



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Neue, umweltfreundliche Wirkstoffe gegen den
Feuerbranderreger *Erwinia amylovora*

Verfasser

Markus Gselmann

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, im April 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 441

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Genetik/Mikrobiologie

Betreuer:

Univ.-Doz. Dr.rer.nat. Hans-Jürgen Busse

Danksagung

Besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Herrn A.o.Univ.Prof. Dr. Karl Stich vom Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften der Technischen Universität Wien für die Überlassung des Themas und seine wertvollen Anregungen und Hilfestellungen, sowie auch meinem Betreuer an der Universität Wien, Herrn Univ.-Doz. Dr.rer.nat. Hans-Jürgen Busse für zahlreiche Anregungen und Vorschläge.

In weiterer Folge möchte ich allen Kollegen und Mitarbeitern am Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften für die hervorragende Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft meinen tiefsten Dank aussprechen, namentlich Herrn DI Dr. Christian Gosch, Frau PD DI Dr. Heidi Halbwirth, Herrn Jürgen Greiner, Frau Ing. Renate Paltram, Frau DI Sylvija Miosic und Frau Dr. Jana Thill.

Dem Austria Wirtschaftsservice (aws, PRIZE 2010) sowie dem Verein zur Förderung der Pflanzenwissenschaften sei an dieser Stelle für die finanzielle Unterstützung gedankt, sowie der Firma pro aqua Diamantelektroden Produktion GmbH für die Kooperation zur Testung von Elektrolysewässern.

Zuletzt danke ich meiner Familie und allen Freunden und Bekannten, die mir den nötigen Rückhalt gegeben haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	
Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Feuerbrand	1
1.1.1 Der Erreger	1
1.1.2 Symptome, Nachweis.....	2
1.1.3 Herkunft.....	5
1.1.4 Entwicklungszyklus	5
1.1.5 Verbreitung.....	7
1.1.6 Feuerbrand in Österreich	8
1.1.7 Bekämpfungsstrategien.....	8
1.2 Neue Wirkstoffe gegen Feuerbrand.....	10
2 Problemstellung.....	15
3 Material und Methoden.....	16
3.1 Material.....	16
3.1.1 Mikroorganismen.....	16
3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	17
3.1.3 Medien und Puffer	18
3.1.3.1 King´s B-Medium	18
3.1.3.2 Mc Ilvaine-Puffer.....	19
3.1.3.3 KPi-Puffer	19
3.1.4 Enzyme	19
3.1.5 Geräte und Einrichtungen	20
3.2 Methoden.....	21
3.2.1 Wirkstoffbereitstellung.....	21
3.2.1.1 Herstellung von 3-Deoxyflavonoid-Derivaten.....	21

3.2.1.2	Herstellung von Juglon-Lösungen und –Formulierungen für die Küvettentests	25
3.2.1.3	Herstellung von Juglon-Lösungen und –Formulierungen für den Phytotoxizitätstest	27
3.2.1.4	Bereitstellung der Elektrolysewässer	28
3.2.2	Küvettentests	31
3.2.2.1	Standardtest I	32
3.2.2.2	Standardtest II	32
3.2.2.3	Standardtest III	32
3.2.3	Plattiertests	33
3.2.4	Einzelblüten-Inokulationstests	34
3.2.4.1	Elektrolysewässer	37
3.2.5	Phyto- und Ökotoxizität von Juglon	37
3.2.5.1	Phytotoxizität von Juglon	37
3.2.5.2	Persistenz im Boden von Juglon	37
3.2.5.3	Rückstandsanalytik von Juglon	38
4	Ergebnisse und Diskussion	39
4.1	Wirkstoffbereitstellung	39
4.1.1	3-Deoxyflavonoide	39
4.1.2	Juglon	46
4.1.3	Elektrolysewässer	46
4.2	Küvettentests	48
4.2.1	Juglon	48
4.2.2	Elektrolysewässer	62
4.3	Plattiertests	73
4.3.1	Elektrolysewässer	73
4.4	Einzelblüten-Inokulationstests	77
4.4.1	Elektrolysewässer im Einzelblüten-Inokulationstest	77
4.4.1.1	Elektrolysewasser NaCl 1 (0,3 Ah/l), Dosis-effekt	77
4.4.1.2	Elektrolysewasser NaCl 1 (0,3 Ah/l), pH-Effekt	78
4.4.1.3	Elektrolysewasser NaCl 1 (0,6 Ah/l), 10 Hübe + Dosis-effekt ..	78
4.4.1.4	Elektrolysewasser NaCl 1 (0,3 Ah/l), 10 Hübe + Dosis-effekt ..	79

4.4.1.5	Elektrolysewasser NaCl 1 (0,3 Ah/l), 10 Hübe + pH-Effekt.....	79
4.4.1.6	Elektrolysewasser NaCl 1 (0,6 Ah/l), versch. Hubzahl.....	79
4.4.1.7	Elektrolysewasser KCl 1 (0,6 Ah/l), 10 Hübe + Dosiseffekt	80
4.4.1.8	Elektrolysewasser NaCl 1 (0,6 Ah/l), 10 Hübe + Netzmittel	80
4.4.1.9	Elektrolysewasser NaCl 1 (0,9 Ah/l), 10 Hübe + Dosiseffekt ..	81
4.4.1.10	Elektrolysewasser Borax 1 (0,6 Ah/l), 10 Hübe + Dosiseffekt.	82
4.5	Phyto- und Ökotoxizität von Juglon	83
4.5.1	Phytotoxizität von Juglon.....	84
4.5.2	Rückstandsanalytik von Juglon	84
4.5.3	Persistenz von Juglon im Boden	85
5	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	87
5.1	3-Deoxyflavonoide	87
5.2	Juglon	88
5.3	Elektrolysewässer	89
5.4	Ausblick	91
6	Anhang	92
6.1	Abbildungsverzeichnis	92
6.2	Tabellenverzeichnis	96
7	Literaturverzeichnis	97
8	Publikationsliste.....	100
9	Eidesstattliche Erklärung	101
10	Lebenslauf.....	102

Zusammenfassung

Die Feuerbrandkrankheit, hervorgerufen durch das Bakterium *Erwinia amylovora*, ist ein internationales Problem an Kernobst und weiteren Rosengewächsen und führt jährlich zu erheblichen finanziellen Schäden. Der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln, der Rückschnitt befallener Triebe bis tief ins gesunde Holz oder die Sanierung von Obstanlagen durch Rodung sind weltweit nach wie vor die gängigsten Bekämpfungsmaßnahmen. Im Ernstfall erlauben derzeit noch viele Länder streptomycinhaltige Pflanzenschutzmittel als letzte Möglichkeit um größere Schäden für die Obstwirtschaft zu vermeiden. Dass dieses Antibiotikum allerdings langfristig keine Lösung ist, zeigen unter anderem die USA, wo bereits resistente Feuerbrand-Bakterien auftreten, die immer schwerer in Griff zu bekommen sind. Zudem sind Rückstände im Honig und in Äpfeln, die Angst vor resistenten humanpathogenen Bakterien, sowie der Aufwärtstrend im Bioanbau Argumente, umweltfreundliche alternative Lösungen zu finden. Genau bei dieser Thematik setzt diese Arbeit an.

Getestet wurden drei unterschiedliche Wirkstoffe auf deren inhibitorische Wirkung auf das Wachstum von *E. amylovora*. Bei den Arbeiten zum 3-Deoxyflavonoid Apiforol lag aber das Hauptaugenmerk auf der Wirkstoffsynthese. Mit dem Naturstoff Juglon konnten im Zuge dieser Arbeit etliche weitere *Erwinia*-Arten, welche bei uns nicht heimisch sind, jedoch international erheblichen Schaden anrichten können, wie auch nicht schädliche antagonistische Bakterien, auf deren Empfindlichkeit gegenüber Juglon getestet werden. Dabei konnten bis zu 100-fach unterschiedliche minimale inhibitorische Konzentrationen festgestellt werden, wobei die Wirkung gegenüber dem Feuerbranderreger *E. amylovora* besonders gut war. Die unterschiedliche Wirkung zeigte damit, dass der Wirkmechanismus von Juglon – wider erwarten – spezifisch ist und der mögliche Einsatz als Pflanzenschutzmittel von Pathogen zu Pathogen separat getestet werden muss.

Betreffend Juglon konnten mit den verwendeten Methoden keinerlei Rückstände im Boden oder den Früchten nach einer Spritzung mit Juglon festgestellt werden. Auf Grund des weiten Fortschrittes der Forschung und der

vielversprechenden Wirksamkeit dieses Naturstoffes sind bereits Firmen interessiert, diesen Wirkstoff als Alternative zu streptomycinhaltigen Präparaten zu etablieren. Als durchwegs positiv können auch die Ergebnisse mit den verschiedenen getesteten Elektrolysewässern bezeichnet werden. Hier konnte sowohl eine bakterizide Wirkung in Suspensionskultur, als auch ein inhibitorischer Effekt auf die Feuerbrandinfektion im Einzelblüten-Inokulationstest nachgewiesen werden. Eine Anhebung des Ladungseintrages und eine Veränderung des Mischverhältnisses mit destilliertem Wasser führten hierbei zu einer Verbesserung der Wirkung, wobei der Einsatz von Netzmitteln nicht den gewünschten Erfolg brachte. Diese so erhaltenen Ergebnisse stellen die Grundlage für weiterführende Versuche mit den Elektrolysewässern dar.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
dest.	destilliert
div.	diverse
etc.	et cetera (lat.)
Fa.	Firma
ha	Hektar
HPLC	Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
mündl.	mündlich
lat.	lateinisch
lt.	laut
Pkt.	Punkt
Stk.	Stück
u.	und
versch.	verschiedene
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Feuerbrand

Feuerbrand ist eine hochinfektiöse, bakterielle Quarantänekrankheit. Durch die hohe Pathogenität und die schwere Bekämpfbarkeit der Krankheit kann sie großen wirtschaftlichen Schaden im Bereich des erwerbsmäßigen Obstbaues, in Baumschulen, sowie in Grünanlagen, privaten Gärten und bei sonstigen Wildpflanzen verursachen (AGES, 2009). Feuerbrand tritt zumeist bei Kernobstgewächsen (Pyrinae; Unterfamilie der Rosaceen) sowie bei Ziergehölzen selbiger Familie auf.

1.1.1 Der Erreger

Hervorgerufen wird Feuerbrand durch *Erwinia amylovora* (VANNESTE, 2000). Das Gram-negative, ausschließlich pflanzenpathogene Stäbchenbakterium aus der Familie der Enterobacteriaceae ist peritrich begeißelt und somit zur eigenständigen Fortbewegung mächtig (Abbildung 1). Bemerkenswert erscheint auch die Fähigkeit des bedingten Wachstums unter anaeroben Bedingungen. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 18°C und 28°C, bei einer temperaturabhängigen Verdoppelungszeit von 78 bis 126 Minuten (BILLING, 1974). Als Grund für die Pathogenität von *Erwinia amylovora* konnten durch molekular-biologische Untersuchungen drei Gruppen von Genen identifiziert werden. Die *ams*-Gene, verantwortlich für die Biosynthese des Exopolysaccharids an der äußeren Zellmembran, sowie die *hrp*-Gene, mitverantwortlich für die Pathogenität und die Induktion von hypersensitiven Reaktionen in Nicht-Wirtspflanzen, als auch die *dsp*-Gene, verantwortlich für die Krankheitsentwicklung. Ein weiteres Virulenz-Protein das von *Erwinia amylovora* an die Umgebung abgegeben wird, ist das Siderophor Desferrioxamin E, welches spezifisch Eisen-Ionen bindet und nach der Komplexbildung wieder von der Wirtszelle aufgenommen wird (VANNESTE, 2000).



Abbildung 1: *E. amylovora* ist ein peritrich begeißeltes, gram-negatives Bakterium
(Quelle:

<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/FireBlight.aspx>)

1.1.2 Symptome, Nachweis

Der Name Feuerbrand ist auf dessen hervorgerufene Symptome zurückzuführen. Blätter und Blütenbüschel welken auf Grund des gestörten Wassertransports durch die Bakterien und verfärben sich nach einer Infektion mit *Erwinia amylovora* dunkelbraun bis schwarz. Triebe knicken mit der Spitze nach unten, was den Anschein macht, als wäre die Pflanze verbrannt worden (Abbildung 2). Zurückzuführen ist dies auf das Auflösen von Zellwänden der Wirtspflanze durch Absonderung von bestimmten Enzymen des Krankheitserregers. Das austretende Zytosol dient den Bakterien als Nahrung. An den Infektionsstellen wird Bakterien Schleim abgesondert (Abbildung 3). Unter der Rinde von frisch infizierten Wirtspflanzen verfärbt sich das Holz rotbraun und ein Bakterienfilm wird ausgebildet. Durch das spätere Einsinken der Rinde ist gesundes von erkranktem Gewebe deutlich zu unterscheiden (sogenannte Canker). Für den Nachweis von *E. amylovora* stehen im Labor zahlreiche DNA-Nachweisverfahren wie PCR oder qPCR (GOTTSBERGER,

2010) (PIRC *et al.*, 2009) zur Verfügung. Als Schnelltest, ob eine Infektion mit *E. amylovora* vorliegt oder nicht, haben sich verschiedene Methoden etabliert, welche teilweise direkt im Feld in kurzer Zeit Ergebnisse liefern. Häufig kommt ein von der Schweizer Firma BIOREBA AG entwickelter und von der ACW (Agroscope Changins-Wädenswil) getesteter Immunoassay zur Anwendung, der allerdings nicht sehr sensitiv bzw. selektiv ist, aber innerhalb von wenigen Minuten über einen etwaigen Befall Auskunft gibt. Als äußerst positiv sei bei diesem Immunstreifentest die kurze Zeit und die leichte Handhabung der Teststreifen anzumerken (ACW, 2010). Eine neue und innovative Methode zum Nachweis von *E. amylovora* stellt die LAMP (loop-mediated isothermal amplification of DNA) dar (NOTOMI *et al.*, 2000), welche innerhalb von zwei bis vier Stunden ohne aufwändige Laboreinrichtung durchgeführt werden kann und sich durch eine hohe Sensitivität und Selektivität auszeichnet. Für den Feuerbranderreger sind derzeit drei LAMP-Protokolle verfügbar (GOSCH *et al.*, 2012a) (MORADI *et al.*, 2012) (TEMPLE *et al.*, 2011). Eine kombinierte Methode zum Nachweis eines Befalles von Obstblüten wird derzeit an der TU Wien entwickelt. Hierbei sollen Arbeiterbienen auf ihnen haftende Bakterien auf einem Trägermaterial (Teststreifen) beim Flugloch abstreifen. Dieser Teststreifen kann anschließend mit der innovativen LAMP-Methode analysiert werden (GOSCH *et al.*, 2009).



Abbildung 2: Dunkelbraun verfärbte Blätter nach einer Infektion mit *E. amylovora* (Quelle: <http://www.wirtschaft.ch/Zwangsrodung+von+Birnenbaeumen+wegen+Feuerbrand/492403/detail.htm>)



Abbildung 3: Abgesonderter Bakterien Schleim an einem mit *E. amylovora* infizierten Apfel (Quelle: http://www.ftimes.com/news/local/collection_8cb5f7fa-42af-11e1-aca7-001871e3ce6c.html)

1.1.3 Herkunft

Es wird angenommen, dass der Feuerbranderreger ursprünglich aus den östlichen USA stammt, genauer um die Gegend von New York. Erste Beschreibungen datieren schon über 200 Jahre zurück (DENNING, 1794). Vor der Einfuhr von edlen Obstsorten nach Europa kam der Erreger auf wilden Rosaceen vor. 1975 trat Feuerbrand erstmalig in Europa auf, nämlich in Südengland, von wo er sich rasch über den gesamten Kontinent ausbreitete. Im Jahre 1993 erreichte er auch Österreich, wo er sich von der Bodenseeregion im äußersten Westen nach Osten hin ausbreitete.

