagerung bei 20°C führte bei einer Charge der Komponente B nach 16 Monaten zu einer Reduktion der cfu auf 25% des Ausgangswertes. Das Granulat von DSM14941 sank nach 16 Monaten auf 40%. Granulat von DSM14949 und die zweite Charge Komponente B waren auch bei 20°C stabil. Die Chargen und Granulate aus 2007 waren bei der letzten Bestimmung nach 6 Monaten Lagerung noch stabil.

Aus diesen Daten leiten wir folgende Empfehlung zur Lagerung ab: Lagerung bei 20°C ist mind. 6 Monate möglich. Kühlung (<8°C) ist mind. 18 Monate möglich.

5.2 Wirkmechanismus

5.3 Etablierung von *A. pullulans* auf Apfelblüten

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus war es notwendig, die Etablierung von *A. pullulans* auf Apfelblüten zu untersuchen. Es stellte sich die Frage, ob *A. pullulans* sich in den Blüten tatsächlich vermehrt, oder ob die ausgebrachten Sporen zwar über längere Zeit nachweisbar aber nicht aktiv sind. Dazu wurde in Blütenversuchen die Anzahl von *A. pullulans* mit Hilfe einer an der Universität Konstanz entwickelten real-time PCR-Methode zu unterschiedlichen Inkubationszeiten quantifiziert.

Auch in nicht behandelten Blüten konnte *A. pullulans* nachgewiesen werden (Tab. 4). Da die gewählte Methode nicht zwischen unterschiedlichen Stämmen von *A. pullulans* unterscheiden kann und *A. pullulans* ein ubiquitärer Mikroorganismus ist, ist dieser Befund nicht überraschend.

Tabelle 4: Anzahl an Zellen von *A. pullulans* auf Apfelblüten. Die Menge an *A. pullulans* wurde mittels Real Time PCR zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten in den Versuchsansätzen gemessen und wird in Zellen/Blüte angegeben.

Variante	Inkubationszeit		
	1,5 Stunden	24,5 Stunden	48 Stunden
Leitungswasser	$3,3 \cdot 10^3 \pm 3,3 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3 \pm 877$	$2,4 \cdot 10^4 \pm 1,7 \cdot 10^4$
BlossomProtect (1,2%)	$4,7 \cdot 10^5 \pm 5,0 \cdot 10^5$	$8,7 \cdot 10^6 \pm 5,9 \cdot 10^6$	$3,4 \cdot 10^6 \pm 2,1 \cdot 10^6$
<i>Erwinia amylovora</i> + BlossomProtect (1,2%)	$4,6 \cdot 10^5 \pm 8,6 \cdot 10^5$	$6,2 \cdot 10^6 \pm 4,8 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^6 \pm 2,7 \cdot 10^6$

Durch die Behandlung mit BlossomProtect wird die Anzahl von *A. pullulans* pro Blüte im Vergleich zu unbehandelten Blüten um ca. 100 erhöht. Auf den behandelten Blüten steigt die Zellzahl innerhalb von 24h um ca. Faktor 20 an. Weitere 24h Inkubation ergeben keine weitere Erhöhung der Zellzahl.

Das Wachstum von *A. pullulans* wurde durch die Anwesenheit des Feuerbrandereggers *Erwinia amylovora* nicht inhibiert (Abb. 6). *A. pullulans* siedelt sich also auch bei Konkurrenz effektiv auf Apfelblüten an.

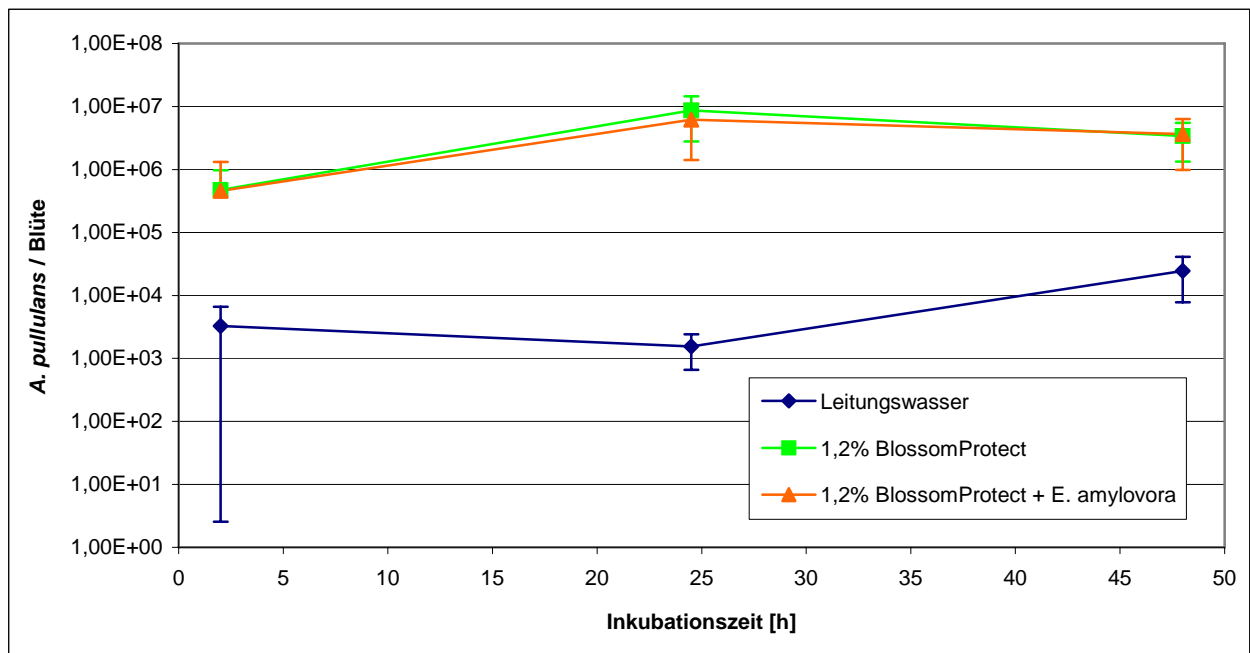


Abbildung 6: Anzahl von *A. pullulans* pro Apfelblüte in Abhängigkeit von der Behandlung und Inkubationszeit. *A. pullulans* wurde mittels Real Time PCR zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten in den Versuchsansätzen quantifiziert.

5.3.1 Acetatbildung in Flüssigkultur

Im sauren Milieu kann sich der Feuerbranderegger nicht vermehren. *A. pullulans* säuert aber beim Wachstum in Flüssigkultur das Medium stark an und wird selbst durch pH-Werte bis 3,5 nicht im Wachstum gehemmt. In diesem Arbeitspaket sollte untersucht werden, ob und unter welchen Bedingungen *A. pullulans* Säure, vor allem Acetat, bildet und ob diese Säurebildung Bestandteil des Wirkmechanismus ist.

Zum Nachweis von Acetat in Flüssigkultur wurde aus der großtechnischen Produktion (bio-ferm GmbH) der *A. pullulans* Stämme DSM14940 und DSM14941 Proben gaschromatographisch untersucht. Von DSM14941 wurde bei einer Charge ein vollständiger Fermentationsverlauf (Start, 24 h, 65 h) beprobt, von DSM14940 wurde nur nach 16 h beprobt. Da die

einzelnen Fermentationen zudem unterschiedliche Mengen an Inokulum aufweisen, können sie bezüglich der Fermentationsdauer nicht verglichen werden.

DSM14941

Nach der Analyse im Gaschromatographen waren im Chromatogramm von DSM14941 (Charge 5) in der Startprobe zwei deutliche Peaks bei einer Retentionszeit von 1,47 und 3,03 zu sehen. Der Peak bei 3,03 wurde auch schon in eigenen Laborversuchen im Hakkaphos/Zuckermedium detektiert und wurde vermutlich durch Saccharose oder ein durch die hohe Einspritztemperatur bedingtes Zersetzungsprodukt verursacht. Dieser Peak bei 3,03 wurde nach 24 h deutlich kleiner, was wiederum für Zucker spricht, der dann zunehmend abgebaut wurde. Nach 65 h war dieser Peak nicht mehr nachzuweisen, dagegen wurde eine Substanz mit einer Retentionszeit von 1,413 in hoher Konzentration nachgewiesen. Bei der zweiten Charge (Charge 12) ließ sich diese Substanz ebenfalls nach 65 h detektieren, hier mit einer Retentionszeit von 1,387. Diese Retentionszeiten entsprechen der Retentionszeit von Essigsäure, die im Standard (neue Säule eingebaut seit August 2007) eine Retentionszeit von 1,385 aufwies.

Die bei Charge 5 nachgewiesene Menge würde einer Konzentration von 169 mM Essigsäure entsprechen. Da Essigsäure eine schwache Säure ist berechnet sich der pH-Wert bei Anwendung des Massenwirkungsgesetzes nach folgender Formel:

$$\text{pH} = \frac{1}{2} \text{pK}_S - \frac{1}{2} \lg c$$

C: Konzentration in mol/l

pK_S: Säurekonstante, für Essigsäure 4,75

Damit wäre bei einer Konzentration von 0,17 mol/l Essigsäure der pH-Wert in einer ungepufferten Lösung 2,8. PH-Werte von 2,8 oder noch darunter wurden in ungepufferten Kulturen von *A. pullulans* schon mehrfach gemessen. Somit wären die hier gefundenen Acetatkonzentration eine gute Erklärung für die Ansäuerung des Mediums.

DSM14940

Bei Stamm DSM14940 war nach einer Fermentationsdauer von 16 h der Zuckerpeak bei 3,03 nicht mehr nachzuweisen. Ein deutlicher Peak bei einer Retentionszeit von 1,43 war sowohl bei Charge 8 als auch bei Charge 9 nachzuweisen. Er lag in der gleichen Größenordnung wie bei DSM14941.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die *A. pullulans* Stämme während der Fermentation Acetat ausscheiden und damit das Medium ansäuern. Die Vermutung liegt nahe, dass *A. pullulans* auch auf der Blüte Acetat ausscheidet und dadurch den pH-Wert im Nektar soweit reduziert, dass der Feuerbranderreger im Wachstum gehemmt wird und dadurch nicht infizieren kann.

5.3.2 Acetatbildung auf Blüten

Die beiden Hefestämme DSM14940 und DSM14941 säuern in Flüssigkultur während des Wachstums das Medium an. Deshalb wurde untersucht, ob auch auf Blüten eine Säurebildung stattfindet.

Dazu wurden 22 Blüten in Zuckerlösung gestellt. 11 davon blieben unbehandelt, die anderen 11 wurden mit 0,1% BlossomProtect Komponente B besprüht. Unmittelbar nach der Behandlung und nach 2 Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Narben und der Blütenboden in 0,6% steriler NaCl geschüttelt und in der Suspension die Anzahl der Hefen gezählt. Der abzentrifugierte Überstand wurde einer gaschromatographischen Bestimmung unterzogen.

Tabelle 5: Vergleich von Narbe und Blütenboden. Jeweils 11 Blüten wurden mit 0,1% Komponente B besprüht, 11 Blüten blieben unbehandelt. Nach der Behandlung und nach 2 Tagen Inkubation wurden die Blütenböden und die Blütennarben getrennt in NaCl suspendiert und in der Suspension die Hefen mikroskopisch ausgezählt.

	Anzahl Hefe pro Narbe	Anzahl Hefe pro Blütenboden	Anzahl Hefe pro Narbe	Anzahl Hefe pro Blütenboden
	unbehandelt		behandelt	
Bei Behandlung	35	n.n.	19	36
Zwei Tage nach Behandlung	$4,3 \times 10^3$	$3,1 \times 10^2$	$4,7 \times 10^4$	$9,6 \times 10^4$

Die mikroskopische Auszählung der Narben zeigte, dass in den behandelten Blüten nach zwei Tagen Inkubation deutlich mehr Hefen nachzuweisen waren, als in der unbehandelten Kontrolle. Auf dem Blütenboden wurden mehr Hefen gezählt als auf einer Narbe, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (Tab. 5).

Die Acetatkonzentrationen in den Blütenproben waren sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch in den behandelten Blüten unter der Nachweisgrenze. Es konnte neben Acetat auch keine andere kurzkettige Fettsäure nachgewiesen werden. Es wurde versucht, die Flüssigkeitsmenge der Suspension zu reduzieren um die Nachweisgrenze zu erhöhen. Dies war jedoch nicht möglich, da von den Blütenböden bzw. Blütennarben ein Teil der Flüssigkeit aufgesogen wird und die verbliebene Menge nicht mehr für eine Bestimmung ausreichte.

Über die tatsächliche Wirkungsweise von *A. pullulans* bei der Verhinderung von Blüteninfektionen durch den Feuerbranderreger kann also weiterhin nur spekuliert werden. Im Produktionsmedium produzieren beide Stämme Acetat und säuern Ihre Umgebung so stark an, dass der Feuerbranderreger nicht mehr wachsen kann. Auf Blüten konnte bisher jedoch keine Acetatbildung nachgewiesen werden. Wir gehen jedoch davon aus, dass dies eher ein methodisches Problem darstellt. Es ist sehr wohl möglich, dass die Ansäuerung des Nektars an der guten Wirkung von *A. pullulans* beteiligt ist.

5.3.3 Überprüfung der Bildung von antibakteriellen Substanzen

Neben der Bildung von Acetat könnte die Produktion von antibakteriellen Substanzen durch *A. pullulans* für die gefundene Befallsreduktion auf Blüten verantwortlich sein. Die Produktion von antifungalen (Takesako et al., 1991) und antibakteriellen (McCormack et al., 1994) Substanzen durch *A. pullulans* wurde bereits für diverse Stämme von *A. pullulans* beschrieben. Die Produktion dieser Substanzen hängt vom verwendeten Stamm, vom Medium und der Wachstumsphase ab (McCormack et al., 1994). Um zu überprüfen, ob die Bildung antibakterieller Substanzen auch für die Feuerbrandsymptomreduktion durch DSM14940 und DSM14941 verantwortlich ist, wurden Hemmhofstests gegen *E. amylovora* durchgeführt.

Die Produktion von antibakteriellen Substanzen durch DSM14940 wurde nach Anzucht des Stammes in zwei unterschiedlichen Medien in Schüttelkoben untersucht. In Produktionsmedium war der pH-Wert nach der Inokulation des Mediums 4,2 oder 5,1. In NB⁺ wurde nach der Inokulation ein pH-Wert von 6,8 bzw. 7,3 gemessen. Nach 23 h wurde in beiden Medien in Zelldichte von ca. 1×10^8 Zellen/ml gemessen. Der pH-Wert in den Kulturen sank in PM auf 2,9 und in NB⁺ auf 4,6. Bis zum siebten Tag wurde kein weiteres Zellwachstum mehr festgestellt. Der pH-Wert sank weiter auf 1,8 bzw. 2,8 in PM (Tab. 6) und auf 2,5 bzw. 3,2 in NB⁺ (Tab. 7).

Weder die Kultur noch der zellfreie Kulturüberstand inhibierten das Wachstum von *E. amylovora* auf Agarplatten, bevor die Kultur von DSM14940 6 Tage alt war. Nur der Kulturüberstand einer 7 Tage alten PM-Kultur, in der der pH-Wert auf 1,8 absank und von einer

NB⁺ Kultur, in der pH-Wert auf 2,5 absank, ergaben einen kleinen Hemmhof gegen *E. amylovora*. Diese Hemmhöfe wurden nur auf NB⁺A Platten jedoch nicht auf NB⁺ APuf Platten gefunden, die auf pH-7 gepuffert waren. Streptomycinsulfat wurde auf jeder Platte als Kontrolle aufgetropft. Dies führte zu Hemmhöfen mit 16,5 bis 18,5 mm on NB⁺A (Abb. 6). Auf NB⁺Apuf waren auch die durch Streptomycinsulfat hervorgerufenen Hemmhöfe kleiner (0 to 6,5 mm) als auf NB⁺A.

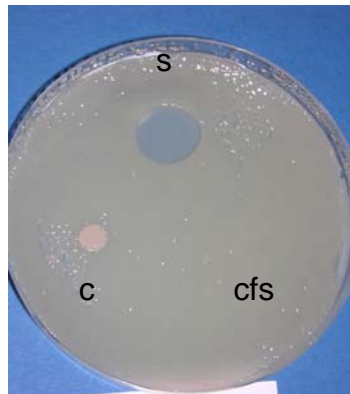


Abbildung 7: Hemmhöfe auf NB⁺ A Platten. Jeweils 10 µl mit Streptomycinsulfat (s), Kulturlösung (c) oder zellfreiem Kulturüberstand (cfs) von DSM14940 wurden aufgetropft.

Die Produktion von antibakteriellen Substanzen durch DSM14941 wurde nach Anzucht des Stammes in zwei unterschiedlichen Medien in Schüttelkoben untersucht. In Produktionsmedium war der pH-Wert nach der Inokulation des Mediums 4,0 oder 4,7. In NB⁺ wurde nach der Inokulation ein pH-Wert von 6,8 bzw. 7,4 gemessen. Nach 23 h wurde in beiden Medien in Zelldichte von ca. 1×10^8 Zellen/ml gemessen. Der pH-Wert in den Kulturen sank in PM auf 2,9 und in NB⁺ auf 4,6. Bis zum siebten Tag wurde kein weiteres Zellwachstum mehr festgestellt. Der pH-Wert sank weiter auf 2,3 bzw. 2,7 in PM (Tab. 8) und auf 2,5 bzw. 2,7 in NB⁺ (Tab. 9).

Weder die Kultur noch der zellfreie Kulturüberstand inhibierten das Wachstum von *E. amylovora* auf Agarplatten bevor die Kultur von DSM14940 4 Tage alt war. Nur mit dem Kulturüberstand einer 7 Tage alten PM-Kultur, in der der pH-Wert auf 2,3 absank und von einer NB⁺ Kultur, in der pH-Wert unter 3,0 absank, ergaben einen kleinen Hemmhof gegen *E. amylovora*. Diese Hemmhöfe wurden nur auf NB⁺A Platten, jedoch nicht auf NB⁺ APuf Platten gefunden, die auf pH 7 gepuffert waren. Streptomycinsulfat wurde auf jeder Platte als Kontrolle aufgetropft. Dies führte zu Hemmhöfen mit 16,5 bis 18,5 mm on NB⁺A. Auf

NB⁺Apuf waren auch die durch Streptomycinsulfat hervorgerufenen Hemmhöfe kleiner (0 to 6.5 mm) als auf NB⁺A.

Für die kommerzielle Produktion von *A. pullulans* werden Fermenterbatches (1-50 cbm) in PM gefahren. Nach dem Wachstum der Blastosporen für 2 bis 3 Tage werden die Zellen vom Kulturüberstand separiert und zu Granulat weiter verarbeitet. Um sicherzustellen, dass während des Produktionsvorgangs keine bakteriziden Substanzen produziert werden, wurden 3 Fermenterläufe mit DSM14941 mit Hemmhoftests untersucht (Tab. 10). Die Kulturen wuchsen bis zu einer Zelldichte von 1×10^9 Zellen/ml. Weder die Kultur noch der zellfreie Überstand führten zur Hemmhofbildung auf mit *E. amylovora* beimpften NB⁺A Platten. Mit Streptomycinsulfat wurde ein Hemmhof von 17,3 mm erzielt.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei der kommerziellen Produktion der beiden *A. pullulans* Stämme keine Bildung antibakterieller Substanzen zu erwarten ist. Die Ergebnisse beider Stämme deuten vielmehr darauf hin, dass die in Einzelfällen gefundenen Hemmhöfe durch den niedrigen pH-Wert des Kulturüberstandes hervorgerufen wurden.

Möglicherweise sind auch die Hemmhöfe, die von Duffy et al. (Duffy et al., 2006) beschrieben wurden auf die Absenkung des pH-Wertes im Medium durch das Wachstum von Kolonien von DSM14940 und DSM14941 zurück zu führen. Auch Studien der Universität Konstanz zum Wirkungsmechanismus von BlossomProtect (Kunz, 2006) zeigen, dass die Komponente B, welche *A. pullulans* enthält den pH-Wert in Schüttelkolben absenkt und dadurch das Wachstum von *E. amylovora* in diesen Kolben verhindert. Die pH-Wert Absenkung durch *A. pullulans* ist also ein wahrscheinlicherer Wirkmechanismus als die Bildung von antibakteriellen Substanzen.

Tabelle 6: Wachstum von *A. pullulans* DSM14940 in PM, pH und Hemmhofdurchmesser von 10µl Kultur oder zellfreiem Kulturüberstand auf Agarplatten (NB⁺A or NB⁺Apuf), die mit *E. amylovora* bewachsen waren. Zur Kontrolle wurden 10µl Streptomycinsulfat (250 mg/l) aufgetropft (Strept.). Jeweils zwei Kulturen (I+II) wurden untersucht. Hemmhöfe warden als Durchschnitt von zwei Agarplatten angegeben. – Fehlende Messwerte .