1.1.4 Entwicklungszyklus

Zumeist überwintern die Bakterien in sogenannten Cankern des Rindengewebes, von wo aus sie sich im Frühjahr bei geeigneten Wachstumsbedingungen wieder ausbreiten. Die Krankheitserreger sondern Bakterien Schleim ab, welcher von Insekten, Vögeln, Säugetieren, Menschen, aber auch von Wind und Regen übertragen wird und durch welchen sie auf Blüten (Hauptinfektion im Frühjahr), Knospen, Blätter, Wunden (z.B. durch Hagel) und unverholzte Triebe gelangen. Dort angekommen bahnen sie sich ihren Weg ins Pflanzengewebe über natürliche Eintrittsöffnungen wie Stomata, Lentizellen, Nektarien oder Wunden im Rindengewebe (Primärinfektion). Ein Eindringen durch Kutikula oder Zellwände ist nicht möglich. Von hier aus vermehren sich die Erreger und können in kürzester Zeit in alle Teile der befallenen Wirtspflanze wandern, wobei einer zusätzlichen weiteren Verbreitung im Sommer durch Schleimabsonderung nichts im Wege steht (Sekundärinfektion) (Abbildung 4). Ab Herbst beginnt dann die Canker-Bildung an der Pflanze um in weiterer Folge das sichere Überwintern für das Pathogen sicher zu stellen (VANNESTE, 2000) (Abbildung 5).

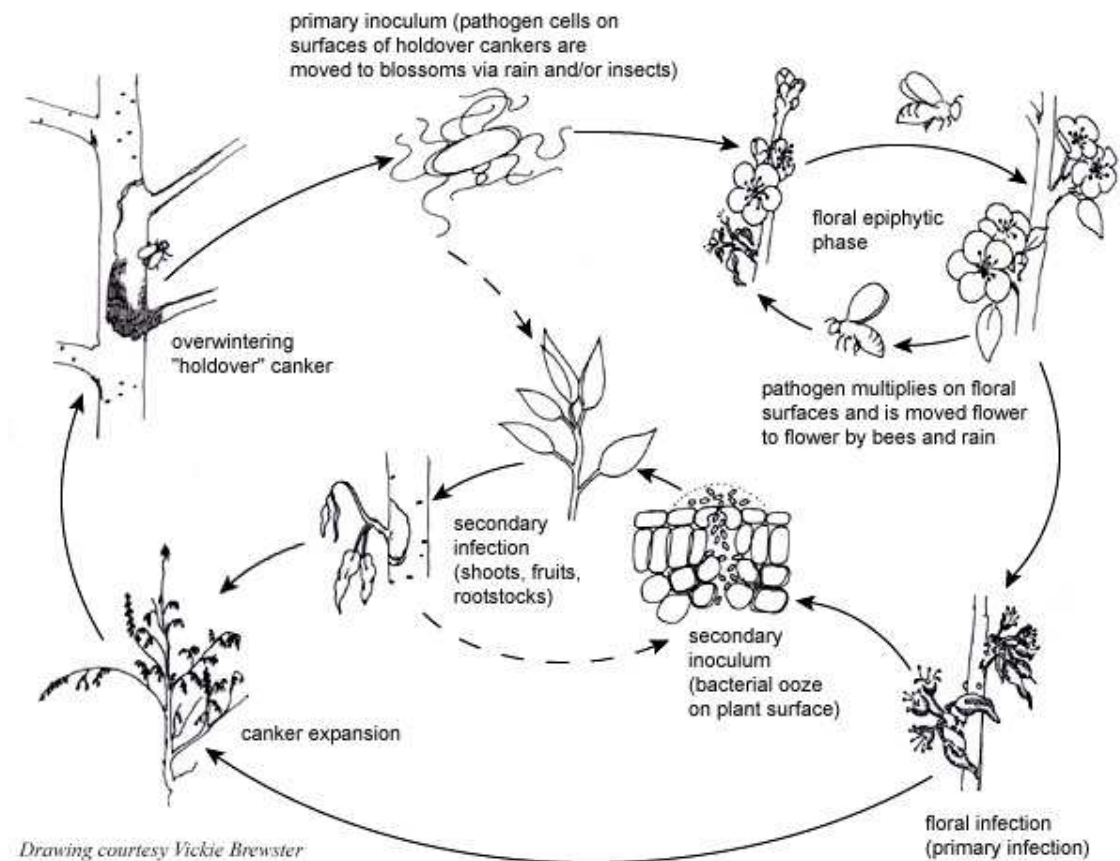


Abbildung 4: Entwicklungszyklus von *E. amylovora* (Quelle: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/FireBlight.aspx>)



Abbildung 5: Canker an einem verholztem Trieb (Quelle: http://www.landwirtschaft.sg.ch/home/landwirtschaftliches/Beratung/Pflanzenbau/Pflanzenchutz/Feuerbrand_/Allgemeine_Informationen.html)

Weiters wird Feuerbrand auch durch unsachgemäße Handhabung von Schneidwerkzeugen nach Schnittmaßnahmen an befallenen Pflanzen (müssen abgeflammt werden) und unterlassener Hygiene der Arbeiter, als auch durch nicht sachgemäßen Umgang mit kontaminiertem Pflanzenmaterial (muss verbrannt werden) weiterverbreitet (AGES, 2009).

1.1.5 Verbreitung

Feuerbrand ist mittlerweile eine in ganz Europa auftretende und gefürchtete Pflanzenkrankheit. Auch richtet der Erreger *E. amylovora* große Schäden in Nordamerika bis nach Mexiko, in Neuseeland, Vorderasien und auch in Ägypten an (Abbildung 6).

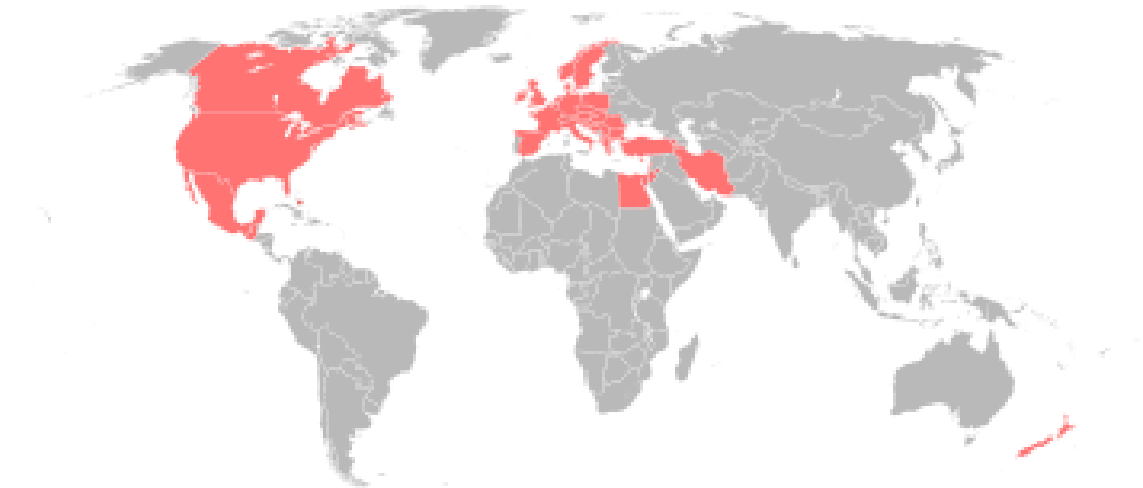


Abbildung 6: Verbreitungsgebiete weltweit von *E. amylovora* (Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Feuerbrand>)

Speziell für den Intensivobstbau von Hochleistungsäpfel- und Birnensorten als Erwerbsgrundlage, wo in Plantagen bis zu 3000 Bäume auf einem ha stehen und somit die Ausbreitung der Infektion ein Leichtes ist, kommt der Prävention und Bekämpfung dieser Krankheit eine enorme Bedeutung zu. Greift die Krankheit in solch einer Monokultur um sich, ist ein enormer finanzieller Schaden für den Besitzer auf Grund der meist notwendigen Rodung der Plantage zu erwarten. Den Streuobstbau mit seiner vielfältigen ökologischen Funktion und dem landschaftsprägenden Bild, mit großer Bedeutung für Naherholung und Tourismus, als auch für Eigenversorgung und Nebenerwerbstätigkeit in Bezug auf Eigenvermarktung, trifft es diesbezüglich nicht ganz so hart. Durch die positiven Effekte der in Österreich noch häufig vorkommenden Streuobstwiesen sind diese nicht weniger schützenswert als die Plantagen des erwerbsmäßigen Intensivobstbaues (ARGE, 2007). Bei Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass Apfelbäume weit weniger

anfällig sind als Birnbäume und es auch zwischen den einzelnen Sorten große Unterschiede gibt (BBA, 2003), wobei manche Apfelsorten je nach Widerstandskraft sogar in der Lage sind, eigene Trenngewebe auszubilden und somit eine Weiterausbreitung des Erregers in der Pflanze zu verhindern und möglicherweise sogar eine langsame Gesundung des Baumes zu Folge hat (ARGE, 2007). Allerdings können solche latent infizierte Pflanzen bei geeigneten Umweltbedingungen eine neue Infektionsquelle darstellen.

1.1.6 Feuerbrand in Österreich

Durch das Greifen der von der AGES und anderen Organisationen entwickelten „Gesamtheitlichen Strategie zur Bekämpfung des Feuerbrandes in Österreich 2009-2013“ (AGES, 2009), ist das Auftreten von Feuerbrand in allen Bundesländern rückgängig, wobei der durchwegs niedrige Befall seit 2008 auch auf nicht optimale Infektionsbedingungen zurückzuführen sein könnte. Schon vor dem EU-Beitritt Österreichs bestanden sowohl ein Einfuhrverbot für alle Feuerbrandwirtspflanzen, als auch eine regelmäßige, zielgerichtete Untersuchungstätigkeit. Nach dem Beitritt wurde Österreich das Gesuch um die Anerkennung des gesamten österreichischen Staatsgebietes als Schutzgebiet vor *E. amylovora* bewilligt. Trotz aller Bemühungen verloren diesen Status im Jahre 2001 die Bundesländer Vorarlberg, Tirol, Salzburg und Oberösterreich. Die restlichen Bundesländer behielten diesen bis 2009, wonach kein weiteres Gesuch mehr eingereicht wurde und die „Gesamtheitliche Strategie zur Bekämpfung des Feuerbrandes in Österreich 2009-2013“ entwickelt wurde.

1.1.7 Bekämpfungsstrategien

Als Bekämpfungsstrategie gegen den Feuerbrand mögen Präventivmaßnahmen an vorderster Stelle stehen, um einen Krankheitsausbruch im Vornherein zu unterbinden. Zu den allgemeinen Standardmaßnahmen wird schon der Verzicht der Neuauspflanzung von potentiellen Wirtspflanzen, speziell bei Ziergehölzen, gezählt, um damit sogleich das Habitat von *E. amylovora* einzuschränken. Auch sollten, vor allem im

extensiven Obstbau und im eigenen Garten, nur schwach anfällige Kernobstsorten gepflanzt werden, um das Infektionsrisiko so klein wie möglich zu halten. Eventuell vorhandene Canker oder mechanische Verletzungen des Rindengewebes sollten noch vor der Blüte entfernt werden, um eine Ausbreitung bzw. Inokulation zu unterbinden. Bereits befallene Pflanzen sollten unter Berücksichtigung strenger Hygienemaßnahmen (bzw. desinfizieren der Werkzeuge) großzügig zurück geschnitten oder bei schwerem Befall sofort gerodet und das anfallende Schnittgut am besten gleich verbrannt werden. Ständige Kontrollen bei der Feuerbrandprävention sind unabdingbar. Auch können Kupferpräparate und die Ausbringung von Antagonisten des Feuerbranderregers *E. amylovora* als vorbeugende Strategien gegen eine Infektion verwendet werden. Als spezielle Maßnahmen in der Bekämpfung des Feuerbranderregers gelten sowohl Pflanzenhilfsmittel, als auch Pflanzenschutzmittel. Unter Pflanzenhilfsmittel (Pflanzenstärkungsmittel) versteht man in Österreich unter dem Düngemittelgesetz geregelte „...Stoffe ohne wesentlichen Nährstoffgehalt, die dazu bestimmt sind, auf Pflanzen einzuwirken, die Widerstandsfähigkeit von zu Pflanzen erhöhen oder die Aufbereitung organischer Stoffe zu beeinflussen.“ (§ 2 Abs. 3 DMG). Diese Mittel sind aber oft nur bedingt pflanzenverträglich bzw. praxisgerecht. Pflanzenschutzmittel sind in Österreich strikt durch das Pflanzenschutzmittelgesetz 1997 (PMG 97) geregelt. Neben den hochwirksamen streptomycinhaltigen Mitteln stellen antagonistische Organismen eine gewisse Möglichkeit zur Befallsminderung dar. Auf Grund der möglichen Gefahr für Menschen, Tiere, Natur und Umwelt ist der Einsatz von streptomycinhaltigen Präparaten in Österreich, bis auf wenige, stark reglementierte Ausnahmen (z.B.: Gefahr-im-Verzug-Zulassungen) untersagt. Der Fokus liegt hierbei eindeutig auf dem hohen Risiko der Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika. Nach einem behördlich genehmigten Feldeinsatz solcher Pflanzenschutzmittel ist durch Honigmonitoring eine mögliche Verunreinigung des Naturproduktes Honig zu untersuchen.

1.2 Neue Wirkstoffe gegen Feuerbrand

Wie schon im Kapitel 1.1.6 kurz erwähnt, kann der Einsatz von Antibiotika gegen Feuerbrand, hier im Speziellen Streptomycin, eine potentielle Gefahr für Lebewesen und Pflanzen darstellen. Da sich nämlich durch den häufigen Einsatz solcher Präparate Resistenzen in den diversen Bakterienstämmen ausbilden können, müssen diese ständig weiterentwickelt werden um auch in Zukunft noch aktiv gegen solche Bakterien zu wirken. Streptomycin findet heutzutage nur mehr in wenigen Einzelfällen Verwendung in der Humanmedizin, wie z.B. bei Tuberkulose (<http://de.wikipedia.org/wiki/Streptomycin>, Juni 2012), jedoch birgt die groß angesetzte Anwendung die Gefahr der raschen Resistenzentwicklung in Humanpathogenen als auch in *E. amylovora*, was am Beispiel der USA gut ersichtlich ist, wo schon streptomycinresistente *Erwinia*-Stämme in Plantagen auftreten und auf andere Antibiotika in der Bekämpfung zurückgegriffen werden muss. Weiters stellen Rückstände der Antibiotikaaanwendung speziell im Honig Imker vor ein großes Qualitätsproblem, da hierbei die vom Gesetzgeber erlaubten Grenzwerte rasch überschritten werden können und somit der Vertrieb des Naturproduktes Honig bei Überschreiten des Grenzwertes nicht mehr erlaubt ist. Da der Einsatz von biochemischen Reagenzien in der aufstrebenden Biolandwirtschaft nicht möglich ist, ist man gezwungen auf Alternativpräparate zurückzugreifen. Ein Schritt in Richtung biologischer Bekämpfung von Feuerbrand wurde an der TU Wien im Rahmen des Projektes „Entwicklung von 3-Deoxyflavonoid-basierten *Erwinia*-Bakteriziden und eines Systems zum Bienen-*Erwinia*-Monitoring“ (DaFNE Nr. 100404) gemacht. Diese potentiellen Wirkstoffe wurden in der vorliegenden Arbeit weiter entwickelt.