Zeit nach Inokulation (h)	pH		log (Zellen/ml)		Hemmhofdurchmesser (mm)												
					Strept.		Überst.		Kultur		Strept.		Überst.		Kultur		
					NB ⁺ A						NB ⁺ Apuf						
					I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I
0	4,2	5,1	6,0	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	3	-	7,5	-	18,3	-	0	-	0	-	2	-	0	-	0	-	-
23	2,9	-	7,9	-	19,3	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-
44	2,7	-	7,9	-	17,6	-	0	-	0	-	2,5	-	0	-	0	-	-
67	2,6	4	8,1	8,2	17,3	18,3	0	0	0	0	4,3	6	0	0	0	0	0
92	2,4	3,7	7,9	8,3	18,5	15	0	0	-	0	7	0	0	0	0	0	0
115	-	3,3	-	8,3	-	16	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0
139	-	3	-	8,3	-	17,8	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0
163	1,8	2,8	8,1	8,3	17,8	15,3	4,3	0	0	0	0	1,8	0	0	0	0	0

Tabelle 7: Wachstum von *A. pullulans* DSM14940 in NB⁺, pH und Hemmhofdurchmesser von 10µl Kultur oder zellfreiem Kulturüberstand auf Agarplatten (NB⁺A or NB⁺Apuf), die mit *E. amylovora* bewachsen waren. Zur Kontrolle wurden 10µl Streptomycinsulfat (250 mg/l) aufgetropft (Strept.). Jeweils zwei Kulturen (I+II) wurden untersucht. Hemmhöfe warden als Durchschnitt von zwei Agarplatten angegeben. – Fehlende Messwerte .

Zeit nach Inokulation (h)	pH		log (Zellen/ml)		Hemmhofdurchmesser (mm)												
					Strept.		Überst.		Kultur		Strept.		Überst.		Kultur		
					NB ⁺ A						NB ⁺ Apuf						
					I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I
0	6,8	7,3	6,0	5,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	4,7	-	7,8	-	17,5	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
23	4,6	-	8,1	-	18,5	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
44	4,5	-	8,1	-	17,5	-	0	-	0	-	2,5	-	0	-	0	-	0
67	3,8	4,7	8,2	8,1	16,5	17	0	0	0	0	5,8	0	0	0	0	0	0
92	3,2	4,3	8,1	8,1	18,3	15	0	0	-	0	6,5	0	0	0	0	0	0
115	-	3,9	-	8,1	-	16,3	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0
139	-	3,5	-	8,1	-	16,5	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0
163	2,5	3,2	8,1	8,2	18,5	17,3	3,5	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0

Tabelle 8: Wachstum von *A. pullulans* DSM14941 in PM, pH und Hemmhofdurchmesser von 10µl Kultur oder zellfreiem Kulturüberstand auf Agarplatten (NB⁺A or NB⁺Apuf), die mit *E. amylovora* bewachsen waren. Zur Kontrolle wurden 10µl Streptomycinsulfat (250 mg/l) aufgetropft (Strept.). Jeweils zwei Kulturen (I+II) wurden untersucht. Hemmhöfe warden als Durchschnitt von zwei Agarplatten angegeben. – Fehlende Messwerte .

Zeit nach Inokulation (h)	pH		log (Zellen/ml)		Hemmhofdurchmesser (mm)												
					Strept.		Überst.		Kultur		Strept.		Überst.		Kultur		
					NB ⁺ A						NB ⁺ Apuf						
					I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I
0	4	4,7	6,0	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	3,4	-	7,1	-	17,5	-	0	-	0	-	1,5	-	0	-	0	-	-
23	3,2	-	7,9	-	19,3	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	-
44	3,4	-	8,0	-	17,0	-	0	-	0	-	2,5	-	0	-	0	-	-
67	3,8	4	8,4	8,2	17,5	17,5	0	0	0	0	6,8	5	0	0	0	0	0
92	3,1	3,8	8,4	8,1	16,8	15,5	-	0	-	0	6,5	0	0	0	0	0	0
115	-	3,2	-	8,2	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0
139	-	2,9	-	8,2	-	18	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	0
163	2,3	2,7	8,2	8,4	18,0	16	6,3	6	0	0	5,8	0	0	0	0	0	0

Tabelle 9: Wachstum von *A. pullulans* DSM14941 in NB⁺, pH und Hemmhofdurchmesser von 10µl Kultur oder zellfreiem Kulturüberstand auf Agarplatten (NB⁺A or NB⁺Apuf), die mit *E. amylovora* bewachsen waren. Zur Kontrolle wurden 10µl Streptomycinsulfat (250 mg/l) aufgetropft (Strept.). Jeweils zwei Kulturen (I+II) wurden untersucht. Hemmhöfe warden als Durchschnitt von zwei Agarplatten angegeben. – Fehlende Messwerte .

Zeit nach Inokulation (h)	pH		log (Zellen/ml)		Hemmhofdurchmesser (mm)											
					Strept.		Überst.		Kultur		Strept.		Überst.		Kultur	
					NB ⁺ A						NB ⁺ Apuf					
					I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	6,8	7,4	6,0	6,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	5,1	-	7,7	-	18,3	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
23	4,8	-	8,0	-	18,5	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
44	3,9	-	8,2	-	17,0	-	0	-	0	-	5,8	-	0	-	0	-
67	3,3	3,7	8,1	8,1	16,8	16,3	0	0	0	0	5	4	0	0	0	0
92	2,6	3,2	8,3	8,1	16,5	15	0	0	-	0	6,3	0	0	0	0	0
115	-	2,9	-	8,1	-	16	-	4,5	-	0	-	0	-	0	-	0
139	-	2,8	-	8,2	-	16	-	5,5	-	0	-	0	-	0	-	0
163	2,3	2,7	8,2	8,1	18,0	17,3	5,8	5,8	0	0	5	0	0	0	0	0

Tabelle 10: Hemmhofdurchmesser von 10µl Kultur von DSM14941 oder zellfreiem Kulturüberstand auf mit *E. amylovora* bewachsenen Agarplatten (NB+A). Zur Kontrolle wurden 10µl Streptomycinsulfat (250 mg/l) aufgetropft (Strept.). Drei Fermenterläufe wurden untersucht. Hemmhöfe werden als Durchschnitt von zwei Agarplatten angegeben. – Fehlende Messwerte.

Kultur	Fermentationszeit (d)	Zelldichte (log(Zellen/ml))	Hemmhofdurchmesser (mm) on NB ⁺		
			Strept.	Überstand	Kultur
I	3	8,8	-	0	0
II	2	8,8	-	0	0
III	3	9,0	17,3	0	0

6. Applikationstermin von BlossomProtect

Der geeignete Applikationstermin eines Präparates hängt vom Wirkmechanismus ab. Für BlossomProtect ist der Wirkmechanismus noch nicht endgültig geklärt. Es könnte sich um eine Kombination verschiedener Mechanismen handeln. Wie unter Glp. 5 gezeigt, könnte die Ansäuerung der Umgebung dazu führen, dass der Erreger sich nicht mehr vermehren kann. Messungen der epiphytischen Population von *E. amylovora* auf Blüten mit oder ohne Behandlung mit BlossomProtect zeigten, dass die epiphytische Erregerzahl durch die BlossomProtect Behandlung nicht reduziert wird. Trotzdem wurde in diesem Versuchsansatz die Anzahl der Blüten mit Feuerbrandsymptomen durch BlossomProtect deutlich reduziert (S. Kunz, Universität Konstanz, pers. Mitteilung). Es wird vermutet, dass *A. pullulans* nicht auf der Narbe aktiv ist, wo der Erreger sich am stärksten vermehrt, sondern im Nektar am Blütenboden, wo der Erreger über Nektarthoden ins Gewebe eindringt. *A. pullulans* könnte durch Mycelbildung im Nektar eine mechanische Barriere bilden oder durch Ansäuerung des Nektars (s. o.) die Mobilität des Erregers hemmen. Denkbar wäre auch die Induktion von Abwehrreaktionen der Pflanze, die dann die Ausbreitung des Erregers im Gewebe verhindern.

Ausschließen kann man auf jeden Fall eine dem Streptomycin vergleichbare bakterizide Wirkung. Deshalb ist die Frage: Wann muss BlossomProtect im Vergleich zum Streptomycin eingesetzt werden, um die Infektion durch *E. amylovora* zu verhindern. Damit der Applikationszeit-

punkt mit den Prognoseprogrammen berechnet werden kann, muss bekannt sein, bis zu welcher Temperatursumme BlossomProtect noch wirksam ist.

Dazu wurden vergleichende Blütenversuche mit BlossomProtect und mit Strepto bei 21°C und 24°C durchgeführt. Der Behandlungszeitpunkt betrug 1, 16, 22 und 40 h nach Inokulation mit dem Feuerbranderreger. Dies entspricht den in Tabelle 11 angegebenen kumulativen Temperatursummen zur Basis 18,3°C (CDH18).

Tabelle 11: Kumulative Stundengrade zur Basis 18°C (CDH18) zu den angegebenen Behandlungszeitpunkten bei 21°C und 24°C

Behandlungszeitpunkt (h nach Inokulation)	CDH18 bei 21°C	CDH18 bei 24°C
1	2,7	5,7
16	43,2	91,2
22	59,4	125,4
40	108	228

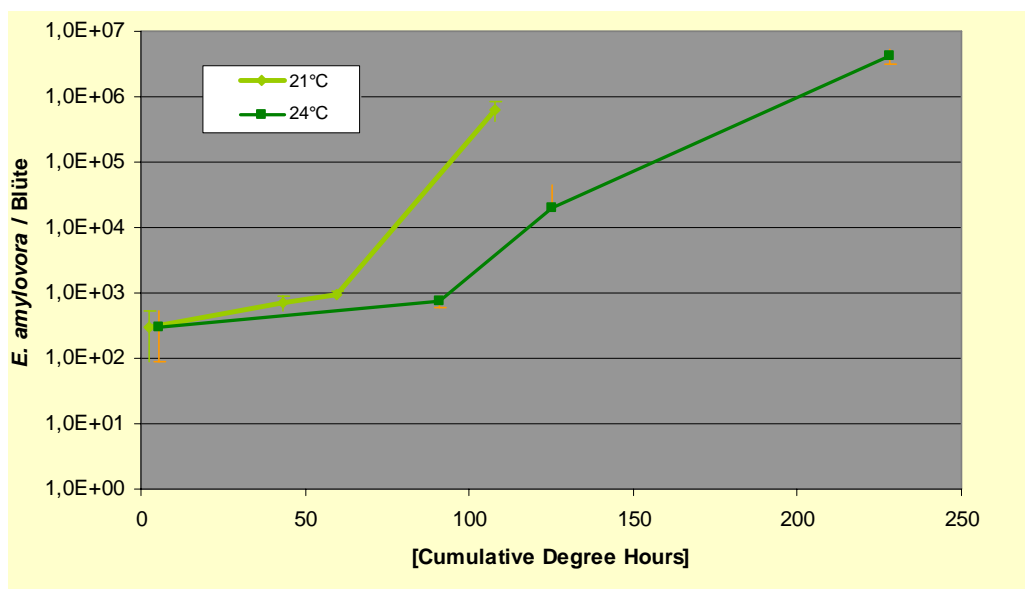


Abbildung 8: Wachstum von *E. amylovora* auf Apfelblüten in Abhängigkeit von der Temperatur. Apfelblüten wurden in 10%ige Saccharoselösung gestellt, mit dem Erreger inokuliert und bei unterschiedlicher Temperatur inkubiert. Die Probenahme mit anschließender PCR-Bestimmung erfolgte nach 1,16, 22 und 40 h.

Ab einem CDH18 von 110 sind die Infektionsbedingungen für Feuerbrand nach dem Prognosemodell Maryblyt erfüllt. Es wurde sowohl die Vermehrung des Erregers auf den Blüten mit einer real-time PCR Methode (Salm and Geider, 2004) gemessen als auch die Wirksamkeit der Präparate anhand der Symptombildung an den Blüten nach 6 Tagen ausgewertet. Die Temperatursumme (Cumulative degree hour) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{CDH } 18 = (\text{Temperatur} - 18,3) \times \text{N Stunden}$$

Die Vermehrung von *E. amylovora* auf den Blüten war bei 24°C wie erwartet schneller als bei 21°C. Laut dem Prognosemodell Maryblyt ist die Vermehrung vom CDH18 abhängig. Deshalb erwarteten wir auf den Blüten einheitliche Wachstumskurven für beide Temperaturen, wenn wir die Vermehrung auf den CDH18 und nicht auf die Zeit beziehen. Diese Annahme bestätigte sich jedoch nicht. Bei einer Temp. von 21°C benötigte man einen geringeren CDH18 für eine starke Vermehrung als bei einer Temp. von 24°C (Abb. 8).

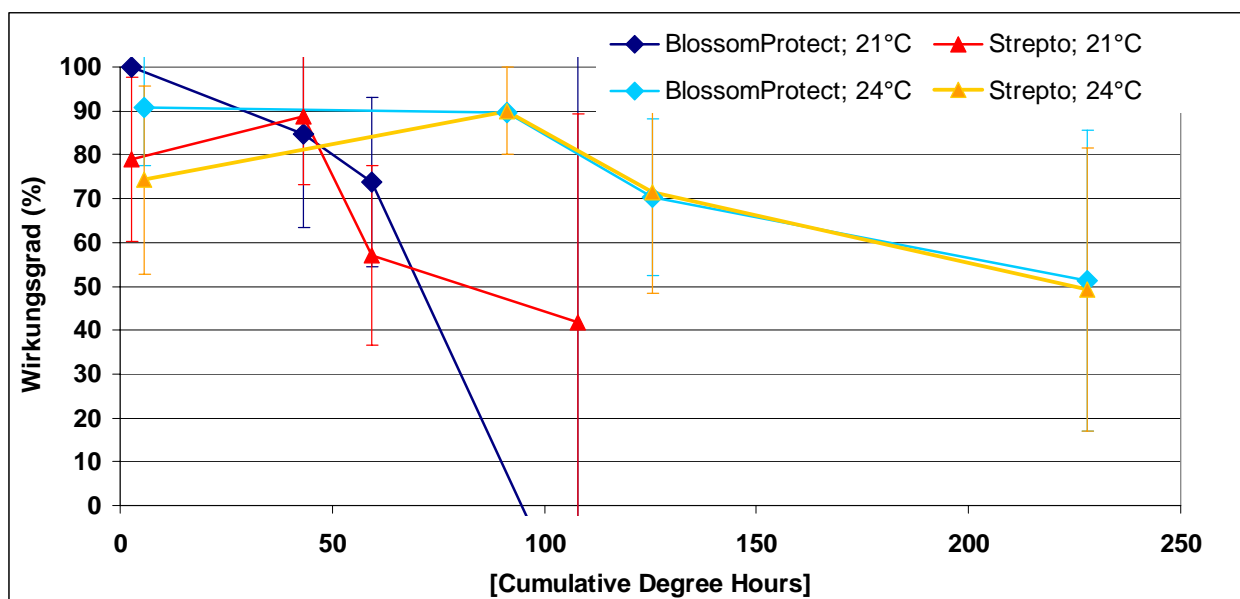


Abbildung 9: Wirkung von BlossomProtect und Strepto bei unterschiedlichen Anwendungszeitpunkten. Apfelblüten wurden in 10% Saccharoselösung gestellt und bei unterschiedlicher Temperatur inkubiert. Die Behandlung erfolgte 1, 16, 22 und 40 h nach Inokulation. Nach 6 Tagen wurde die Symptomentwicklung bonitiert und die Reduktion gegenüber der mit Leitungswasser behandelten Kontrolle errechnet.

Dieses Bild spiegelt sich auch in der Auswertung der Wirksamkeit der Präparate wieder, wenn sie zu unterschiedlichen Zeiten eingesetzt wurden (Abb. 9). Bezogen auf den CDH18 ergab

sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Inkubationstemperatur, nicht aber zwischen den Präparaten. Bei der Inkubationstemperatur von 21°C waren die Behandlungen nur bis zu einem CDH18 von 60 wirksam (entspricht 22h nach Inokulation). Bei der Inkubationstemperatur von 24°C war die Behandlung bis zu einem CDH18 von 125 wirksam (entspricht 22h). Zwischen BlossomProtect und Streptomycin konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Die Versuche wurden zweimal durchgeführt. Die Infektionsrate in unbehandelt war teilweise unter 30%, so dass bei der Berechnung der Wirkungsgrade große Schwankungen auftraten und eine statistische Verrechnung nicht möglich war. Weitere Wiederholungen konnten wegen Pilzbefalls nicht ausgewertet werden, so dass diese Ergebnisse nur tendenziell gültig sind und die Versuche wiederholt werden, sobald wieder Blüten zur Verfügung stehen.

7. Wirksamkeit und Phytotoxizität von BlossomProtect

7.1 Wirksamkeit an Topfbäumen

Im Freiland sollte die Wirkung des aus zwei Komponenten bestehenden Pflanzenstärkungsmittels BlossomProtect gegen Feuerbrand im Vergleich zu seinen Einzelkomponenten sowie dem alternativen CKC-Puffer (auf Basis von Zitronensäure und Kaliumcarbonat) überprüft werden. Dazu wurden nach der Behandlung von getopften Bäumen Blüten entnommen und im Labor mit dem Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* künstlich infiziert.

Der Versuch wurde an der Sorte 'Gala' am Standort Lohnerhofstrasse durchgeführt. Jede Behandlung wurde an 4 Bäumen ausgebracht. Die Behandlungen (Tab. 12) erfolgten am 19.05.06 und 22.05.06. Die Probenahme erfolgte unmittelbar im Anschluss an diese Behandlungen sowie zusätzlich am 24.05.06

Wie sich bereits in früheren Freilandversuchen gezeigt hat, wird die Wirkung von BlossomProtect bzw. von Komponente B nach der zweiten Behandlung deutlich gesteigert. Das Hefepräparat erzielte hier 71% Wirkung, Komponente B sogar 79% und lag damit deutlich über dem Pflanzenschutzmittel Strepto (auf Basis des Antibiotikums Streptomycinsulfat). Der alternative CKC-Puffer auf Basis von Kaliumcarbonat erzielte sowohl als Einzelkomponente als auch in Kombination mit den Hefen einen schlechteren Wirkungsgrad als der Puffer P bzw. BlossomProtect.

Zwei Tage nach der 2. Behandlung zeigte BlossomProtect immer noch einen Wirkungsgrad von 40%, die Kombination mit CKC-Puffer erzielte 14% Wirkung, obwohl die Höchsttemperaturen in

diesen zwei Tagen unter 20° lagen und es an beiden Tagen geregnet hatte und somit keine Feuerbrandbedingungen herrschten. Die jeweiligen Einzelkomponenten zeigten hier keine Wirkung mehr.

Tabelle 12: Befall und Reduktion der Bakterienfleckenbildung auf den aus den jeweiligen Parzellen entnommenen und im Labor mit *E.amylovora* 385 inokulierten Apfelblüten. Die prozentuale Reduktion des Befalls gegenüber der mit Leitungswasser behandelten Kontrolle wurde als Wirkungsgrad berechnet.

	1. Behandlung		2. Behandlung			
	Befall (%)	Wirkung (%)	Befall (%)	Wirkung (%)	Befall (%)	Wirkung (%)
	Probenahme im Anschluss		Probenahme im Anschluss		Probenahme zwei Tage später	
Kontrolle	75		58,3		41,7	
Komponente B (0,15%)	37,5	50	12,5	79	47,8	-15
Komponente A (1,05%)	54,2	28	45,8	21	57,1	-37
BlossomProtect (1,2%)	41,7	44	16,7	71	25,0	40
CKC-Puffer (0,65%)	70,8	6	58,3	0	60,0	-44
Komponente B (0,15%) + CKC-Puffer (0,65%)	50,0	33	33,3	43	22,7	14
Strepto (0,06%)	70,8	6	33,3	43	22,7	46

7.2 Wirksamkeit und Phytotoxizität von BlossomProtect im Freiland

Im Freiland wurden Wirksamkeitsversuche sowie Berostungsbonituren in einer nach IP bewirtschafteten Apfelanlage in Reichenau-Waldsiedlung an der berostungsempfindlichen Sorte Golden Delicious durchgeführt [Pflanzjahr 1993, Klon B]. Jede Behandlung wurde in vier Parzellen mit je sechs Bäumen ausgebracht. Zwischen den Parzellen wurden jeweils zwei Trennbäume gelassen, um eine gegenseitige Kontamination zu verhindern.

Zur Untersuchung der Wirksamkeit gegen den Feuerbranderreger wurde nach jeder Behandlung und am Tag zwischen der ersten und zweiten Behandlung Proben (24 Blüten aus jeder Parzelle) genommen.

Termine der Behandlungen Termine der Probenahmen:

- 18.04.07	18.04.07/19.04.07
- 20.04.07	20.04.07
- 23.04.07	23.04.07
- 25.04.07	25.04.07

Mit BlossomProtect wurde an 3 Probenahmen ein Wirkungsgrad zwischen 58 und 78% erzielt. Über den gesamten Behandlungszeitraum und auch in den Tagen zuvor fand kein Niederschlag statt. Weiterhin lagen die Temperaturen weit über 20°C, weswegen die Blühperiode sehr kurz war. Da einen Tag nach der ersten Behandlung bereits 50 % der Blüten offen waren, wurden bei dieser Probenahme wahrscheinlich teilweise Blüten gesammelt, die nicht behandelt worden waren. Hier erzielte BlossomProtect mit 4% keinen ausreichenden Wirkungsgrad. Bei diesen Temperaturen hätte vermutlich jeden Tag eine Behandlung erfolgen müssen, um die Blüten ausreichend zu schützen.

Tabelle 13: Befall und Reduktion der Bakterienschleimbildung auf den aus den jeweiligen Parzellen entnommenen und im Labor mit *E. amylovora* 385 inokulierten Apfelblüten. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb einer Probenahme im Kruskal Wallis Test ($p < 0,05$).