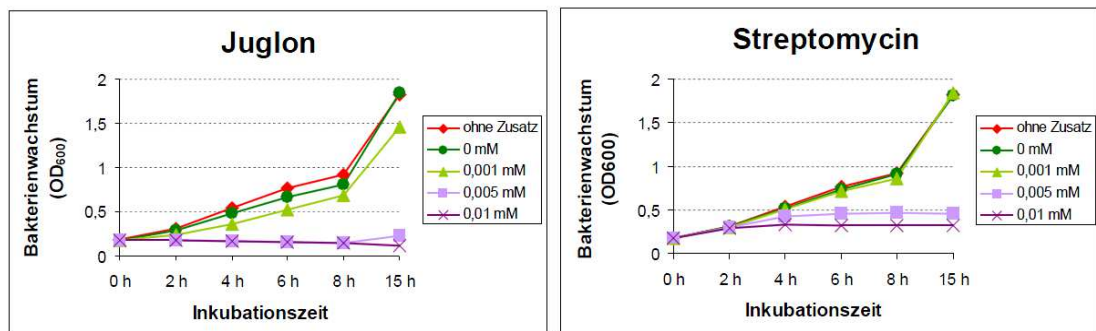


Abbildung 7: Wirkung vom Naturstoff Juglon im Vergleich zum Antibiotikum Streptomycin auf das Wachstum von *E. amylovora* in Suspensionskultur

Als ein äußerst wirksamer und zudem noch natürlich vorkommender Stoff hat sich im genannten Projekt Juglon herausgestellt (Abbildung 7). Juglon ist ein sekundärer Pflanzeninhaltsstoff der vorwiegend in Walnussgewächsen (Juglandaceae) vorkommt. Als Reinstoff wird Juglon als giftig eingestuft, jedoch werden Walnussprodukte seit jeher als Hausmittelchen bei diversen Krankheiten und als Nahrungsquelle eingesetzt. Auch rühren die sogenannten „Nussprankerl“ (bräunlich gefärbte Hände) beim Ernten von noch unreifen, grünen Nüssen für die Nuss Schnapsherstellung daher. Die allelopathische Wirkung von Nussbäumen, also der Grund warum andere Pflanzen nur sehr schlecht unter diesen wachsen und keimen, ist auf die Auswaschung bei Regen einer Juglon-Vorstufe des Walnussbaumes ins Erdreich zurückzuführen. Von Mikroorganismen wird im Boden die Glukose vom Hydrojuglon-Glycosid abgespalten und das entstehende Hydrojuglon oxidiert dann weiter zum keimungshemmenden, antibakteriellen und phytotoxischen Juglon (Abbildung 8). Der Einsatz von Juglon als Wirkstoff gegen den Feuerbranderreger wurde von der TU Wien zum Patent angemeldet (FISCHER *et al.*, 2010). Ungeachtet der traditionellen Verwendung von Walnüssen als z.B. Lebensmittel oder Naturheilmittel sind intensive Studien zur Toxizität von Juglon in einem allfälligen Zulassungsprozess durchzuführen.

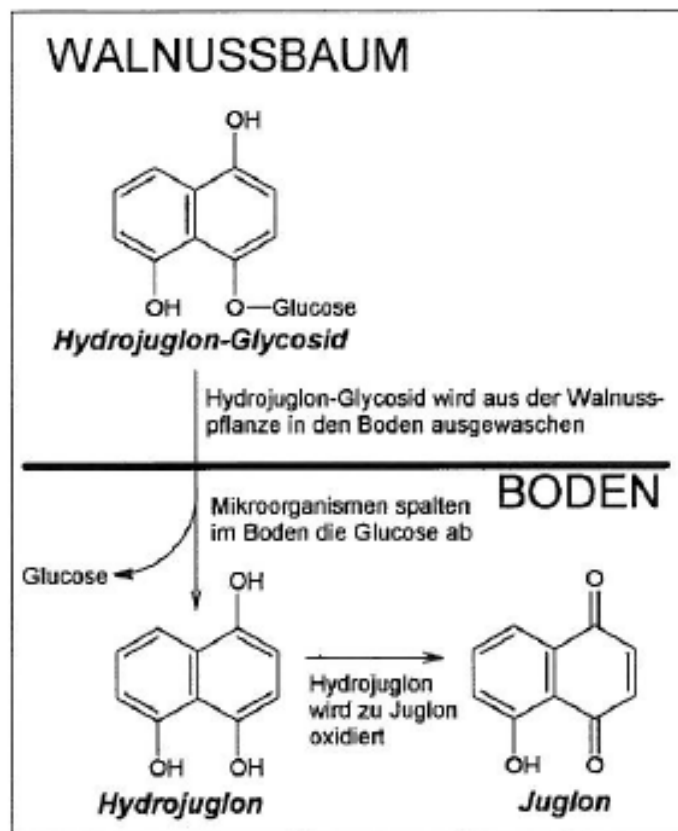
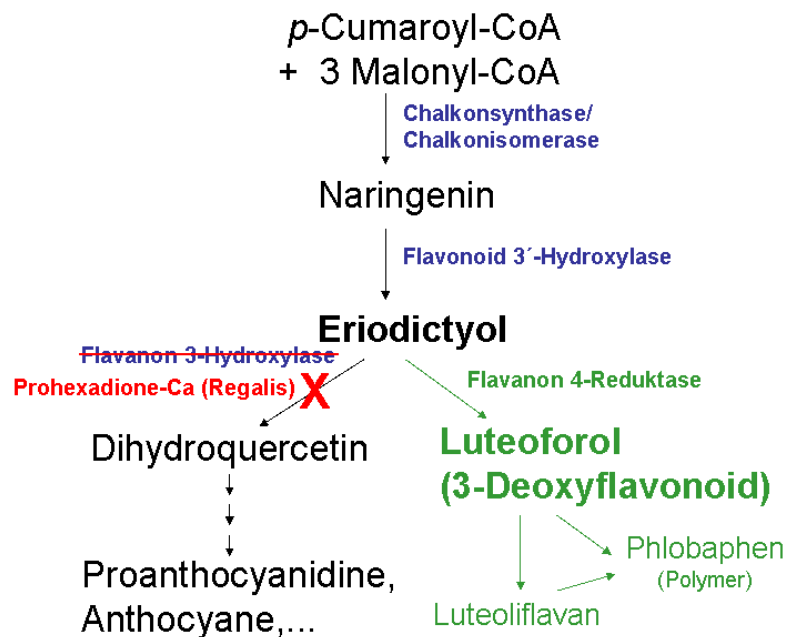


Abbildung 8: Wirkungsweise von Juglon in der Natur

Weiters wurden im genannten Projekt in einem Screening stabile Derivate der 3-Deoxyflavonoide Apiforol und Luteoforol (STICH und FORKMANN, 1987) als potentielle, zukunftssträchtige Alternativ-Stoffe zum Antibiotikum Streptomycin entwickelt. Diese zählen zur vielfältigen Gruppe der Flavonoide, wie auch die farbigen Anthocyane und weisen eine ähnlich starke Hemmung von *E. amylovora* wie Streptomycin auf. Natürlich kommen diese Substanzen nicht in der Apfelpflanze vor, jedoch kann die Wirtspflanze mittels Behandlung mit Prohexadion-Ca (Wirkstoff des Wachstumsregulators „Regalis“) Behandlung, wodurch die Flavanon-3-Hydroxylase gehemmt wird, zu deren Produktion angeregt werden (RÖMMELT *et al.*, 2003). Hierbei reichert sich jedoch das 3-Deoxycatechin Luteoliflavan an (Abbildung 9), welches keine antimikrobielle Wirkung zeigt. Die instabile, hochaktive Vorstufe Luteoforol zeigt sowohl Wirkung gegenüber verschiedene Bakterienstämme, hier ganz besonders gegen den Feuerbranderreger *E. amylovora*, als auch gegenüber Pilzen.

Einerseits werden dabei die Erregerkeime abgetötet und andererseits vom befallenen Pflanzengewebe eine hypersensitive Reaktion eingeleitet (SPINELLI *et al.*, 2005). Dies ist äußerst hilfreich bei der Verhinderung von Sekundärinfektionen der Pflanze. Für die Verhinderung der Primärinfektion (Blüte) ist diese Strategie der Induktion mittels Prohexadion-Ca allerdings nicht geeignet, da die ausreichende Induktion und Produktion von Luteoforol aufgrund der kurzen Blütezeit nicht reicht. Das Manko für einen etwaigen Einsatz als Pflanzenschutzmittel ist derzeit noch die hohe Instabilität und starke Polymerisation dieser Stoffe während deren Synthese im Labor (GOSCH *et al.*, 2009). Der Einsatz von 3-Deoxyflavonoid-Derivaten als Wirkstoff gegen den Feuerbranderreger wurde von der TU Wien zum Patent angemeldet (STICH *et al.*, 2011).



EU-Projekt: „ERWINIA“ (2000 – 2003), Koordination: Prof. K. Stich, TU Wien

Abbildung 9: Syntheseweg der 3-Deoxyflavonoide nach Behandlung der Apfelpflanze mit Prohexadion-Ca

Neben Juglon und den 3-Deoxyflavonoid-Derivaten wurde als dritter Wirkstoff gegen den Feuerbranderreger *E. amylovora* ein von der Fa. „pro aqua“ zur Verfügung gestelltes Elektrolysewasser näher untersucht. Elektrolysewasser

dieser Firma werden erfolgreich zu Desinfektionszwecken z.B. im Lebensmittelbereich eingesetzt. In Zukunft soll es dem Landwirt mit einem Gerät dieser Firma möglich sein, am Pflanzenschutzmittel-Mischplatz oder direkt am Traktor die Wirksubstanz selbstständig herzustellen. Ohne Wirkungsverlust durch lange Lagerung der Substanz soll die frisch hergestellte Lösung ihre volle Wirkung in der Bekämpfung des Feuerbrandes durch Besprühen der Blüten entfalten.

2 Problemstellung

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, potentielle Wirkstoffe gegen den Feuerbranderreger *E. amylovora* weiter zu entwickeln und deren Wirkung mit verschiedenen Testmethoden zu belegen.

3-Deoxyflavonoide

Die Grundsatzbeweise, dass stabile Derivate der 3-Deoxyflavonoide im Labor synthetisierbar und deren Aktivierung mittels Enzymen möglich ist, wurde bereits in vorangegangenen Projekten gezeigt. In der vorliegenden Arbeit sollten weitere Ergebnisse zur besseren Herstellung und Aktivierung gewonnen werden.

Juglon

Vom Naturstoff Juglon war bereits dessen starke Wirkung gegenüber *Erwinia amylovora* aus Vorprojekten bekannt. In weiterfolgenden Versuchen sollte hier auch dessen Wirkung gegenüber anderen *Erwinia*-Arten, welche in unseren Breitengraden zwar nicht heimisch sind, aber in anderen Gegenden dieser Erde für beträchtlichen Schaden und Ernteauffällen sorgen, gezeigt werden. Weiters sollten auch einige Antagonisten auf die Verträglichkeit gegenüber Juglon getestet werden. In weiterer Folge sollten noch Versuche zu dessen Persistenz im Boden, der Phytotoxizität und Rückstandsanalytik in der Frucht durchgeführt werden.

Elektrolysewässer

Als dritter großer Punkt dieser Arbeit sollten Elektrolysewässer von der Firma pro aqua, welche nach einer ausführlichen Schulung selbstständig an der TU Wien erzeugt wurden, hinsichtlich deren Verwendung als potenzielles Spritzmittel zur Feuerbrandbekämpfung getestet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Mikroorganismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 angeführt und sind Bestandteil der Laborkollektion der AG Stich an der TU Wien.

1	<i>Erwinia amylovora</i> 295/93
2	<i>Erwinia amylovora</i> 763
3	<i>Erwinia billingiae</i> 6830
4	<i>Erwinia carotovora</i> NCPB 312
5	<i>Erwinia papayae</i> 24570
6	<i>Erwinia piriflorinigrans</i> 5888
7	<i>Erwinia pyrifoliae</i> 4171
8	<i>Erwinia tasmaniensis</i> 37/10
9	<i>Aureobasidium pullulans</i> Blossom Protect
10	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10315
11	<i>Pantoea agglomerans</i> C9-1
12	<i>Pantoea agglomerans</i> 599
13	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A506

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

3.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 angeführt.

Stoff	Hersteller
Aceton	VITLAB
Agar Agar	MERCK
Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$)	SIGMA
Borsäure	MERCK
Butanol	MERCK
Cantus	BASF
Chloroform	MERCK
DMSO	FLUKA
EGME	SIGMA
EtOAc	MERCK
EtOH	MERCK
Fast Blue BB	SIGMA
Flüssigstickstoff	AIR LIQUIDE
Glycerin	MERCK
H_2O	-
HCl	MERCK
HOAc	MERCK
Juglon	SIGMA
K_2HPO_4	MERCK
KH_2PO_4	MERCK
KOH	MERCK
MeOH	MERCK
MgSO_4	SIGMA
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	MERCK
Na_2HPO_4	SIGMA

Na-Ascorbat	SIGMA
NaBH ₄	FLUKA
NaBO ₂	SIGMA
NaOH	MERCK
Naringenin	ROTH
Naringin	SIGMA
NH ₃	MERCK
Pepton	MERCK
Schnelldesinfektionsmittel (Meliseptol)	B / BRAUN
Sephadex G-20 Medium	PHARMACIA
Triton X-100	APPLICHEM
Tween 20	APPLICHEM
Zitronensäure-Monohydrat	MERCK

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Medien und Puffer

3.1.3.1 King's B-Medium

Für die Herstellung von 1 l King's B-Medium werden folgende Mengen eingewogen:

20,0 g Pepton

1,5 g K₂HPO₄

1,5 g MgSO₄ × 7 H₂O

10,0 ml Glycerin

Nun wird das Volumen mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt und mittels Magnetrührer die Feststoffe gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mittels pH-Meter durch Zugabe von HCl oder KOH auf 7,2 eingestellt. Das Medium wird nun in Flaschen abgefüllt und autoklaviert. Aufbewahrt wird es an einem dunklen Ort bei Raumtemperatur und nach dem ersten Gebrauch im Kühlschrank.

Soll das King's B Medium als Festmedium, zum Beispiel für Plattenkulturen, Verwendung finden, werden vor dem Autoklavieren zusätzlich zu oben

genannten Reagenzien noch 14 g Agar Agar zugegeben. Die Lagerung ist die gleiche wie beim Flüssigmedium. Sollen nun frische Platten hergestellt werden, wird das feste King's B Medium unter zeitweisem Schütteln im Mikrowellenherd erhitzt bis es zur Gänze gelöst und wieder flüssig ist. Nach dem Gießen der Platten sollte es noch etwas Abkühlen, um ein zu starkes „Schwitzen“ der verschlossenen Petrischalen zu verhindern.

3.1.3.2 Mc Ilvaine-Puffer

Für die Herstellung von 200 ml Mc Ilvaine Puffer werden folgende Mengen eingewogen:

3,55 g Na_2HPO_4

0,80 g Na-Ascorbat

Das Volumen wird nun mit destilliertem Wasser auf 200 ml ergänzt und mittels Magnetrührer gründlich gelöst. Der pH-Wert wird mittels pH-Meter durch Zugabe von HCl oder NaOH auf pH 6,0 eingestellt. Dieser Puffer muss immer frisch hergestellt werden, da das Ascorbat unter UV-Einfluss zerfällt und somit seine Wirkung verliert.

3.1.3.3 KPi-Puffer

Für die Herstellung von 500 ml KPi-Puffer werden folgende Mengen eingewogen:

2,13 g Na_2HPO_4

1,36 g KH_2PO_4

150,00 µl Tween 20

In ein geeignetes Gefäß werden die beiden Feststoffe eingewogen und mit destilliertem Wasser auf 0,5 l aufgefüllt. Gelöst werden die Stoffe mittels Magnetrührer. Der pH-Wert sollte nun bei ca. pH 6,8 liegen, wird jedoch nicht eingestellt. Anschließend wird noch das Tween 20 hinzupipettiert (0,03%), gut gemischt und in Glasflaschen abgefüllt, bevor der fertige Puffer autoklaviert wird.

3.1.4 Enzyme

Bezüglich der verwendeten Enzyme: siehe Tabelle 4.

3.1.5 Geräte und Einrichtungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Einrichtungen sind in Tabelle 3 angeführt.

Gerät	Firma	Typenbezeichnung
Autoklav	Fritz Gössner	GLA 30
Elektrophoreseapparatur	Pharmacia	EPS 60
Exsikkator	KNF Neuberger	Vacuumcontroller
Heizblock	Grant	QBT 2
HPLC	Perkin Elmer	Series 200
HPLC-Säule	BDS	Hypersil C18
Inkubationsschwenker	B. Braun	CERTOMAT BS-1
PCR-Cycler	Eppendorf	Mastercycler epgradient 5341
pH-Meter	WTW	pMX 3000
Photospectrometer	Beckman Coulter	DU 800
Präzisionswaage	Sartorius	R 200 D
Rotovapor	Heidolph	Laborota 4000 efficient
Sterilbank	Holten Laminair	TL 2448
Thermomixer	Eppendorf	5355 02869
Tischzentrifuge	Heraeus	Biofuge 15
Tischzentrifuge	Sigma	1-14
Vakuumzentrifuge	Bachofer	SVC 100 H
Vortexer	SI	Vortex-Genie 2
Waage	Mettler	RJ 3600 Delta Range
Wärmeschrank (+28°C)	Heraeus	B 6060
Wärmeschrank (+65°C)	Heraeus	T 12

Tabelle 3: Verwendete Geräte und Einrichtungen

3.2 Methoden

Alle Versuche wurden an der Technischen Universität Wien, Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik und Technische Biowissenschaften, Getreidemarkt 9/166 in 1060 Wien durchgeführt.