	18.04.		19.04.		20.04.		23.04.		23.04.	
	1. Behandlung		1 Tag nach 1. Behandlung		2. Behandlung		3. Behandlung		3. Behandlung	
	Be- fall	WG %	Be- fall	WG%	Be- fall	WG %	Befall	WG %	Befall	WG%
Leitungswasser	a	9,4	a	27,1	a	12,5	a	66,7	a	18,8
BlossomProtect	a	2,1	a	26,0	a	5,2	b	27,3	a	17,1
Komp. B + POM	a	0,0	a	22,9	a	7,3	ab	43,1	a	21,9

Der Wirkungsgrad von Komponente B + POM-Puffer war bei den ersten beiden Probenahmen besser als der von BlossomProtect, bei den nächsten drei Probenahme schlechter. Bei der 3. Probenahme, bei der mit BlossomProtect eine signifikante Wirkung von 59% erzielt wurde, unterschied sich die Behandlung Komponente B+ POM-Puffer nicht signifikant zur Kontrolle und zu BlossomProtect (Tab. 13). Tendenziell bestätigen diese Ergebnisse somit die Ergebnisse aus dem Blütenversuch, wonach Komponente B + POM-Puffer etwas schlechtere Wirkungsgrade erzielt, die Unterschiede lassen sich statistisch jedoch nicht absichern. Geplant war der Vergleich der Präparate mit einer mit Leitungswasser behandelten Kontrolle und mit der Praxisvariante. Durch ein Missverständnis wurde der gesamte Versuch (inkl. der Leitungswasserkontrolle und Praxisvariante) vom Betriebsleiter am 21.4. mit BlossomProtect behandelt. Die Leitungswasserkontrolle unterscheidet sich somit von der Praxisvariante nur durch die vier Behandlungen mit Wasser. Zwischen Kontrolle und Praxisvariante konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

Tabelle 14: Ergebnisse der Berostungsbonitur: Pro Parzelle wurden zwischen 200 und 400 Äpfel in die Berostungsklassen 1-4 eingeteilt und daraus der Berostungsindex ermittelt. Aus den 4 Parzellen wurde der Mittelwert gebildet. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb einer Behandlung beim tukey-test bei einem Signifikanzniveau von 0,05.

Behandlung	Berostungsindex	Tukey
Leitungswasser	2,14 ± 0,19	ab
1,2 % Blossom-Protect	2,68 ± 0,2	cd
Kom. B + POM	2,73 ± 0,27	d
CF 40 Granulat	2,47 ± 0,08	bcd
CF 10 Granulat	2,5 ± 0,09	bcd
1,2% BlossomProtect + 1,5% Cutisan	2,56 ± 0,1	bcd
1,5% Komp. B	3,33 ± 0,21	e
Praxisvariante (1x BlossomProtect genau wie Kontr.)	2,3 ± 0,14	abcd

Am 14.08. und 15.08.07 wurden in jeder Parzelle zwischen 200 und 400 Früchte auf Berostung bonitiert. Fünf Behandlungen mit BlossomProtect im Vergleich zu einer Behandlung in der Kontrolle erhöhten den Berostungsindex signifikant von 2,14 auf 2,68. Allerdings ergab sich zwischen der Praxisvariante (1 Behandlung) und den BlossomProtect Parzellen (5 Behandlungen) kein signifikanter Unterschied. Der Unterschied zwischen BlossomProtect und den Einzelstämmen bzw. der Hefekomponente in Mischung mit dem alternativen POM-Puffer war nicht signifikant. Dies lässt vermuten, dass die Hefekomponente einen wesentlichen Teil zur Berostung beiträgt. Dies wird bestätigt durch den Berostungsindex, der in den mit der 10fachen Konzentration der Hefekomponente behandelten Parzellen errechnet wurde. Dieser lag mit 3,33 signifikant über allen anderen Varianten (Tab. 14). Die Verwendung des alternativen POM Puffer ergab keinen Unterschied zu BlossomProtect. Die Zugabe von 1,5% Cutisan zu BlossomProtect konnte bei diesem Versuch die Berostung im Vergleich zu BlossomProtect alleine tendenziell verringern.

7.3 Einfluss der Wasseraufwandmenge auf Wirkung und Phytotoxizität

Im Freiland wurde die Wirkung des aus zwei Komponenten bestehenden Pflanzenstärkungsmittels BlossomProtect gegen Feuerbrand im Vergleich zu unbehandelten Parzellen überprüft. Das Präparat wurde dabei mit zwei unterschiedlichen Wasseraufwandmengen (1000 l, Düsentyp Albus ATR grün und 200 l, Düsentyp Albus ATR violett) eingesetzt. Dazu wurden nach der Behandlung aus den einzelnen Parzellen Blüten entnommen und im Labor mit dem Feuerbranderreger *Erwinia amylovora* künstlich infiziert. Bei entsprechendem Reifegrad wurden dann die Äpfel in den einzelnen Parzellen auf Berostung bonitiert.

Die künstliche Inokulation der Blüten, die einen Tag nach der Behandlung aus der Anlage entnommen wurden, ergab, dass in der unbehandelten Kontrolle 41% der Blüten mit Feuerbrand infiziert werden konnten. Dagegen waren bei den BlossomProtect behandelten Blüten nur 17,7% (200l) bzw. 25% (1000l) der Blüten zu infizieren. Die Wasseraufwandmenge von 200l ergab tendenziell eine höhere Befallsreduktion. Der Unterschied war statistisch nicht absicherbar (Abb. 10).

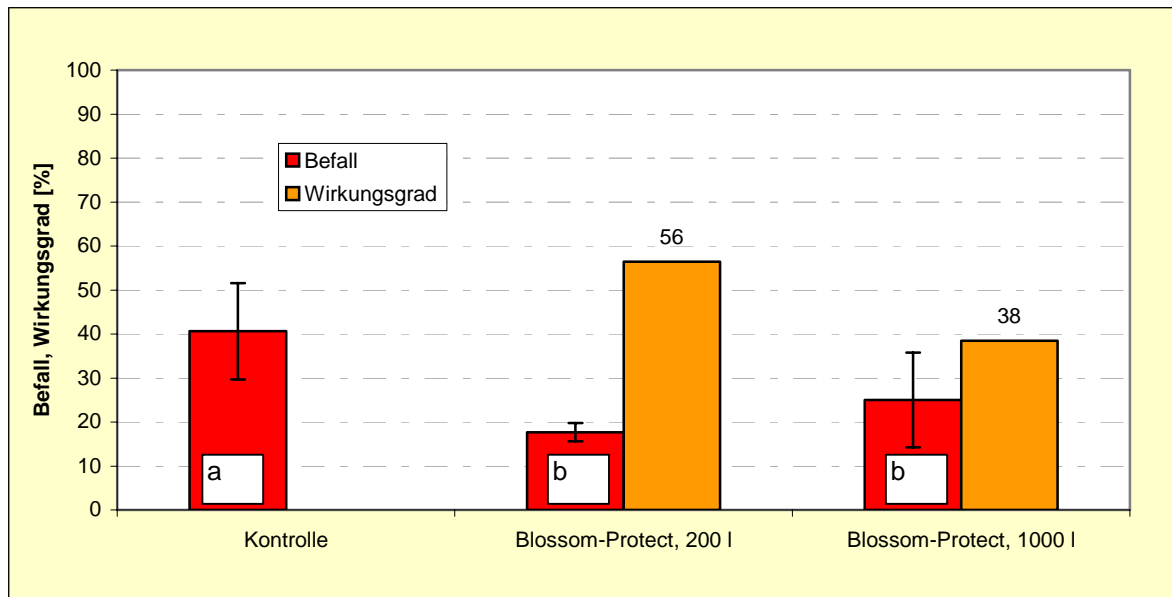


Abbildung 10: Befall der mit *E.amylovora* 385 inokulierten Apfelblüten. Pro Behandlung wurden aus 4 Parzellen je 24 Blüten entnommen.

Keine der Behandlungen mit BlossomProtect hatte einen signifikanten Einfluss auf die Berostung der Früchte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 11).

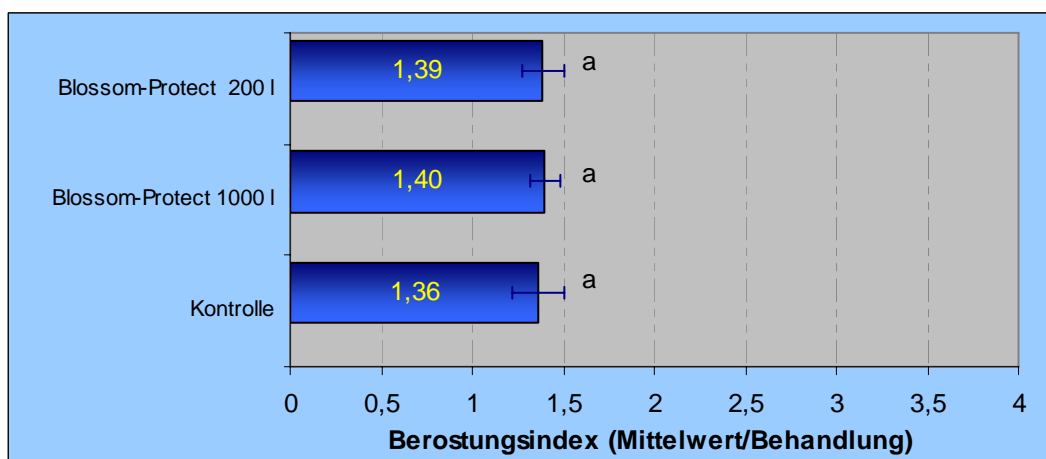


Abbildung 11: Ergebnisse der Berostungsbonitur am 17.08.2006. Pro Parzelle wurden zwischen 407 und 423 Äpfel in die Berostungsklassen 1-4 eingeteilt und daraus der Berostungsindex ermittelt. Aus den 4 Parzellen wurde der Mittelwert gebildet. Unterschiedliche Buchstaben neben den Säulen zeigen signifikante Unterschiede innerhalb einer Behandlung beim Dunn's multiple comparison test bei einem Signifikanzniveau von 0,05.

7.4 Freilandversuche zur Phytotoxizität

Im Freiland wurden 2006 Berostungsbonituren in zwei nach IP bewirtschafteten Anlagen im Bodenseeraum an insgesamt 5 Sorten durchgeführt. Eine signifikante Mehrberostung wurde an der Sorte Golden Delicious (1 Behandlung) festgestellt. Keine signifikante Mehrberostung gab es bei Arlet, Elstar, Jonagold (1 Behandlung) und Braeburn (2 Behandlungen) (Tab. 15).

Tabelle 15: Ergebnisse der Berostungsbonitur berechnet als Berostungsindex am 23.08. bzw. 14.09.2006. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb einer Sorte ($p < 0,05$).

	Anlage Litzelstetten 2			Anlage Reichenau	
	Arlet	Elstar	Jonagold	Golden Delicious	Braeburn
Kontrolle	1,79 a	1,11 a	1,02 a	1,79 a	1,30 a
BlossomProtect	1,86 a	1,13 a	1,09 a	2,23 b	1,37 a

8. Freilandversuche anderer Versuchsansteller

BlossomProtect wurde in den Jahren 2006 und 2007 auch anderen Versuchsanstellern für Versuche zur Wirksamkeit und zur Phytotoxizität zur Verfügung gestellt. Versuche zur Wirksamkeit nach der EPPO-Richtlinie wurden in 2006 und 2007 jeweils an vier Standorten (Kirschgartshausen, Amtzell, Karsee, Darmstadt) durchgeführt, an denen auch mit dem Erreger inokuliert werden durfte.