3.2.1 Wirkstoffbereitstellung

3.2.1.1 Herstellung von 3-Deoxyflavonoid-Derivaten

Im Zuge dieser Arbeit wurden 2 Methoden zur Herstellung von Apiforol erprobt und diese in Anbetracht ihrer Effizienz, Wirksamkeit und Durchführbarkeit versuchstechnisch optimiert.

1.) Aus Naringenin:

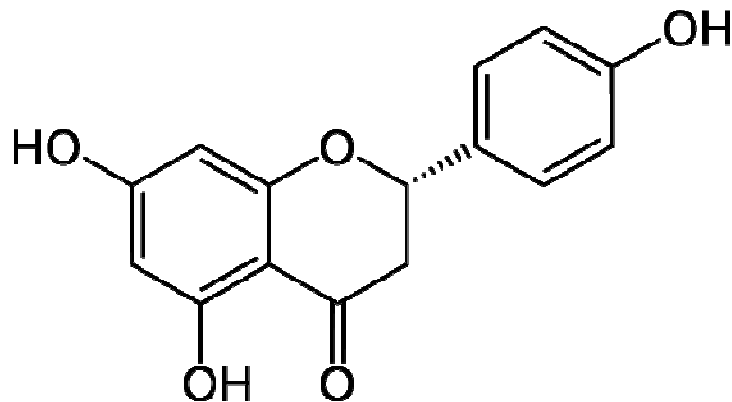


Abbildung 10: Strukturformel von Naringenin

Bei diesem einstufigen Syntheseverfahren dient das Flavonon Naringenin (Abbildung 10), das Aglykon des Glykosides Naringin, als Ausgangsstoff. Durch Reduktion entsteht das aktive, jedoch instabile 3-Deoxyflavonoid Apiforol.

Im 1,5 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß werden 2,72 mg Naringenin eingewogen und in 100 µl EtOH gelöst (100 mM). In ein weiteres Eppendorf Reaktionsgefäß wird 1 mg des Reduktionsmittel NaBH_4 eingewogen und mit der EtOH-

Naringenin-Suspension versetzt. Da bei dieser Reaktion Knallgas entsteht, sollte die Zugabe unterm Abzug stattfinden und das Eppendorf Reaktionsgefäß mit einem zusätzlichen Schutzdeckel verschlossen werden, bevor es ca. 1 Stunde am Schüttler durchreagieren kann. Nun wird das Reduktionsgemisch mit 300 µl H₂O versetzt und mit HOAc der pH-Wert auf ca. 6,0 eingestellt. Nun wird zweimal mit EtOAc (200 µl) extrahiert und die abgenommene Oberphase mit 500 µl H₂O gemischt, bevor das EtOAc im Spitzkolben mit dem Rotovapor abgedampft wird und das Apiforol in die wässrige Phase übergeht. Bei einem einfachen Ansatz empfiehlt es sich gleich im Eppendorf Reaktionsgefäß mit der Vakuumzentrifuge einzudampfen, da im Spitzkolben immer Apiforol-Reste an der Wand kleben bleiben.

2.) Aus Naringin:

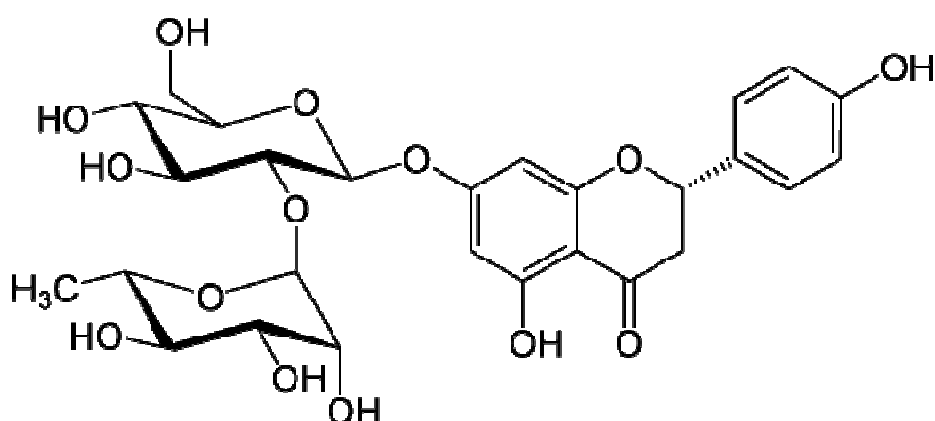


Abbildung 11: Strukturformel von Naringin

Dieses zweistufige Herstellungsverfahren führt über die Zwischenstufe eines weiteren Glykosides. Als Ausgangsmaterial dient das Glykosid Naringin (Abbildung 11), welches im ersten Schritt zum inaktiven, jedoch stabilen Flavan-4-ol-glykosid reduziert wird. Im zweiten Schritt wird nun der Zucker enzymatisch abgespalten und das aktive, instabile Endprodukt Apiforol entsteht.

5,8 mg Naringin werden in ein 1,5 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß eingewogen und in 1 ml EtOH aufgenommen (10 mM). Zur Reduktion zum stabilen Apiforol-(Di)-Glykosid wird die EtOH-Naringin-Suspension in ein mit 1 mg NaBH₄

eingewogenen Reduktionsmittel NaBH_4 pipettiert, wodurch die Lösung milchig wird und das Produkt ausfällt. Nach ca. 1 Stunde am Schüttler wird die Reaktion zur Gänze im Exsikkator eingedampft und das stabile Glykosid in 500 μl H_2O resuspendiert. Nun wird noch mit HOAc auf pH 6,0 angesäuert, wodurch sich das restliche NaBH_4 komplett zersetzt. Nach einmaligem Extrahieren mit 200 μl n-Butanol wird die Oberphase abpipettiert und weiterverwendet.

Im nächsten Herstellungsschritt wird nun das Apiforol-(Di)-glykosid mit dem Enzym Naringinase zum aktiven, instabilen Apiforol gespalten (Abbildung 12). Dazu werden 20 μl der n-Butanol-Oberphase zur Gänze im Exsikkator eingedampft und in 100 μl Mc Ilvaine-Puffer resuspendiert. 17,5 g Naringinase werden in 80 μl (= 5,25 U/Test) Puffer gelöst und zum gelösten Glykosid pipettiert. Der Ansatz wird 10 Minuten bei 40°C inkubiert und zum Schluss noch einmal mit 100 μl EtOAc extrahiert.

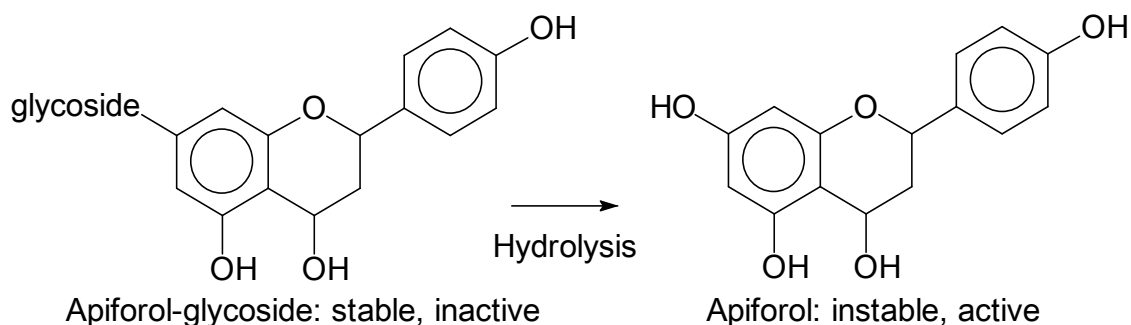


Abbildung 12: Abspaltung des Zuckers vom Apiforol-Glycosid zu Apiforol

Es wurde untersucht, welche Enzyme neben der standardmäßig verwendeten Naringinase eventuell für eine β -glykosidische Abspaltung der Zucker des Apiforol-(Di)-Glykosides geeignet sind (Tabelle 4). In Anlehnung an die Herstellung von Apiforol aus Naringin (siehe Punkt 3.2.1.1 Pkt. 2) wurde dieses Protokoll beibehalten und lediglich die verwendete β -Glykosidase ausgetauscht. Um die Wirkungsgrade der einzelnen Enzyme miteinander sinnvoll vergleichen zu können, wurden die Units pro g laut Herstellerangaben für alle rechnerisch ermittelt und 5 U im Test verwendet (Naringinase = 5,25 U). Die nach der Extraktion erhaltenen 100 μl Apiforol werden vor dem Auftragen auf

Dünnschichtchromatographieplatten (siehe weiter unten) noch etwas im Exsikkator eingedampft um die Lösung aufzukonzentrieren, was das Auftragen auf die Platten erleichtert.

Sigma-Nr.	Enzym	Herkunft	Menge
N1385	Naringinase	<i>Penicillium decumbens</i>	17,5 mg / 80 µl
H8137	Hesperidinase	<i>Aspergillus niger</i>	17,5 mg / 80 µl
C1184	Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	16,7 mg / 80 µl
C8546	Cellulase	<i>Trichoderma reesei</i>	5,0 mg / 80 µl
C9422	Cellulase	<i>Trichoderma viride</i>	0,77 mg / 80µl
L8757	Lysing Enzymes	<i>Rhizoctonia solani</i>	0,77 mg / 80 µl
L1412	Lysing Enzymes	<i>Trichoderma harzianum</i>	5,0 mg / 80 µl
L2524	Lyticase	<i>Arthrobacter luteus</i>	0,0025 mg / 80µl
L4025	Lyticase	<i>Arthrobacter luteus</i>	0,025 mg / 80 µl

Tabelle 4: Getestete Enzyme zur Zuckerabspaltung vom Apiforol-(Di)-Glycosid

Da es nicht zu allen Enzymen entsprechende Herstellerangaben bezüglich der Aktivität gab, wurden für die nachfolgenden Enzyme folgende Werte angenommen.

Hesperidinase (H8137) 17,5 mg / 80 µl in Anlehnung an Naringinase (N1385)

Lysing Enzymes (L8757) 0,77 mg / 80 µl in Anlehnung an Cellulase (C9422)

Lysing Enzymes (1412) 5 mg / 80 µl in Anlehnung an Cellulase (C8546)

3.) Dünnschichtchromatographie:

Die zu chromatographierenden gelösten Stoffe werden mit Kapillaren aufgesaugt und auf die Zellulose-Chromatographie-Platten auf einer Linie aufgetragen. Die Platten werden nun in die Chromatographie-Kammer mit

15%iger HOAc gestellt, bis die Front knapp unter dem oberen Rand läuft. Unterm Abzug werden die Platten getrocknet. Zum Anfärben werden die Platten über dampfende HCl gehalten und angewärmt. Bei dieser Methode färben sich die Polymere des Apiforols rot, während sich einfach gelöstes Naringenin nicht färbt. Weiters wird die DC-Platte mit Fast Blue BB (2 mg/ml H₂O) besprüht und erneut mit dem Fön getrocknet. Eine Bedampfung mit NH₃ unter zusätzlichem Erwärmen färbt nun auch das Aglykon Naringenin an.

3.2.1.2 Herstellung von Juglon-Lösungen und – Formulierungen für die Küvettentests

Das aus der Walnuss gewonnene und als Reinstoff giftige Juglon hat ein Molekulargewicht von 174,2 g/Mol. Als Lösungsmittel diente EtOH. Da das Juglon trotz vortexen nicht leicht in Lösung übergeht, ist es oft erforderlich noch vorhandene kleine Stückchen gegebenenfalls mit einer Pipettenspitze am Rand des Eppendorf-Reaktionsgefäßes zu zerreiben. Juglon ist UV-instabil und wurde daher nicht gelagert, sondern die Lösungen immer frisch hergestellt. Um die gewünschten Konzentrationen an Juglon in den im Photometer gemessenen Suspensionskulturen der diversen Bakterien (Küvettentest) einzustellen, wurden vier Stammlösungen hergestellt. Die entsprechenden Mengen an Juglon wurden für die Lösungen (A) und (D) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß eingewogen, wobei die Lösungen (B) und (C) durch Verdünnungsreihen hergestellt wurden (Tabelle 5).

Stammlösungen			
(A) 10 mM	(B) 1 mM	(C) 0,1 mM	(D) 100 mM
1,74 mg Juglon	100 µl (A)	10 µl (B)	17,4 mg Juglon
1000 µl EtOH	900 µl EtOH	90 µl EtOH	1000 µl EtOH

Tabelle 5: Juglon-Stammlösungen

Die finalen Konzentrationen des Wirkstoffes in den Küvetten mit den zu testenden 2 ml Suspensionskulturen wurden durch Zugabe von maximal 20 µl der entsprechenden Stammlösung eingestellt. Ausnahmen stellten hierbei die finalen Konzentrationen von 4,0 mM und 2,0 mM dar, da die dafür notwendige

einzuwiegende Menge die Löslichkeitsgrenze von Juglon übersteigen würde, weshalb hierfür auch (D) als Stammlösung diente und 80 µl zugesetzt wurden. Um die Tests aussagekräftig zu machen, wurde, falls weniger als 20 bzw. 80 µl beigemischt wurden um die gewünschte Endkonzentration zu erreichen, das verbleibende Volumen mit EtOH ergänzt. Außerdem wurden bei allen mit Juglon durchgeführten Küvettentests Kontrollen mitgeführt, welche einerseits weder Wirkstoff noch Lösungsmittel enthielten, andererseits, die entsprechende Menge an Lösungsmittel, was dessen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien zeigen sollte. Nachfolgend sind die verschiedenen Pipettierschemata der diversen finalen Konzentrationen angeführt (Tabelle 6-8).

Konzentrationen final im 2 ml-Küvettentest					
	Kontrolle	0 mM	0,001 mM	0,005 mM	0,01 mM
<i>E.a.</i> OD₆₀₀ ~0,3	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Wirkstoff in 2 ml <i>E.a.</i>-Suspension	0 µl Jg	0 µl Jg	20 µl (C)	10 µl (B)	20 µl (B)
Lösungsmittel	0 µl EtOH	20 µl EtOH	0 µl EtOH	10 µl EtOH	0 µl EtOH

Tabelle 6: Mischtablette I für bestimmte Endkonzentrationen in der Küvette

Konzentrationen final im 2 ml-Küvettentest				
	0,05 mM	0,1 mM	0,5 mM	1,0 mM
<i>E.a.</i> OD₆₀₀ ~0,3	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Wirkstoff in 2 ml <i>E.a.</i>-Suspension	10 µl (A)	20 µl (A)	10 µl (D)	20 µl (D)
Lösungsmittel	10 µl EtOH	0 µl EtOH	10 µl EtOH	0 µl EtOH

Tabelle 7: Mischtablette II für bestimmte Endkonzentrationen in der Küvette

Konzentrationen final im 2 ml-Küvettentest					
	Kontrolle	0 mM	1,0 mM	2,0 mM	4,0 mM
E.a. OD₆₀₀ ~0,3	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Wirkstoff in 2 ml E.a.-Suspension	0 µl Jg	0 µl Jg	20 µl (D)	40 µl (D)	80 µl (D)
Lösungsmittel	0 µl EtOH	80 µl EtOH	60 µl EtOH	40 µl EtOH	0 µl EtOH

Tabelle 8: Mischtablette III für bestimmte Endkonzentrationen in der Küvette

3.2.1.3 Herstellung von Juglon-Lösungen und – Formulierungen für den Phytotoxizitätstest

Am Vortag der Durchführung des Juglon-Spritzmitteltest wird erstens ein Verdünnungsmittel hergestellt und zweitens die nötige Menge an Juglon (8,7 mg) in ein 50 ml-Falcontube eingewogen. Aufgrund der Giftigkeit des Reinstoffes Juglon und der Staubentwicklung, sollte hierbei Atemschutz und Schutzbrille verwendet werden. Die Lagerung über Nacht erfolgt bei 4°C im dunklen Kühlschrank. Für das Verdünnungsmittel wird 0,2 g Zitronensäure in 200 ml entionisiertem Wasser gelöst (0,1 %) und anschließend der pH-Wert durch Zugabe von 1 M NaOH mittels pH-Meter auf 4,5 gebracht. Nun wird noch 0,2 ml Tween 20 (0,1%) hinzu gegeben und gut gemischt. Am Tag der Spritzung wird das eingewogene Juglon in 5 ml EtOH vollständig eine Stunde lang durch schütteln und vortexen bei 65°C gelöst. Etwaige schwer lösliche Körnchen werden mit einer Pipettenspitze oder ähnlichem zerstoßen. Die tiefgelbe bis orange Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mM wird unmittelbar vor der Anwendung in 100 ml des am Vortag hergestellten Verdünnungsmittels gegeben und gut durchgemischt. Daraus resultiert eine 0,5 mM gelbliche Lösung, welche zur Anwendung bereit steht.