8.1 Versuche zur Wirksamkeit

8.1.1 Exaktversuche 2006

In Karsee und Darmstadt wurden Präparate verwendet, die im ökologischen Obstbau eingesetzt werden können. Die Wirksamkeit von BlossomProtect war mit über 80% höher als das verwendete Standardpräparat Myco-Sin (Tab. 16). Der Einsatz der Fungizide Netzschwefel und Schwefelkalk 2 Stunden bzw. 1 Tag vor der BlossomProtect Anwendung hatte keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von BlossomProtect. Die Zugabe von Cutisan zu BlossomProtect soll Fruchtoberostung verhindern. Cutisan verringerte die Wirkung von BlossomProtect nur wenig.

In Kirschgartshausen und Amtzell wurden in den Versuchen IP-Präparate eingesetzt. Mit dem Vergleichsmittel Strepto wurde jeweils eine Wirkung von über 80% erzielt. In Kirschgartshausen wurden mit zwei Behandlungen BlossomProtect eine Wirkung von 61% erreicht, dies entspricht den Erfahrungen aus den letzten Jahren. Fungizidbehandlungen mit Delan vor und nach der BlossomProtect Behandlungen verringerten die Wirksamkeit von BlossomProtect nicht. In Amtzell war die Wirksamkeit von BlossomProtect mit und ohne Delan geringer. Hier war die Blühperiode deutlich länger als in Kirschgartshausen, so dass mit zwei Behandlungen nicht alle Blüten mit Hefen getroffen wurden. Am Standort Karsee konnte bei einer vergleichbaren Blühperiode mit vier Behandlungen eine deutlich höhere Wirksamkeit erzielt werden.

Die Versuche 2006 bestätigten die gute Wirksamkeit von BlossomProtect, die auch schon in den Vorjahren festgestellt wurde (Kunz and Haug, 2006).

Tabelle 16 : Freilandversuche zur Feuerbrandbekämpfung mit BlossomProtect in 2006 an vier Standorten. In unbehandelt wird der Befall (% befallene Blütenbüschel) für die Behandlungen die (Anzahl der Behandlungen) und der Wirkungsgrad (%) angegeben.

Behandlung	Kirschgartshausen	Amtzell	Karsee	Darmstadt
Unbehandelt	4,0	8,0	5,9	21
BlossomProtect 1,2%	(2) 61	(2) 44	(4) 86	(4) 85
BlossomProtect 1,2% nach Delan	(2) 67 (2)	(2) 27 (3)		
BlossomProtect 1,2% nach Netzschwefel 0,25%			(4) 88 (3)	(4) 86 (1)
BlossomProtect 1,2% nach Schwefelkalk 1,5%				(3) 85 (1)
BlossomProtect 1,2% und Cutisan 1,5%			(4) 77	
BPASC6 0,65% (Komp. B mit PufferCKC)			(4) 63	
Strepto 0,06%	(2) 85	(2) 89		
Myco-Sin 1,0%			(4) 60	(4) 80

8.1.2 Exaktversuche 2007

Tabelle 17 : Freilandversuche zur Feuerbrandbekämpfung mit BlossomProtect in 2007 an vier Standorten. In unbehandelt wird der Befall (% befallene Blütenbüschel) für die Behandlungen, die Anzahl der Behandlungen und der Wirkungsgrad (%) angegeben.

Behandlung	Kirschgartshausen	Amtzell	Karsee	Darmstadt
Unbehandelt	5,1	25,5	11,2	33
BlossomProtect 1,2%	-	-	(4) 89 (3) 83	(4) 82
BPGP07	(2) 46	(2) 8	(4) 78	
BlossomProtect 1,2% alternierend mit Netzschwefel 0,25%			(3) 84 (3)	
BlossomProtect 1,2%			(3) 77	
Alternierend mit Schwefelkalk 1,5%			(3)	
BlossomProtect 1,2% und Cutisan 1,5%			(4) 74	
Funguran 0,03%			(3) 38	(4) 62
Strepto 0,06%	(2) 84	(2) 27		
Myco-Sin 1,0%			(3) 74	

In Karsee und Darmstadt wurden 2007 Präparate verwendet, die im ökologischen Obstbau eingesetzt werden können. Die Wirksamkeit von BlossomProtect war mit wiederum über 80% höher als die der Vergleichspräparate Myco-Sin und Funguran (Tab. 17). Der alternierende Einsatz der Fungizide Netzschwefel oder Schwefelkalk hatte keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von BlossomProtect. Die Zugabe von Cutisan zu BlossomProtect soll Fruchtberostung verhindern. Cutisan verringerte die Wirkung von BlossomProtect nur wenig. Auch der Einfluss der Behandlungshäufigkeit mit BlossomProtect war im Versuch in Karsee gering. Drei Behandlungen nach Warnaufruf waren ähnlich wirksam wie vier Behandlungen nach Phänologie. Das Versuchspräparat BPGP07 war in Karsee trotz 4 Behandlungen weniger wirksam als BlossomProtect.

somProtect. Dies bestätigt den in unseren Labor- und Freilandversuchen gefundenen Trend. Eine Verringerung der Aufwandmenge durch die Veränderung der Pufferkomponente (POM-Puffer statt Komponente A) ist also nicht möglich.

In Kirschgartshausen und Amtzell wurden in den Versuchen IP-Präparate eingesetzt. Hier wurde in 2007 BPGP07 jeweils 2 mal eingesetzt. Der Einsatz von BlossomProtect im direkten Vergleich war aufgrund der begrenzten Versuchsvarianten nicht möglich. Mit dem Vergleichsmittel Strepto wurde in Kirschgartshausen eine Wirkung von 84%, in Amtzell von 27% erzielt. BPGP07 war in Kirschgartshausen signifikant, in Amtzell tendenziell weniger wirksam als Strepto (Tab. 17). Die Wirksamkeit von BPGP07 war in diesen Versuchen auch geringer als die von BlossomProtect in den Vorjahren. Auch diese Versuche bestätigten, dass der POM-Puffer nicht praxistauglich ist.

Fasst man alle Exaktversuche der vergangenen Jahre zusammen, zeigt sich dass mit BlossomProtect Wirkungsgrade von über 80% erreicht werden, wenn 3 bis 4 Behandlungen in der Blüte ausgebracht werden. Man benötigt also meist 1-2 Behandlungen mehr als mit Strepto. Der Versuch in Amtzell 2007 zeigt aber, dass auch 2 Behandlungen mit Strepto zu wenig sein können. Der alternierende Einsatz von Schorffungiziden (Delan oder Schwefelpräparate) ist möglich. Die Versuche 2007 bestätigten die gute Wirksamkeit von BlossomProtect, die auch schon in den Vorjahren festgestellt wurde (Kunz and Haug, 2006).

8.1.3 Praxisversuche

In 2007 wurde in Schlachters ein Versuch in einer Ökoparzelle an der Sorte Topaz durchgeführt, in dem BlossomProtect mit Mycosin verglichen wurde. In unbehandelt wurden 5,5 befallene Triebe pro Baum gezählt, Nach drei Behandlungen mit MycoSin mussten 4,9 Triebe pro Baum und nach drei Behandlungen mit BlossomProtect 4,4 Triebe pro Baum entfernt werden (siehe Pressemitteilung Renner 2007). BlossomProtect reduzierte also auch in diesem Versuch den Befall, wenn auch nicht so deutlich wie nach den Exaktversuchen erwartet. Befallstellen befanden sich vor allem an den Blüten, die sich direkt am Stamm oder in der Triebspitze befanden. Dies sind die letzten Blüten, die sich öffnen und nach Frau Renner war nicht klar, ob diese Blüten sich nicht erst nach der letzten Behandlung öffneten und somit gar nicht mehr behandelt wurden. Im Betrieb in Schlachters trat auch anderen Sorten Feuerbrandbefall auf, obwohl mit Streptomycin behandelt wurde. Da die Sorte Topaz nicht mit Streptomycin behandelt wurde,

war ein direkter Vergleich von Streptomycin und BlossomProtect nicht möglich. Bei den Streptomycin behandelten Sorten wurde der Befall nicht erfasst.

In Vorarlberg wurden in 2007 von Hr. Höfert einige Praxisversuche durchgeführt. Die Anzahl befallener Blütenbüschel wurde bonitiert. In unterschiedlichen Anlagen wurden nach vier Behandlungen Befallsgrade von 3 bis 62% festgestellt (Höfert, 2007). Es gab jedoch meist keine unbehandelten Vergleichsparzellen. Außerdem wurde in diesen Versuchen erst zur Vollblüte mit der BlossomProtect Behandlung begonnen, da die Vorarlberger auf die Zulassung von Streptomycin gehofft hatten. Bei der ersten Behandlung waren aber bereits mehrere Tage mit hohem Infektionsrisiko vergangen, an denen die Blüten dem Erreger ohne Schutz ausgeliefert waren (Stellungnahme zum Artikel von Hr. Höfert).

8.2 Versuche zur Phytotoxizität

Im Rahmen des Pilotversuchs Hefen, der von Bio-Protect in Zusammenarbeit mit BVL und den Pflanzenschutzdiensten der Länder von 2004-2006 durchgeführt wurde, wurde BlossomProtect auf ca. 50 ha Obstbaufläche eingesetzt. Die behandelten Flächen wurden im Vergleich zu unbehandelten Flächen oder mit Strepto behandelten Flächen vor oder bei der Ernte auf Berostung bonitiert. Im Pilotversuch Hefen wurden viele Versuche ohne Wiederholungen durchgeführt, so dass keine statistische Auswertung der Einzelversuche möglich war. Deshalb muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden, dass es innerhalb der Anlage natürliche Schwankungen in der Berostung geben kann. Aus randomisierten Exaktversuchen (s.u.) schließen wir, dass Veränderungen des Berostungsindex von -0,2 bis 0,2 nicht als Minder- oder Mehrberostung sondern als zufällige Schwankung eingestuft werden müssen.

Zusätzlich liegen aus 2006 und 2007 Daten aus Exaktversuchen vor, die von Bio-Protect im Rahmen von diesem Projekt oder von der Universität Konstanz in Zusammenarbeit mit der FÖKO (Kunz et al., 2008; Kunz et al., 2006) durchgeführt wurden. Einige dieser Versuche, die jeweils mit 4 Wiederholungen angelegt wurden, zeigten teilweise eine signifikante Erhöhung der Berostung durch BlossomProtect. Allerdings war meist ein Unterschied im Berostungsindex zwischen unbehandelt und behandelt von mind. 0,2 notwendig, um den Unterschied statistisch abzusichern.