3.2.1.4 Bereitstellung der Elektrolysewässer

Von der steirischen Firma pro aqua wurde eine Elektrolysezelle bereitgestellt, mit deren Hilfe „Wirkstoffe“ (Elektrolysewässer) hergestellt und auf ihre Verwendung als zukunftssträchtige Methode den Feuerbrand zu bekämpfen, überprüft wurden. Die Elektrolysewässer wurden zu Beginn von Firmenmitarbeitern direkt vor Ort und in weiterer Folge, nach einer ausführlichen Einschulung an den Geräten und Prozessen, selbstständig je nach aktuellem Bedarf, hergestellt. Die hergestellten Elektrolysewässer liegen dem Verfahren der anodischen Oxidation (Electrochemical Advanced Oxidation Process) zu Grunde. Dabei bilden die „pro aqua“-Diamantelektroden unter Anlegung von Gleichspannung Oxidationsmittel direkt aus der eingesetzten Flüssigkeit (Elektrolyt). Diese Oxidationsmitteln bauen ihrerseits die organischen Verunreinigen in-situ in der Flüssigkeit ab bzw. wird die bakteriologische Aktivität unterbunden (Desinfektion). Der Betrieb der pro aqua-Diamantelektroden erfolgt auf bipolarer Basis, in dem über Kontaktierungselektroden Strom in das System eingebracht wird. Die Diamantelektroden liegen zwischen den Kontaktierungselektroden und produzieren an ihrer Oberfläche die Oxidationsmittel (Abbildung 13). In Abhängigkeit von Parametern wie Leitfähigkeit, Verschmutzungsgrad, Reaktorgröße, Versorgungsspannung etc. kommen ein oder mehrere pro aqua-Diamantelektroden zum Einsatz. Als Einsatzgebiet im weiteren Sinne dienen die so hergestellten Elektrolysewässer dem Abbau von organischen Substanzen, der Desinfektion, der Gewinnung von biologisch stabilem Wasser und der daraus resultierenden langfristigen Kreislaufführung von Nutzwässern (Angaben laut Fa. pro aqua).

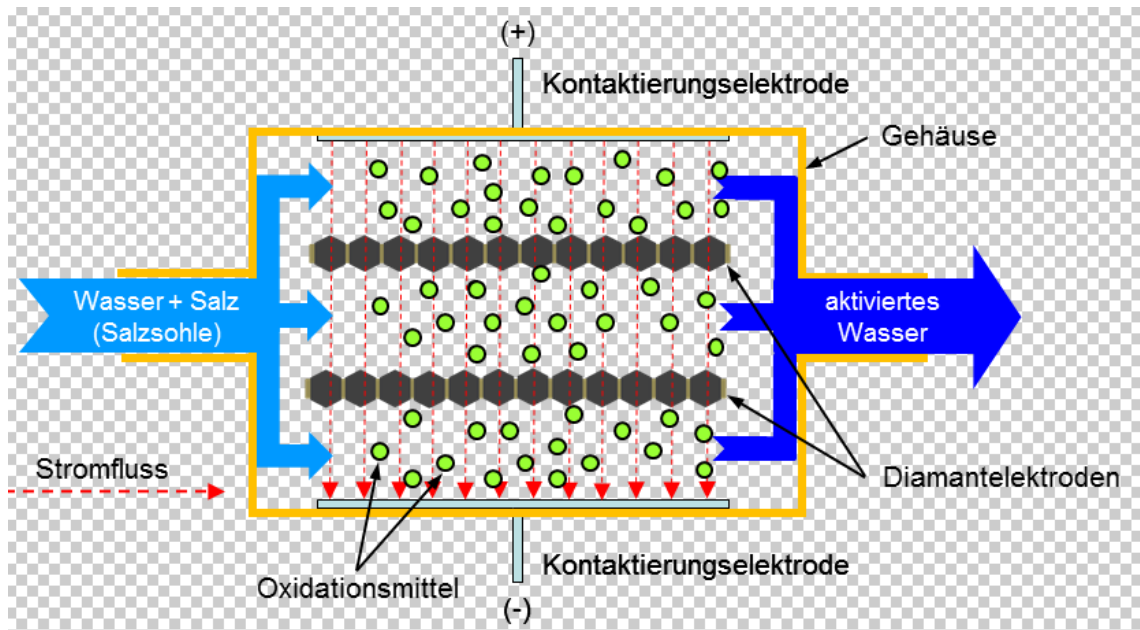


Abbildung 13: Schematischer Aufbau der „pro aqua“-Diamantelektroden
(Quelle: Fa. pro aqua)

Die bei den Versuchen verwendeten Elektrolysewässer wurden nach den in Tabelle 9 ersichtlichen Standard-Parametern, oder in leicht abgeänderter Form, hergestellt. Dabei wurde das jeweilige Salz (NaCl , NaHCO_3 , KCl oder Borax) in eine 5-Liter-Flasche eingewogen und in entionisiertem Wasser vollständig gelöst. Mittels einer kleinen Umlaufpumpe wurde der Elektrolyt angesaugt und über die Diamantelektroden, an welchen der jeweilige Strom durch ein Netzgerät angelegt wurde, über die notwendige Behandlungsdauer wieder zurück in die Flasche gepumpt, wobei die Durchflussmenge an der Pumpe reguliert werden konnte.

Variante	Lösung	Strom- dichte	Strom	Menge	Salz- menge	La- dungs- eintrag	Behand- lungs- dauer	Durch- fluss
	NaCl / NaHCO ₃ / KCl / Borax	[mA/cm ²]	[A]	[l]	[g/l]	[Ah/l]	[min]	[l/h]
0	NaCl / NaHCO ₃ / KCl / Borax	0	0	2,2	5	0	0	0
1	NaCl / NaHCO ₃ / KCl / Borax	100	4,2	2,2	5	0,3	9,43	50
2	NaCl / NaHCO ₃ / KCl / Borax	200	8,4	2,2	5	0,3	4,71	50
3	NaCl / NaHCO ₃ / KCl / Borax	300	12,6	2,2	5	0,3	3,14	50

Tabelle 9: Standard-Parameter zur Herstellung der Elektrolysewässer

Um sicherzustellen, dass es zu keinerlei Fehlern oder Abweichungen bei der Herstellung kommt, wurden bei jeder Charge die Umdrehungen der Pumpe pro Minute und die angelegte Spannung [V] notiert und mit den vorangegangenen Werten auf Übereinstimmung überprüft. Weiters wurde die Menge des freien Chlors, eine der aktiven Substanzen der Elektrolysewässer mit NaCl und KCl, durch einen Schnelltest ermittelt und abgeglichen. Als Kit diente hierbei das Produkt der Schweizer Firma SWAN namens OXYCON ON-LINE DPD. Nach einigen Versuchen hierzu konnte für die Bestimmung des freien Chlors folgendes Protokoll erstellt werden:

2 ml dest. Wasser werden in die Küvette pipettiert und je ein Tropfen der Flüssigkeiten „Oxycon Start“ und „Oxycon DPD 1a“ hinzugegeben. Dies dient auch als Blank bei der nachfolgenden photometrischen Messung. In weiterer Folge werden nun 20 µl des fertigen Elektrolysewassers zugesetzt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut vermischt. Die bis dato klare

Flüssigkeit beginnt sich nun rötlich zu färben, je nach Menge des freien Chlors. Bei einem zuvor durchgeführten Breitband-Wellenlängenscan am Photometer konnten zwei Peaks bei 510 und 550 nm eruiert werden, bei welchen Wellenlängen nun die Werte notiert werden. Da diese Bestimmung äußerst sensitiv ist (Pipettierungenauigkeiten!), empfiehlt es sich drei voneinander unabhängige Bestimmungen durchzuführen und daraus das arithmetische Mittel zu berechnen. Der ermittelte Wert sollte zwischen 1,2 und 1,5 liegen. Nach dem Beifügen sollte sofort im Anschluss die photometrische Messung erfolgen, da mit der Zeit auf Grund des Absetzens am Küvettenboden der Reaktanden nach der Komplezierungsreaktion der tatsächliche Wert abnimmt.

3.2.2 Küvettentests

Die Küvettentests mit Suspensionskulturen der verschiedenen Bakterien dienen primär dem Erstellen von Wachstumskurven bzw. dem Austesten der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) von unterschiedlichen Reagenzien gegenüber diverser Bakterien. Je Konzentration werden immer 3 Küvetten angesetzt und daraus sowohl der Mittelwert als auch die Standardabweichung errechnet. Die Auswertung der Daten erfolgt über Tabellen und Kurven am Computer. Wenn nicht anders beschrieben, wird der Küvettentest in 2 ml Suspensionskultur mit der eingestellten OD_{600} von 0,2 - 0,3 durch Verdünnung einer Übernachtskultur mit frischem King's B Flüssigmedium in Einwegküvetten durchgeführt. Nun wird den Küvetten der Wirkstoff in den unterschiedlichsten Konzentrationen beigefügt. Obligatorisch wird hiezu natürlich sowohl eine Kontrolle ohne Wirkstoff, als auch eine Kontrolle mit Lösungsmittel angesetzt, um auch dessen unmittelbaren Einfluss auf das Bakterienwachstum zu ermitteln. Nach dem Zusammenpipettieren der einzelnen Küvetten auf der Sterilbank werden diese mit Laborfilm verschlossen, wobei darauf zu achten ist, die innen liegende Seite nicht zu berühren (steril), und durch mehrmaliges Wenden gut durchgemischt. Die OD_{600} wird zum Anfangszeitpunkt, nach 2, 4, 6, 8 und 15 Stunden (am nächsten Morgen) nach dem Ansetzen gemessen. Die Inkubation in der Zwischenzeit erfolgt bei 28°C

am Schwenker bei 200 U/min. Pro getesteter Wirkstoffkonzentration bzw. der Kontrollen werden zwei voneinander unabhängige Tests mit jeweils 3 Küvetten/Variante durchgeführt.

3.2.2.1 Standardtest I

Der Standardtest I setzt sich wie bereits in Kapitel 3.2.1.2 beschrieben zusammen und wurde für den Wirkstoff Juglon verwendet.

3.2.2.2 Standardtest II

Für die Überprüfung der Elektrolysewässer der Firma pro aqua (siehe Punkt 3.2.1.4) wurde folgender Standardtest II durchgeführt. In Anlehnung an Punkt 3.2.2 wurde die Ausgangs-OD₆₀₀ wieder so eingestellt, dass sie mit den vollen 2 ml-Volumen einen Wert von 0,2 – 0,3 ergibt. Zu 1800 µl Suspensionskultur wurden 200 µl der Elektrolysewässer pipettiert. Ebenso wurden als Kontrollen die nicht behandelten Salzwässer mitgeführt, als auch eine Kontrolle, bei welcher 200 µl autoklaviertes Wasser verwendet wurde, anstatt einer Wirksubstanz. Die exakte Vorgangsweise des Küvettentests ist unter Punkt 3.2.2 beschrieben.

3.2.2.3 Standardtest III

Ein weiterer Standardtest III mit den Elektrolysewässern der Firma. pro aqua (siehe Punkt 3.2.1.4) wurde wie folgt durchgeführt. Die Anzahl der benötigten Küvetten für den vorzunehmenden Test wurde mit 2 ml multipliziert und die daraus resultierende Menge an Bakteriensuspension in ein steriles Greiner-Röhrchen gefüllt, nachdem die OD₆₀₀ bei ca. 0,3 eingestellt wurde. In der Zentrifuge wurde die verdünnte Bakterienkultur 5 Minuten bei 4800 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet in einem Zehntel der Ausgangssuspension in 10fach konzentriertem King's B – Flüssigmedium unter Zuhilfenahme des Vortexer resuspendiert. Nun wurden 200 µl der aufkonzentrierten Bakteriensuspension mit 1800 µl der Elektrolysewässer auf ein Gesamtvolumen von 2 ml aufgefüllt. Als Kontrollen wurden sowohl die nicht behandelten Salzwässer mitgeführt, als auch eine

Kontrolle, bei welcher autoklaviertes Wasser anstatt der 1800 µl Wirkstoff verwendet wurden. Die exakte Vorgangsweise des Küvettentests ist unter Punkt 3.2.2 beschrieben.

3.2.3 Plattiertests

Der Plattiertest auf King's B – Festmedium dient der Bestimmung der genauen Wirkung potentieller Agenzien, hier speziell für die Elektrolysewässer der Firma pro aqua, auf *E. amylovora*. Hierbei soll gezeigt werden ob die Reagenzien bakteriostatisch (Verhinderung des Zellwachstums und der Zellteilung z.B. durch Hemmung der Proteinbiosynthese, solange das Agens in ausreichender Konzentration vorhanden ist), bakterizid (Abtötung der Bakterien) oder bakteriolytisch (Abtötung durch Verlust der strukturellen Unversehrtheit der Zelle und Freisetzung von Zellinhalt) wirken (Abbildung 14) (BROCK, 2006).

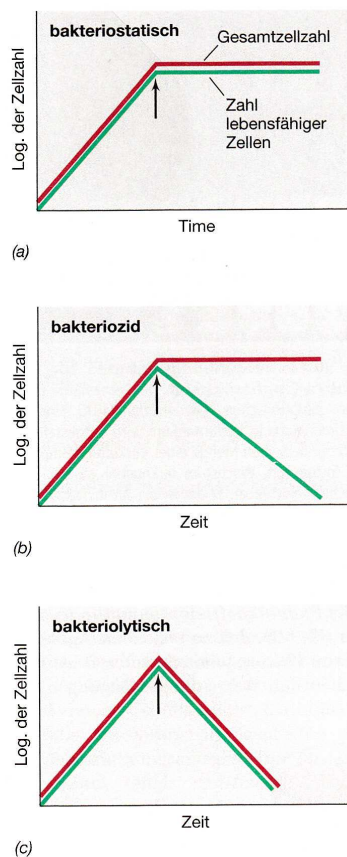


Abbildung 14: Verschiedene Wirkungsweisen von Agenzien auf das Zellwachstum (Quelle: BROCK, 2006)

Für die Plattiertests wurde der unter Punkt 3.2.2.3 beschriebene Standardtest III durchgeführt, jedoch wurden die Proben mit NaCl 0 weggelassen. Nach unmittelbarer Zugabe des Wirkstoffes, nach 2 Stunden und nach 5 Stunden wurden jeweils 20 µl Aliquote aus den Küvetten entnommen. Mit diesen wurden dann 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnungen hergestellt und jeweils 10 µl davon auf King's B-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden dann ca. 48 Stunden bei 28°C inkubiert und anschließend die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Außerdem wurde parallel zu den Zeitpunkten der Aliquot-Entnahme auch die OD₆₀₀ photometrisch bestimmt und am Computer eine Wachstumskurve erstellt.

3.2.4 Einzelblüten-Inokulationstests

Die Einzelblüten-Inokulationstests (Abbildung 15) sollen eine natürliche Infektion der Blüte mit dem Feuerbranderreger *E. amylovora* simulieren, um anschließend diverse neue Wirkstoffe möglichst wirklichkeitsgetreu direkt an der Pflanze auf deren Effekt austesten zu können.

Die im Test verwendeten Apfelblüten der Sorten 'Golden Delicious' und 'Gala' wurden bei der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit (AGES) kultiviert. Die ca. 1,5 m hohen Obstbäume wurden im Kühlhaus bei 4°C gelagert, um ein vorzeitiges Aufblühen zu verhindern. Ungefähr zwei Wochen vor Versuchsbeginn wurden diese dann angetrieben. Am Vortag des Einzelblütentests wurden die *Erwinia amylovora*-Stämme 295/93 und 763 auf King's B-Festmediumplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 28°C inkubiert. Weiters wurden für jede Testreihe 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße (jeweils 20 Stk. ohne Deckel mittels Heißklebepistole in eine Plastikbox geklebt) mit 1,9 ml Saccharose-Lösung (10 %) befüllt. Nun wurden ca. 300 Blüten (Ballonstadium) geerntet (vorzugsweise mit langem Stiel) und in die Saccharose-Lösungen gestellt. Die Boxen wurden daraufhin bei 22°C über Nacht inkubiert, wobei sich die Blüten gänzlich öffnen sollten. Etwaige noch geschlossene Knospen wurden per Hand

geöffnet. Zu alte (mit dunklen, welken Staubblättern), beschädigte oder von Schädlingssraupen angefressene Blüten wurden durch andere ausgetauscht. Am Inokulations- und Behandlungstag wurden mit einer Impföse Bakterien der beiden am Vortag hergestellten Platten in separate 5 ml KPi-Puffer (siehe Punkt 3.1.3.3) in 15 ml-Zentrifugenröhrchen eingebracht und dort resuspendiert. Die Suspensionen werden dadurch leicht eingetrübt. Nun wurde die OD_{420} gemessen und die Suspensionen laut Verdünnungstabelle auf eine Bakteriendichte von 10^7 cfu/ml eingestellt. Von beiden Bakterienstämmen wird nun eine Mischung hergestellt, dass insgesamt 5 ml fertige Inokulationslösung zur Verfügung stehen. Für die Inokulation wird 1 μ l (ca. 10^4 cfu) gleichmäßig auf 5 Blütennarben verteilt mit einer Pipettenspitze aufgetragen. Hiefür ist keine Sterilbank notwendig. Die Inokulationslösung muss jedes Mal frisch hergestellt werden. Die Wirkstoffapplikation erfolgt bei kurativen Mitteln ungefähr zwei Stunden nach der Inokulation. Für die Spritzung werden die Wirkstoffe in Hand-Pumpzerstäuber (Parfum-Fläschchen) gefüllt und jede Blüte mit zwei Hieben (ca. 150 μ l/Hub) aus 5-10 cm Entfernung senkrecht von oben besprüht. Als Kontrollen dienten autoklaviertes Wasser sowie 0,06 % Streptomycin. Direkt nach der Wirkstoffbehandlung blieben die Boxen noch 10 min offen stehen. Nun wurden noch 30 ml einer 32,6 %igen Glycerinlösung in jede Plastikbox gegeben, was in weiterer Folge für eine relative Luftfeuchtigkeit von ca. 70 % sorgen soll. Nun wurden die Boxen verschlossen und für 7-10 Tage bei 22°C in einer Klimakammer inkubiert. Jeden Tag wurden die Blüten von 7 Uhr morgens bis 18 Uhr abends beleuchtet. Ca. 35-40 Stunden nach der künstlichen Infektion mit *Erwinia amylovora* wurde ein Nässeereignis simuliert, wobei mit einer Handsprühflasche zwei Hiebe grob zerstäubtes, autoklaviertes Leitungswasser mit dem Fungizid Cantus (0,5 g/l) auf jede Blüte aufgesprüht wurde. Bei dieser künstlichen Regensimulation sollten die Bakterien, insofern sie durch den verwendeten Wirkstoff noch nicht abgetötet wurden, in Anlehnung an eine natürliche Infektion, in den Blütenboden eingeschwemmt werden. Das Handelspräparat Cantus dient dem Schutze der Blüten vor übermäßigem Pilzbefall und hat keine Wirkung auf *E. amylovora*. Zur Auswertung wurden die Einzelblüten auf Befall von *E. amylovora* hin untersucht. Befallene Blüten

verfärbten sich dabei braun bis schwarz, bzw. waren teilweise rot-braune Bakterientröpfchen am Stiel und dem Blütenboden zu erkennen (Abbildung 16). Um einen Versuch als aussagekräftig zu werten, mussten mind. 50 % der Blüten in der Kontrolle ohne Wirkstoff befallen sein. Der Wirkungsgrad der getesteten Wirkstoffe wurde anschließend nach folgender Formel berechnet: $\eta = (1 - (\text{Infektionsrate bei der Testsubstanz}) / (\text{Infektionsrate bei der Wasserkontrolle})) \times 100$.



Abbildung 15: Arbeitsschritte der Einzelblüten-Inokulationstests

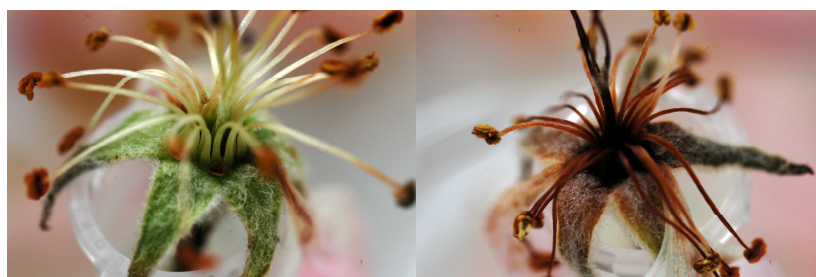


Abbildung 16: Detailaufnahme einer gesunden (links) und mit Feuerbrand befallenen (rechts) Apfelblüte aus dem Einzelblüten-Inokulationstest.

3.2.4.1 Elektrolysewässer

Die Elektrolysewässer (siehe Punkt 3.2.1.4) wurden selbstständig am Tag der Inokulation der Blüten mit *Erwinia amylovora* hergestellt und so auch im Einzelblütentest verwendet.

3.2.5 Phyto- und Ökotoxizität von Juglon

Um den Naturstoff Juglon, der als Reinsubstanz als giftig (T) eingestuft ist, auf seine Phyto- und Ökotoxizität hin zu testen, wurden einige Vorversuche wie folgt durchgeführt.

3.2.5.1 Phytotoxizität von Juglon

Um möglicherweise phytotoxische Reaktionen der Wirkstoffe auf die Befruchtung und Berostung beim Apfel zu testen, wurden am Versuchsgelände der Universität für Bodenkultur in Jedlersdorf Apfelblüten der Sorte ´Golden Delicious´ einzeln (mit einem Pumpzerstäuber direkt in die offene Blüte und auf den Kelch) mit dem Wirkstoff Juglon besprüht. Pro Behandlung mit dem unter Punkt 3.2.1.3 beschriebenen Juglon werden 3 bis 4 Äste verwendet, von welchen alle Blüten entfernt werden, bis auf ganz frisch aufgeblühte und nur maximal zwei Blüten pro Büschel. Insgesamt werden ca. 50 Blüten pro Variante behandelt. Die phytotoxische Auswertung von Blüten und Früchten erfolgt durch visuelle Begutachtung.

3.2.5.2 Persistenz im Boden von Juglon

Wie unter Punkt 3.2.1.3 beschrieben wird eine gelbliche 0,5 mM Juglon-Lösung hergestellt, wobei hier an Stelle des Verdünnungsmittels dest. Wasser verwendet wurde. Der Versuch wird mit gesiebter Erde aus der Apfelplantage in Jedlersdorf (Versuchsfeld der Universität für Bodenkultur) durchgeführt. Hiefür werden 100 g erdfeuchte Erde mit 100 ml Juglon bzw. zur Kontrolle mit 100 ml Wasser + 5 ml EtOH gemischt. Das Gemisch wird nun in einen Plastiktopf gefüllt, im Versuchsfeld ebenerdig versenkt und dieser mit einem Vlies bedeckt.

Die Auswertung mittels HPLC-Analyse erfolgt nach 7-tägiger Wartezeit. Dabei werden nun 10 g Erde mit 100 ml Chloroform eine Stunde bei Raumtemperatur am Schüttler extrahiert. Die weitere Vorgangsweise nach der Extraktion ist ident wie für die Rückstandsanalytik von Juglon wie unter Punkt 3.2.5.3 beschrieben. Der Juglon-Nachweis erfolgte dann mittels HPLC-Analyse (Perkin Elmer Serie 200 HPLC mit Dioden-Array-Detektor) nach einer Methode von GIRZU *et al.* (1998) unter folgenden Bedingungen: Säule: BDS Hypersil C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm (Thermo Scientific), Mobile Phase: A: Wasser:Phosphorige Säure (95,5:0,5 v/v), B: Acetonitril:Wasser (90:10, v/v); linearer Gradient wie folgt: $t_{0\text{min.}}$: 75% A 25% B; $t_{30\text{min.}}$: 60% A 40% B; $t_{40\text{min.}}$: 25% A 75% B; $t_{45\text{min.}}$: 25% A 75% B (isokratisch). Als Referenz wurden 10 µl Juglon (0,87 mg/ml MeOH) verwendet.

3.2.5.3 Rückstandsanalytik von Juglon

Die Blüten werden laut dem Protokoll unter Punkt 3.2.5.1 mit einer 0,5 mM Juglon-Lösung (siehe Punkt 3.2.1.3) behandelt. Nach demselben Muster wie beim Phytotoxizitäts-Test (siehe Punkt 3.2.5.1) werden auch hier Blüten entfernt. In Summe werden ca. 15-20 Blüten pro Variante behandelt. Zur Auswertung werden dann junge Früchte gesammelt und mittels HPLC analysiert. Hierzu wird 1 g Pflanzenmaterial mit dem Mörser zerstoßen und mit 15 ml Chloroform 15 min. extrahiert. Nun wird abzentrifugiert und die flüssige Phase mittels eines Papierfilters aufgereinigt. Diese wird nun zur Gänze im Rotovapor eingedampft und in 1 ml MeOH resuspendiert. Bevor nun 10 µl der Probe in der HPLC wie unter Punkt 3.2.5.2 beschrieben, analysiert werden, wird nochmals mittels Sterilfilter feingefiltert. Der Juglon-Nachweis erfolgt dann mittels HPLC-Analyse, wie weiter unten bei Punkt 4.5 beschrieben.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Wirkstoffbereitstellung

Bei den 3-Deoxyflavonoiden stellte ein Großteil der Arbeit die Wirkstoffbereitstellung dar, während die Juglon-Formulierungen und die diversen Elektrolysewässer sehr einfach hergestellt werden konnten.

4.1.1 3-Deoxyflavonoide

Der Wirkstoffbereitstellung des aktiven 3-Deoxyflavonoides Apiforols und hier vor allem die Verbesserung und Weiterentwicklung der Syntheseprotokolle und Herstellungsverfahren, wie sie nun unter Punkt 3.2.1.1 angeführt sind, galt große Aufmerksamkeit. Speziell dem Protokoll zur Apiforol-Synthese aus Naringenin wurde viel Zeit gewidmet. Anbei einige Neuerungen, die zur aktuellen Arbeitsanleitung führten. Das Eindampfen wurde auf Grund der langen Zeitdauer von mehreren Stunden im Exsikkator von nun an mit dem Rotovapor durchgeführt. Laut Angaben von Hr. Prof. Stich (mündl. Mitteilung) kommt es durch das gänzliche Eindampfen des instabilen Apiforols zu dessen Polymerisation, wodurch es für Versuche unbrauchbar wird. Um dieses zu verhindern, muss es in wässriger Lösung gehalten werden. Dieses wurde erreicht, indem unmittelbar nach dem Durchreagieren der Reduktionsreaktion, welche nach einigen Löslichkeitsversuchen von Naringenin in EtOH auch in 100 µl möglich ist und somit in einem Eppendorf Reaktionsgefäß stattfinden kann, am Schüttler die 3-fache Menge (300 µl) Wasser zugesetzt werden, bevor durch die erprobte Zugabe von etwa 3 µl HOAc der pH-Wert auf ca. 5-6 gesenkt wird, wodurch das überschüssige NaBH₄ abreagieren kann und somit den weiteren Versuch nicht verfälscht. Durch das zweimalige extrahieren mit ermittelten 200 µl EtOAc kann die größte Menge Apiforol gewonnen werden und nach dem Mischen mit 500 µl Wasser und dem nachfolgendem Abdampfen des restlichen EtOAc, kann das in wässriger Lösung befindliche Apiforol nun für

Versuche verwendet werden. Ein Wellenlängenscan am Photometer zeigt eindeutig, dass sich nach der Extraktion mit EtOAc das aktive Apiforol ausschließlich in der Oberphase (EtOAc) befindet und nicht in der unteren wässrigen Ethanolphase (Abbildung 17). Dieses Verfahren wird angewendet, um die große Menge an EtOH wegzubekommen, in welchen das Naringenin gelöst werden muss, damit es nicht durch seine wachstumshemmenden Eigenschaften gegenüber *E. amylovora* die Versuche verfälscht.

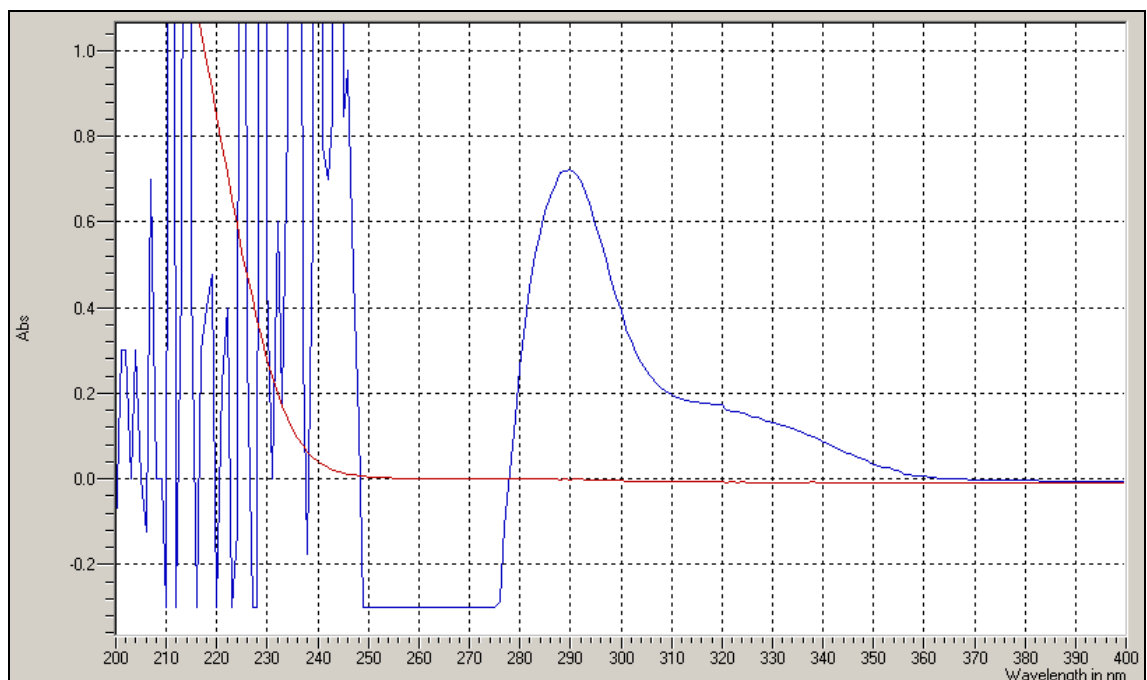


Abbildung 17: Spektrum der Ober- (blau) und Unterphase (rot) nach der EtOAc-Extraktion

Um sich einen Überblick zu verschaffen, ob das hergestellte Apiforol polymerisiert ist bzw. in welchem Ausmaß, wird Naringenin nach dem Standardprotokoll zu Apiforol reduziert (siehe Punkt 3.2.1.1 Pkt. 1) und dieses in verschiedenen Mengen wie unter Punkt 3.2.1.1 Pkt. 3 beschrieben mit 1 M Naringenin auf DC-Platten aufgetragen (Abbildung 18) und im Laufmittel 15 % HOAc chromatographiert. Das synthetisierte Apiforol bleibt bereits zum Teil an der Auftragsstelle kleben (polymerisiert), das restliche wandert und ergibt somit die ersichtlichen „Schmier“. Das in dieser Abbildung 18 mit aufgetragene, lediglich in MeOH gelöste 1 M Naringenin polymerisiert nicht, bildet aber nach der Bedampfung mit NH_3 , einen „Schmier“, dieser ist jedoch

nicht auf polymerisiertes Naringenin, sondern auf eine Überladung der jeweiligen Spuren zurückzuführen. Als Schlussfolgerung dieses Versuches kann man sagen, dass die Synthese von Apiforol aus Naringenin nicht sinnvoll ist auf Grund der Tatsache, dass ein Großteil des Produktes sofort wieder polymerisiert.