Insgesamt liegen von 2004-2007 89 Einzelergebnisse (verschiedene Standorte und Sorten), bei denen BlossomProtect behandelte Parzellen mit unbehandelten Parzellen verglichen wurden. In den meisten Versuchen führte die BlossomProtect Behandlung nicht zu einer Mehrberostung.

Der Berostungsindex wurde teilweise leicht reduziert oder erhöht, wobei die durchschnittliche Mehrberostung $0,14 \pm 0,22$ betrug. Den größten Beitrag zu dieser durchschnittlichen Erhöhung hatte ein Versuch an der Birnensorte Conference und einige Ausreisser an der Apfelsorte Golden Delicious (Abb. 12).

Die Mehrberostung korrelierte in der Auswertung dieser 89 Versuche nicht mit dem Berostungsindex in unbehandelt und auch nicht mit der Anzahl der Behandlungen (1-4 Behandlungen) im Versuch.

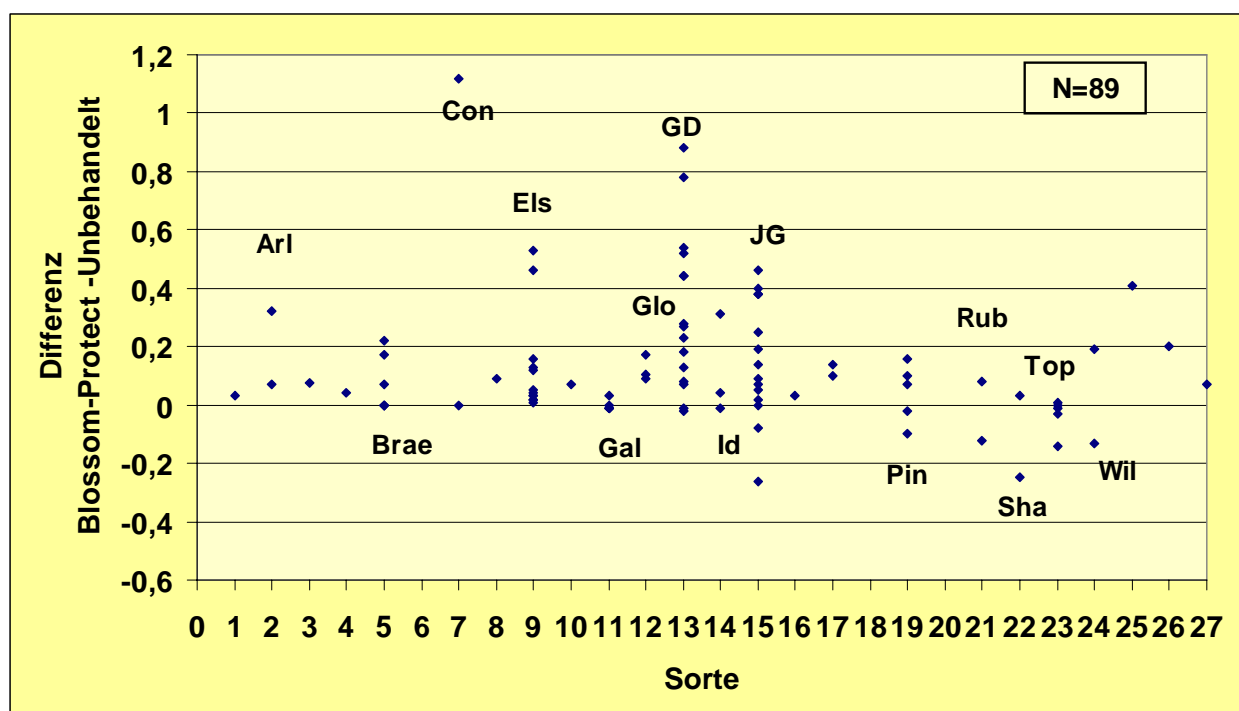


Abbildung 12: Differenz des Berostungsindex zwischen mit BlossomProtect behandelten und unbehandelten Parzellen in Abhängigkeit von der Sorte. Gezeigt sind die 89 Einzelwerte (blaue Rauten) aus Berostungsversuchen in den Jahren 2004-2007. 1=Alexander Lukas; 2=Arlet; 3=Bonza; 4=Boskoop; 5=Braeburn; 6=Cadel; 7=Conference; 8=Cox Orange; 9=Elstar; 10=Fuji; 11=Gala; 12=Gloster; 13=Golden Delicious; 14=Idared; 15=Jonagold; 16=Jonagored; 17=Jonica; 18=Mutsu; 19=Pinova; 20=roter Fallstaff; 21=Rubinette; 22=Shampion; 23=Topaz; 24=Williams; 25=Sansa; 26=Santana; 27=Goldrush.

Den deutlichsten Einfluss auf die Mehrberostung hatte die behandelte Sorte. Die stärkste Mehrberostung aller Versuche trat bei der Birnensorte Conference auf, gefolgt von der Apfelsorte Golden Delicious. Aber auch bei diesen beiden Sorten gab es Versuche ohne Mehrberostung.

Neben der BlossomProtect Behandlung sind also noch weitere Faktoren nötig, um die Mehrberostung auszulösen. Auch bei den Apfelsorten Elstar und Jonagold kam es in Einzelfällen zu einer Mehrberostung, die aber im Vergleich zu Golden Delicious geringer ausfiel und weniger häufig auftrat. An den Sorten Gala, Pinova, Gloster und Topaz konnte keine Mehrberostung festgestellt werden. Die anderen Sorten wurden bisher nicht häufig genug überprüft, um zu einer abschließenden Beurteilung zu kommen.

Neben der Sorte scheint auch der Standort einen Einfluss auf die Mehrberostung zu haben. Zum Beispiel war die Mehrberostung am Augustenberg immer am deutlichsten ausgeprägt, während sie in Bavendof oder Dresden Pillnitz moderat bis nicht vorhanden war. Aber auch der Vergleich zwischen den Standorten ist schwierig, da nicht an allen Standorten die gleichen Sorten im gleichen Jahr behandelt wurden.

Herr Holliger, Wädenswil CH, stellte beim Fünf-Länder Treffen in Einsiedeln 2007 einen weiteren Versuch zur Fruchtberostung durch BlossomProtect an Golden Delicious vor. Hier konnte gezeigt werden, dass mit einer Behandlung keine Mehrberostung ausgelöst wird, dass die Mehrberostung aber mit zwei bis vier Behandlungen entsprechend der Anzahl der Behandlungen zunimmt. Hier hatte also die Häufigkeit der Behandlungen einen Einfluss auf die Mehrberostung.

2005 bis 2007 wurde der Zusatz von Cutisan zu BlossomProtect auf dessen Auswirkung auf die Mehrberostung überprüft (Haug and Kunz, 2005; Kunz et al., 2008; Kunz et al., 2006). Derselbe Versuchsansatz wurde 2006 am KOB Bavendorf an drei Sorten getestet. In allen 8 Versuchen verringerte der Cutisanzusatz die Mehrberostung (Abb. 13). Allerdings wurde durch den Cutisanzusatz auch die Wirksamkeit leicht verringert, so dass diese Mischung nur bedingt empfehlenswert ist. Bei nicht berostungsgefährdeten Sorten (Gala, Topaz u.a.) sollte auf den Zusatz von Cutisan verzichtet werden.

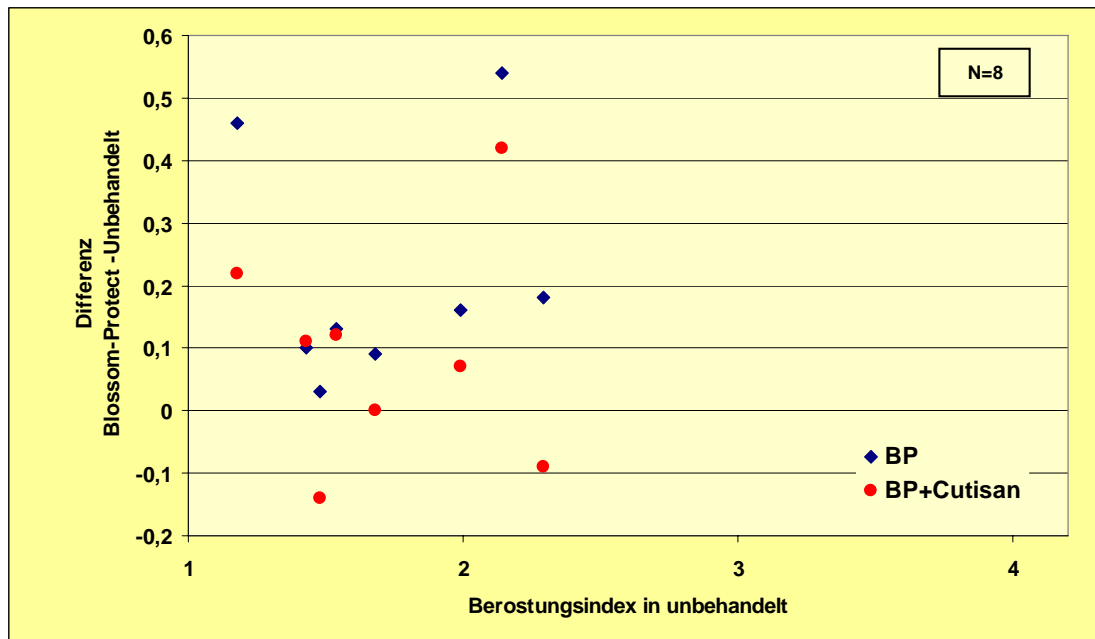


Abbildung 13: Differenz des Berostungsindex zwischen mit BlossomProtect behandelten und unbehandelten Parzellen in Abhängigkeit des Berostungsindex in unbehandelt (blaue Rauten). Am selben Standort wurde auf der gleichen Sorte BlossomProtect zusammen mit Cutisan appliziert (rote Rauten).

9. Konsequenzen für die Praxis

In diesem Forschungsprojekt sollte die Eignung des Pflanzenstärkungsmittels BlossomProtect als Alternative zu Streptomycin bei der Feuerbrandbekämpfung überprüft werden. BlossomProtect besteht aus zwei Komponenten. Die Komponente A enthält Puffersubstanzen, die den pH-Wert der Spritzbrühe auf einen für die in Komponente B enthaltenen Blastosporen von *Aureobasidium pullulans* günstigen Wert von 3,5 bis 4,0 einstellen. Die Pufferkomponente erhöht die Aufwandmenge des Präparates von 1,5 auf 12 kg/ha. Versuche, die Zusammensetzung der Pufferkomponente so zu ändern, dass die Aufwandmenge reduziert wird, waren nicht erfolgreich. Diese hohe Aufwandmenge muss von der Praxis toleriert werden.