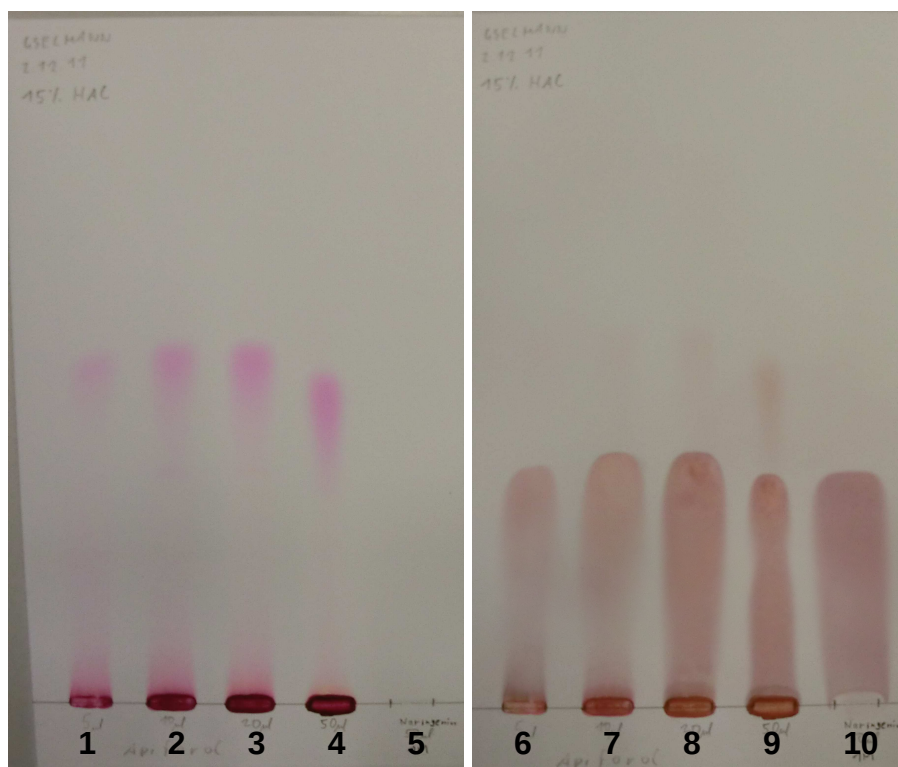


Abbildung 18: Apiforol mit EtOAc extrahiert und auf DC-Platten chromatographiert: links nach HCl-Bedampfung, rechts nach Fast Blue BB und NH_3 -Bedampfung (Spur 1-4 und 6-9: Apiforol (5 μl , 10 μl , 20 μl und 50 μl), Spur 5 und 10: 10 μl 1 M Naringenin)

Extraktionsverhalten von Apiforol-(Di)-Glycosid

Um das Extraktionsverhalten von reduziertem Naringin zu überprüfen, wurden 2 Eppendorf Reaktionsgefäße mit Naringin nach dem Standardprotokoll (siehe Punkt 3.2.1.1 Pkt. 2) reduziert und angesäuert. Extrahiert wurde dann folgendermaßen: Das erste Eppendorf Reaktionsgefäß wurde zuerst mit 200 μl n-Butanol extrahiert, die Oberphase in ein separates Eppendorf Reaktionsgefäß aufgenommen und anschließend die Unterphase nochmals mit 200 μl EtOAc extrahiert und die Oberphase wieder abgenommen. Mit dem 2. Eppendorf Reaktionsgefäß wurde dasselbe gemacht, nur zuerst mit EtOAc und dann mit n-Butanol extrahiert. Einige wenige μl der so erhaltenen Oberphasen wurden

mit 100 µl n Butanol-HCl (2:1) bei 95 °C (ca. 5 min.) zur Rotfärbung gebracht. Die Intensität des Rottons sollte indirekt auf die Ausbeute bei der Extraktion schließen lassen. Wie in Abbildung 19 ersichtlich, bringt die Extraktion von Apiforol-(Di)-Glykosid mit n-Butanol um einiges mehr Ausbeute als mit EtOAc.

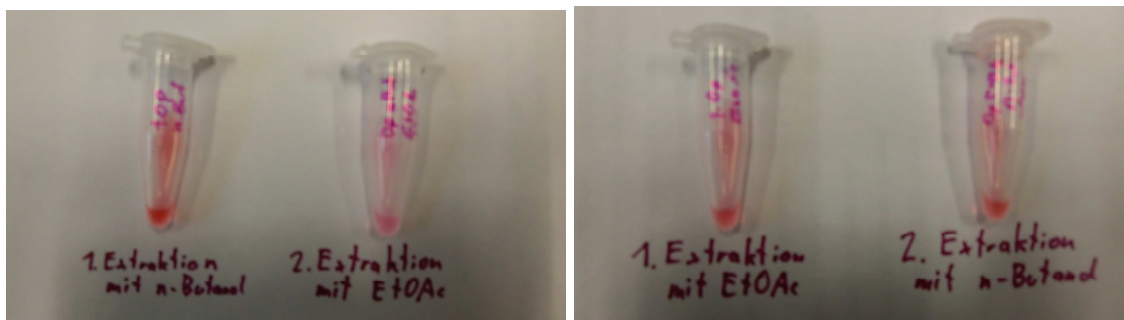


Abbildung 19: Extraktionsverhalten von Apiforol-(Di)-Glykosid durch zweifache Extraktion mit mit n-Butanol bzw. EtOAc (links) und umgekehrt (rechts)

Lagerungsstabilität von Apiforol-(Di)-Glykosid

Um zu testen, wie stabil das Apiforol-(Di)-Glykosid ist, wurde ein Lagerungsversuch durchgeführt. Dazu wurde in 4 Eppendorf Reaktionsgefäßen Naringin nach dem Standardprotokoll (siehe Punkt 3.2.1.1 Pkt. 2) zum Apiforol-(Di)-Glykosid reduziert und mit n-Butanol extrahiert. Aliquote der Extrakte wurden unmittelbar danach lt. Protokoll mit Naringinase zu Apiforol hydrolysiert, bzw. als Kontrolle Puffer statt Naringinase verwendet. Die restlichen Extrakte wurden im Dunklen entweder bei Raumtemperatur oder -20 °C für 8 bzw. 20 Tage gelagert und anschließend ebenfalls einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen. Die Auswertung erfolgte auf DC-Platten im Laufmittel 15 % HOAc mit anschließender Anfärbung (siehe Punkt 3.2.1.1 Pkt. 3) um zu sehen, ob es qualitative bzw. quantitative Unterschiede in den einzelnen Varianten gibt. Wie in Abbildung 20 ersichtlich ist das aufbewahrte Apiforol-(Di)-Glykosid äußerst stabil. Es kommt weder zu einer Veränderung nach langer Zeit, noch spielt die Lagerungstemperatur eine Rolle. Schön in Abbildung 20 ist auch das polymerisierte Apiforol („Schmier“) zu sehen, welches nach der Zugabe des Enzymes Naringinase entsteht, während im Gegensatz dazu das nicht hydrolysierte Apiforol-(Di)-Glykosid deutlich weniger Schmier bildet und auch nicht an der Auftragsstelle kleben bleibt.

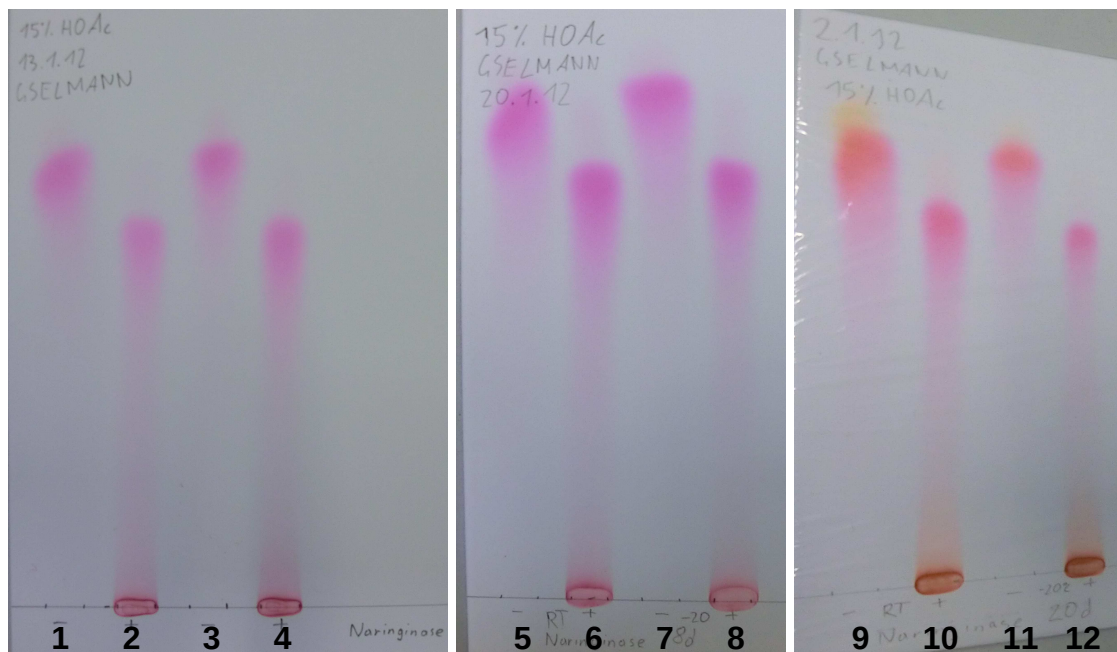


Abbildung 20: Lagerung von Apiforol-(Di)-Glycosid: links: unmittelbar nach der Reduktion; Mitte: nach 8 Tagen; rechts: nach 20 Tagen (Spur 1-4, 5-8, 9-12: RT ohne Naringinase, RT mit Naringinase, -20 °C ohne Naringinase, -20 °C mit Naringinase)

Diverse β -Glykosidasen als Alternative zu Naringinase

Wie unter Punkt 3.2.1.1 Pkt. 2 beschrieben, wurden Enzyme (β -Glykosidasen) getestet, welche eventuell als Ersatz für Naringinase in Frage kämen. Wie in Abbildung 21 zu erkennen, wurden die in Tabelle 4 angeführten Enzyme der Reihe nach von links nach rechts aufgetragen. Vorangestellt eine Hydrolyse mit Puffer an Stelle von Naringinase als Kontrolle und Naringinase selber. Von den getesteten Enzymen waren lediglich die Hesperidinase und das Enzym mit der SIGMA-Nummern L1412 (Lyse-Enzym von *Trichoderma harzianum*) in der Lage den Zucker vom Apiforol-(Di)-Glycosid abzuspalten, wobei die Hydrolyse bei allen dreien weitaus schlechter als mit Naringinase verlief, da weder auspolymerisiertes Apiforol an der Auftragsstelle kleben blieb noch ein merklicher „Schmier“ zu erkennen ist. Für zukünftige Versuche könnten diese drei Enzyme – gegebenenfalls nach einer Optimierung der Reaktion – jedoch eine mögliche Alternative zur Naringinase darstellen.

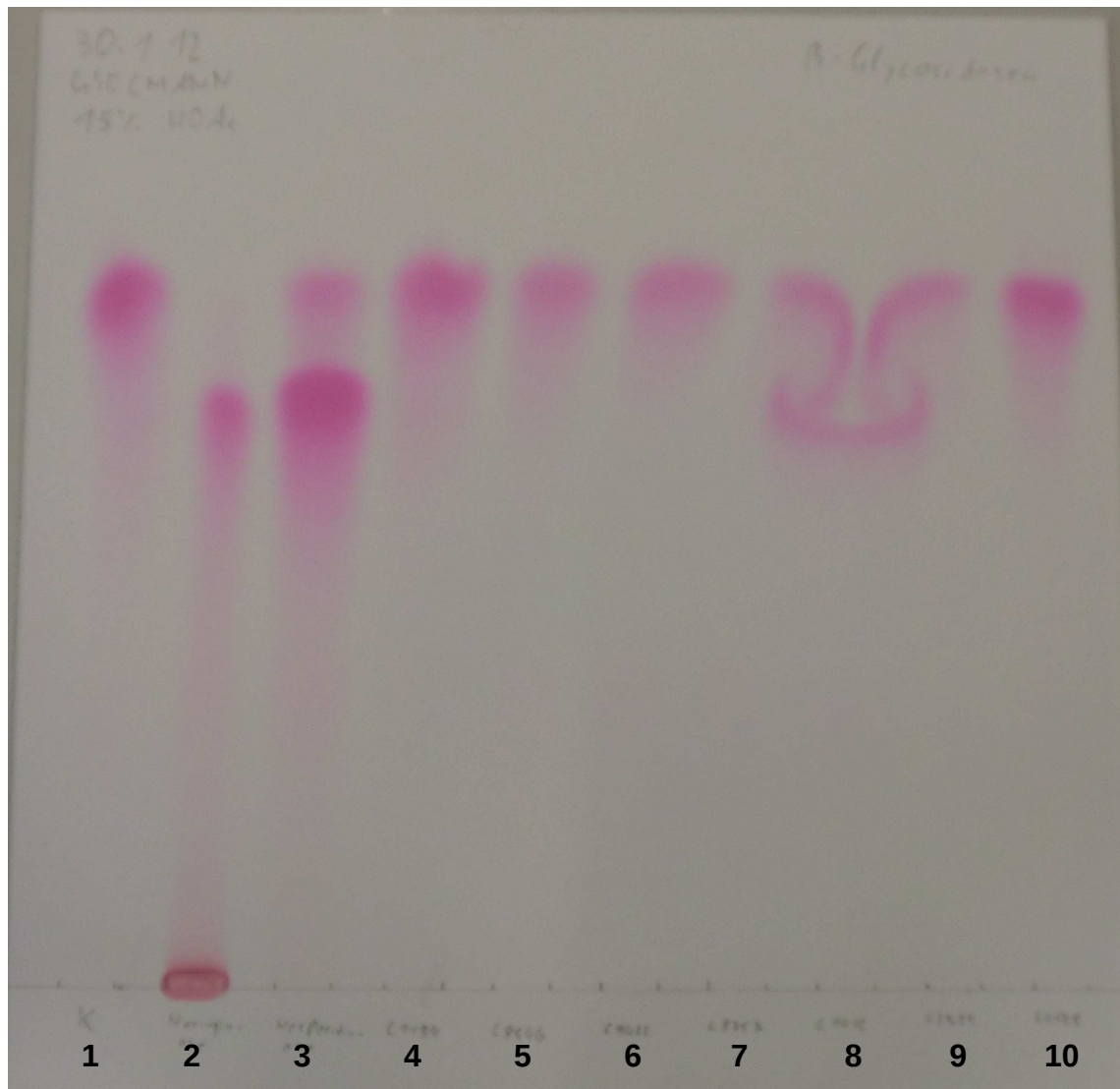


Abbildung 21: DC-Chromatogramme der EtOAc-Extrakte nach Hydrolyse von Apiforol-(Di)-Glykosid durch verschiedene β -Glykosidasen. (1: Kontrolle mit Puffer, 2: Naringinase, 3: Hesperidinase 4: C1184, 5: C8546, 6: C9422, 7: L8757, 8: L1412, 9: L2524, 10: L4025) (SIGMA-Nummern: vgl. Tabelle 4)