Die Produktion der in Komponente B enthaltenen *A. pullulans* Stämme konnte im Rahmen des Projektes in Zusammenarbeit mit der Firma bio-ferm GmbH in Tulln, Österreich, standardisiert und in einen großtechnischen Maßstab überführt werden. Die Stämme werden in Form von

Reinhefegranulat produziert und können in jeder beliebigen Formulierung aufgemischt werden. Sowohl die Granulate als auch die formulierte Komponente B ist stabil lagerfähig. BlossomProtect kann wirtschaftlich produziert werden und wird zu einem Preis von unter 100 EUR je Hektarbehandlung in Deutschland angeboten.

Der Wirkmechanismus konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass eine pH-Absenkung durch das Ausscheiden von Acetat das Erregerwachstum im Nektar verhindert und damit das Eindringen des Erregers in die Blüten hemmt. Möglich ist aber auch eine Resistenzinduktion. Für eine bakterizide Wirkung wurden keine Hinweise gefunden.

Versuche an Einzelblüten zum geeigneten Applikationszeitpunkt zeigen, dass dieser parallel zu Streptomycin zu wählen ist, Leider war es nicht möglich, einen bestimmten CDH18 Wert im Maryblyt zu benennen, an dem spätestens appliziert werden muss, da der geeignete Applikationszeitpunkt zwar von der Temperatur, nicht aber vom CDH18 abhängig ist. Dies galt in diesen Versuchen allerdings auch für Streptomycin. Die Behandlung sollte spätestens 22h nach der Inokulation der Blüten erfolgen. Dies entspricht im Freiland 22h nach dem öffnen der Einzelblüte.

In Freilandversuchen zeigte sich, dass bei parallel zum Streptomycin gewählten Einsatzzeitpunkten am Tag der Infektion die Wirkung von BlossomProtect geringer war als die von Streptomycin. Sehr gute Ergebnisse wurden in Freilandversuchen erzielt, wenn BlossomProtect nach Phänologie 3-4 mal eingesetzt wurde. In einem vom BÖL geförderten Forschungsprojekt der Universität Konstanz, in dem nach einer Feuerbrandbekämpfungsstrategie für den ökologischen Anbau gesucht wird, wurde mit BlossomProtect in 6 Freilandversuchen eine durchschnittliche Befallsreduktion von 82% erreicht (Kunz et al., 2008). In diesen Versuchen konnte auch gezeigt werden, dass eine Integration der BlossomProtect Behandlungen in die Schorfbekämpfung möglich ist (Kunz et al., 2008). Allerdings zeigten auch die in diesem Projekt gemachten Versuche zur Fruchtberostung, dass in Abhängigkeit von der Sorte eine Mehrberostung der Früchte durch BlossomProtect möglich ist. Deshalb werden in 2008 auch Strategien zu einer verringertem Aufwand von BlossomProtect im Wechsel mit dem Gesteinsmehlpräparat MycoSin untersucht.

Im ökologischen Anbau werden viele Betriebe in 2008 BlossomProtect einsetzen, da in 2007 starke Schäden durch Feuerbrand verursacht wurden. Die stark berostungsgefährdete Sorte Golden Delicious hat im ökologischen Anbau sowieso nur eine geringe Bedeutung. Bei Sorten

wie Topaz und Gala besteht keine Berostungsgefahr, so dass diese Sorten bevorzugt mit BlossomProtect behandelt werden.

Im Integrierten Anbau wird BlossomProtect trotz der positiven Versuchsergebnisse nicht als Alternative zu Streptomycin angesehen. Frau Dr. Moltmann von LTZ Augustenberg definierte eine praxistaugliche Alternative zum Streptomycin beim „Fachgespräch zur Feuerbrandbekämpfung am 11. 12. Dezember 2007“ wie folgt:

- Die Alternative muss eine Befallsreduktion von 70-90% erreichen.
- Die Alternative muss nach Prognose, am Tag der errechneten Infektion eingesetzt werden können
- Die Alternative muss mit Schorffungiziden mischbar sein
- Die Alternative muss pflanzenverträglich sein und darf nicht zur Mehrberostung führen

Mit BlossomProtect kann bei entsprechendem Einsatz das erste Kriterium erfüllt werden, nicht jedoch die anderen drei Bedingungen. Mit dieser Definition einer Alternative hat man den Obstbauern und der Politik alle nötigen Argumente zur weiteren Verwendung von Streptomycin in die Hand gegeben. Dies manifestiert sich auch in der Verlängerung des Feuerbrandstrategiepapiers um weitere fünf Jahre (BMELV, 2008). Solange Streptomycin für den Integrierten Anbau zur Verfügung steht, wird sich BlossomProtect nicht durchsetzen. Für eine vergleichbare Wirkung sind mehr Applikationen nötig. Die Schorffungizide müssen separat ausgebracht werden, was zu mehr Überfahrten und mehr Arbeitszeit führt und es besteht bei einigen Sorten ein erhöhtes Berostungsrisiko. Diese Nachteile führen zu wirtschaftlichen Nachteilen für den Betrieb, der sich somit immer für Streptomycin entscheiden wird. Vor allem solange die finanziellen Risiken des Streptomycineinsatzes durch die öffentliche Hand getragen wird (z.B. Untersuchung von Honig und Aufkauf von belastetem Honig).

In den Fällen, in denen kein Streptomycin zur Verfügung steht, muss der Obstbauer zwischen dem Risiko des Feuerbrandbefalls und den Kosten der Behandlungen abwägen (z.B. Ökoanbau). In diesen Fällen wird die Entscheidung bei entsprechender Feuerbrandvorgeschichte für BlossomProtect fallen.

Die Integrierte Produktion und deren Beratung sollten auch nicht aus den Augen verlieren, dass mit Streptomycin ein enorm resistenzgefährdeter Wirkstoff eingesetzt wird. Bei Fungiziden wird schon lange Wirkstoffmischungen und Wirkstoffwechsel empfohlen. Man sollte über diese Antiresistenzstrategien auch bei Streptomycin nachdenken, bevor sich die streptomycinresis-

tenten Feuerbranderreger im Gebiet etabliert haben. BlossomProtect ist z.B. problemlos mit Streptomycin mischbar. Auch alternierender Einsatz und dadurch eine Reduktion der Streptomycinbehandlungen wäre denkbar.

Die Bio-Protect GmbH hat mit Unterstützung des Landes Baden-Württemberg das Pflanzenstärkungsmittel BlossomProtect entwickelt und Anwendungsstrategien entwickelt, die eine deutliche Reduktion des Feuerbrandbefalls bewirken. Damit wurde eine Alternative zu Streptomycin geschaffen, die allerdings im Vergleich zu Streptomycin einen Mehraufwand für die Obstbaubetriebe bedeutet und deshalb hinter Streptomycin wirtschaftlich immer die zweite Wahl bleiben wird. Zulassungen in Österreich, Schweiz, Tschechien, der Slowakei und anderen Ländern zeigen aber das große Interesse an BlossomProtect und an der hier geleisteten Entwicklungsarbeit.

10. Literatur

- Baumgart, J. (Ed.), 1999. Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. B. Behr's Verlag, Hamburg.
- BMELV, 2008. Strategie zur Bekämpfung des Feuerbranderreger im Obstbau ohne Antibiotika 2008-2012. http://www.bmelv.de/cln_044/nn_751176/SharedDocs/downloads/04-Landwirtschaft/Pflanzenschutz/Feuerbrand-Strategiepapier,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Feuerbrand-Strategiepapier.pdf, Februar 2008.
- BMVEL, 2003. Strategie zur Bekämpfung des Feuerbranderreger im Obstbau ohne Antibiotika. www.verbraucherministerium.de/landwirtschaft/feuerbrand-strategiepapier.pdf, 25.03.2003.
- Duffy, B., Vogelsanger, J., Schoch, B., Holliger, E., 2006. Biocontrol of *Erwinia amylovora* using a commercial Yeast strain mixture. Acta Hort. 704, 363-366.
- Fried, A., 1999. Feuerbrand - Bekämpfungsversuche 1998 - Fortsetzung der Prüfung alternativer Mittel zu Plantomycin. Obstbau 24, 71-74.
- Fried, A., Lange, E., Jelkmann, W., Moltmann, E., Seibold, A., 2004. Ist eine Alternative zu Plantomycin in Sicht? Obstbau 29, 161-164.
- Haug, P., Kunz, S., 2005. Erfahrungen aus zwei Jahren Feuerbrandbekämpfung mit dem Hefepreparat Blossom-Protect. Ökoobstbau, (3) 13-16.
- Höfert, U., 2007. Feuerbrand: Vorarlberger Apfelanbau erfährt herben Rückschlag. Besseres Obst, (6) 4-7.

- Kunz, S., 2006. Fire blight control in organic fruit growing - systematic investigation of the mode of action of potential control agents. In: Zeller, W., Ullrich, C. (Eds.), Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Bacterial Plant Diseases, vol. 408. Arno Brynda, Berlin, pp. 249-253.
- Kunz, S., Haug, P., 2006. Development of a strategy for fire blight control in organic fruit growing. In: FÖKO e.V. (Ed.), 12th International Conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing. FÖKO e.V., Weinsberg, pp. 145-150.
- Kunz, S., Schmitt, A., Haug, P., 2008. Field testing of strategies for fire blight control in organic fruit growing. In: FÖKO e.V. (Ed.), 13th International Conference on cultivation technique and phytopathological problems in organic fruit-growing. FÖKOe.V., Weinsberg, pp. 299-305.
- Kunz, S., von Eitzen-Ritter, M., Schmitt, A., Haug, P., 2004. Feuerbrandbekämpfung im ökologischen Obstbau. Ökoobstbau, (4) 2-7.
- Kunz, S., von Eitzen-Ritter, M., Schmitt, A., Haug, P., 2006. Feuerbrandbekämpfung im ökologischen Obstbau - Ergebnisse der Bekämpfungsversuche 2006. Ökoobstbau, (4) 3-7.
- McCormack, P. J., Wildman, H. G., Jeffries, P., 1994. Production of antibacterial compounds by phylloplane-inhabiting yeasts and yeastlike fungi. Appl Environ Microbiol 60, 927-931.
- Pusey, P. L., 1997. Crab apple blossoms as a model for research on biological control of fire blight. Phytopathology 87, 1096-1102.
- Pusey, P. L., 1999. Effect of nectar on microbial antagonists evaluated for use in control of fire blight of pome fruits. Phytopathology 89, 39-46.
- Pusey, P. L., 2000. The role of water in epiphytic colonization and infection of pomaceous flowers by *Erwinia amylovora*. Phytopathology 90, 1352-1357.
- Salm, H., Geider, K., 2004. Real-time PCR for detection and quantification of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight. Pl. Pathol. 53, 602-610.
- Takesako, K., Ikai, K., Haruna, F., Endo, M., Shimanaka, K., Sono, E., Nakamura, T., Kato, I., Yamaguchi, H., 1991. Aureobasidins, new antifungal antibiotics. Taxonomy, fermentation, isolation, and properties. J Antibiot (Tokyo) 44, 919-924.