Hydrolyse von Apiforol-(Di)-Glykosid zu Apiforol durch *E. amylovora*

Es sollte getestet werden, ob das Apiforol-(Di)-Glykosid möglicherweise durch Enzyme (z.B. endogene Glykosidasen) des Bakteriums *E. amylovora* gespalten werden kann. Dies hätte den Vorteil, dass die Aktivierung des Apiforol-(Di)-Glykosids zu Apiforol nach der Applikation auf die Pflanze direkt von etwaigen vorhandenen *E. amylovora*-Bakterien selbst induziert wird und sich das Bakterium somit selbst schädigt. Folgender Versuch wurde durchgeführt. Nach dem Standardprotokoll (siehe Punkt 3.2.1.1 Pkt. 2) wurden 4 Eppendorf Reaktionsgefäße (Abbildung 22) mit Naringin reduziert, jedoch nur eines davon

laut Arbeitsvorschrift weiter mit Naringinase hydrolysiert. Beim zweiten Reaktionsgefäß wurde wie beim ersten Reaktionsgefäß vorgegangen, jedoch wurde an Stelle von Naringinase selbiges Volumen Mc Ilvaine-Puffer (siehe Punkt 3.1.3.2) eingesetzt. Bei Reaktionsgefäß Nummer drei wurden statt Naringinase lebende *E. amylovora*-Bakterien zugesetzt, wobei zuvor 1 ml Suspensionskultur mit einer OD₆₀₀ von 1 pelletiert wurde und das Pellet in 80 µl Mc Ilvaine-Puffer resuspendiert wurde. Im vierten Reaktionsgefäß wurden als Kontrolle wie im dritten Reaktionsgefäß *E. amylovora*-Bakterien eingesetzt, welche jedoch durch Hitzebehandlung (95 °C für 5 min.) abgetötet und enthaltene Enzyme denaturiert wurden. Nach der jeweiligen Inkubation für 10 Minuten bei 40 °C wurden alle 4 Eppendorf Reaktionsgefäße mit 100 µl EtOAc extrahiert, auf DC-Platten aufgetragen und im Laufmittel 15 % HOAc laufen gelassen. Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, konnten weder tote noch lebende *E. amylovora*-Bakterien das Apiforol-(Di)-Glycosid zu Apiforol hydrolysieren. Lediglich beim Ansatz mit dem Enzym Naringinase entstand Apiforol (Eppendorf Reaktionsgefäß 1), welches durch die Polymerisation an der Auftragsstelle kleben blieb bzw. den typischen "Schmier" ausbildete. Demnach kann angenommen werden, dass Apiforol-(Di)-Glykosid nicht durch Enzyme von *E. amylovora* gespalten wird.

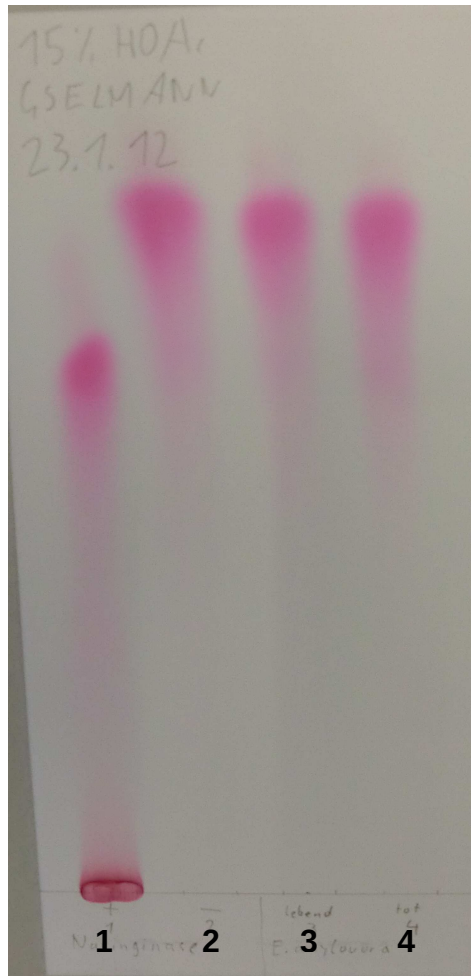


Abbildung 22: Hydrolyse von Apiforol-(Di)-Glykosid durch Naringinase (Spur 1) bzw. durch lebende *E. amylovora* (Spur 3). Spur 2: Kontrolle mit Puffer statt Naringinase. Spur 4: Kontrolle mit abgekochten *E. amylovora*-Bakterien

4.1.2 Juglon

Juglon wurde als Feinchemikalie von der Firma SIGMA - ALDRICH bezogen. Zu beachten ist, dass beim Lösen in EtOH etwaige schwerer löslichere gröbere Körnchen mittels Pipettenspitze oder eines kleinen Glasstabes zerstoßen werden und durch ausgiebiges Vortexen vollständig gelöst werden.

4.1.3 Elektrolysewässer

Je Versuch wurden Elektrolysewässer nach dem Standardprotokoll oder mit leicht abgeänderten Parametern hergestellt. Hierbei wurde speziell die Stromstärke und Behandlungsdauer variiert um einen erhöhten Ladungseintrag

zu erzielen (siehe Tabelle 9). Bei den Salzen NaCl, KCl und NaHCO₃ wurden jeweils die Standardmengen wie in Tabelle 9 beschrieben eingewogen. Um die Menge an einzuwiegenden Borax-Salz zu bestimmen, wurde die Leitfähigkeit der NaCl-Salzlösung [5 g/l] gemessen. Diese liegt exakt bei 9,11 mS/cm. Nun wurde die entsprechende Menge des Borax-Salzes in den entsprechenden 2,2 l Wasser gelöst, um eben diese Leitfähigkeit zu erzielen. Die Menge lag bei 21,75 g/l. Die Elektrolyse des Salzwassers erfolgte wieder nach den Standardparametern oder leicht abgeändert. Der pH-Wert lag vor der Elektrolyse bei 9,4 und danach bei 9,3.

4.2 Küvettentests

Bei den Küvettentests mit den verschiedenen Elektrolysewässern stand nicht die Ermittlung der MIC im Vordergrund wie bei den Tests mit Juglon, sondern die relative Hemmwirkung der einzelnen Wässer zueinander. Bei den durchgeführten Versuchen wurde für Juglon der Standardtest I (siehe Punkt 3.2.2.1) und für die Elektrolysewässer der Firma pro aqua die Standardtests II und III (siehe Punkt 3.2.2.2 und 3.2.2.3) mit teilweise leichten Abänderungen verwendet. Küvettentests mit den 3-Deoxyflavonoiden waren auf Grund der noch nicht ausgereiften Synthesemethoden an dieser Stelle noch nicht sinnvoll.

4.2.1 Juglon

Für den Naturstoff Juglon wurde die minimal inhibitorische Konzentration (MIC) bestimmt, um etwaige Organismen-spezifische Wirkungen von Juglon zu untersuchen. In Tabelle 10 sind die MICs von Juglon gegenüber diverser Mikroorganismen tabellarisch zusammengefasst, während nachfolgend die Wachstumskurven der einzelnen Tests dargestellt sind. Teile der vorliegenden Arbeit zu Juglon wurden in einem peer reviewed Journal publiziert (FISCHER *et al*, 2012).

Die MIC für den Organismus *E. amylovora* 295/93 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 0,01 mM im Küvettentest (Abbildung 23).

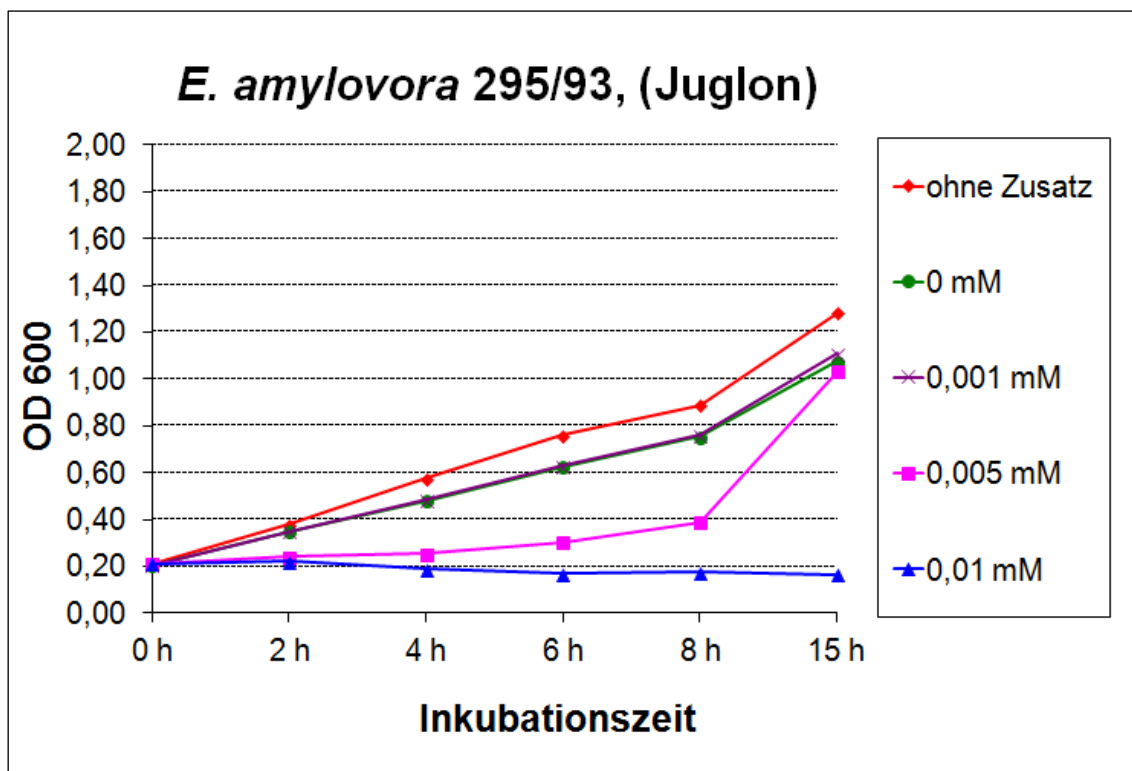


Abbildung 23: MIC für *E. amylovora* 295/93 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *E. amylovora* 763 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 0,02 mM im Küvettentest (Abbildung 24).

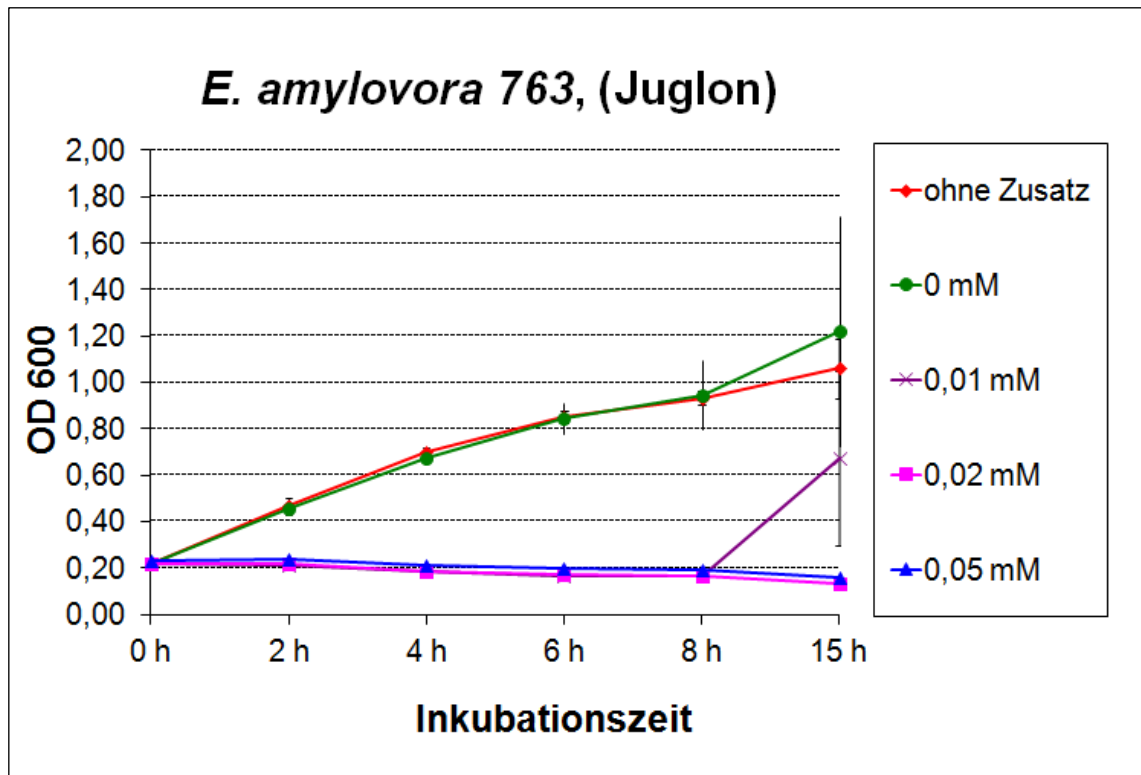


Abbildung 24: MIC für *E. amylovora* 763 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *E. billingiae* 6830 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 1 mM im Küvettentest (Abbildung 25).

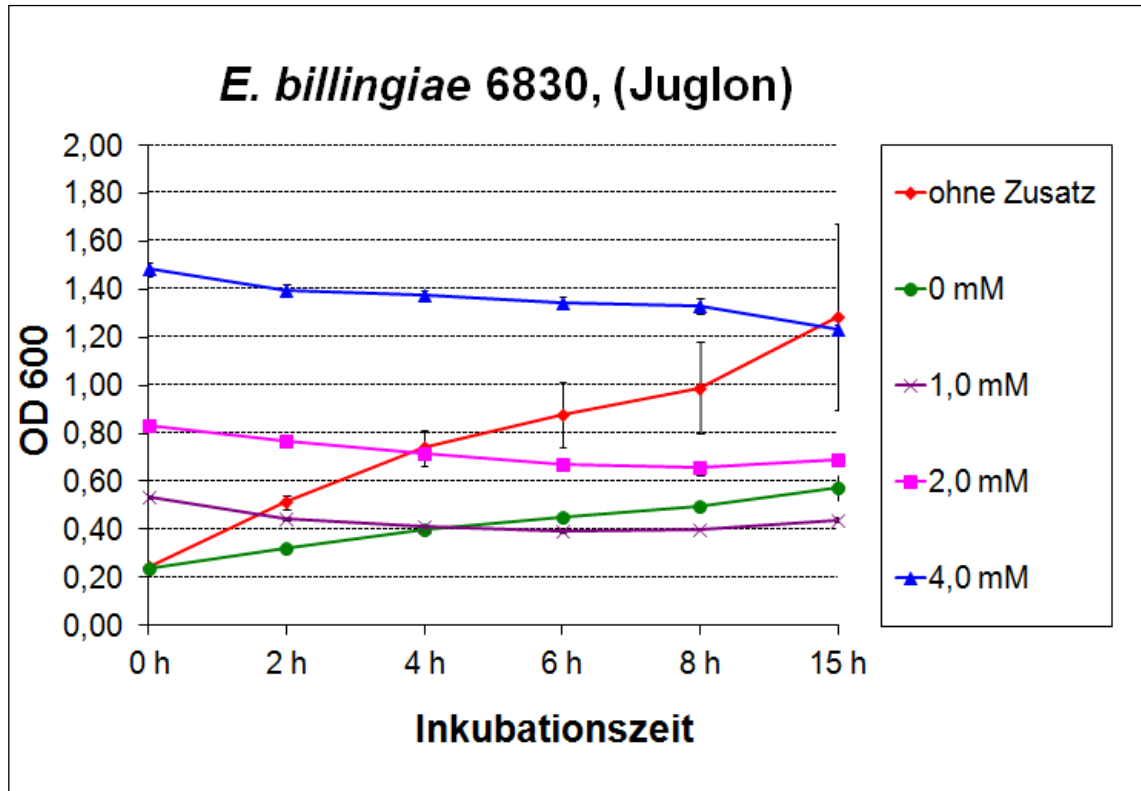


Abbildung 25: MIC für *E. billingiae* 6830 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *E. carotovora* NCPB 312 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 0,5 mM im Küvettentest (Abbildung 26).

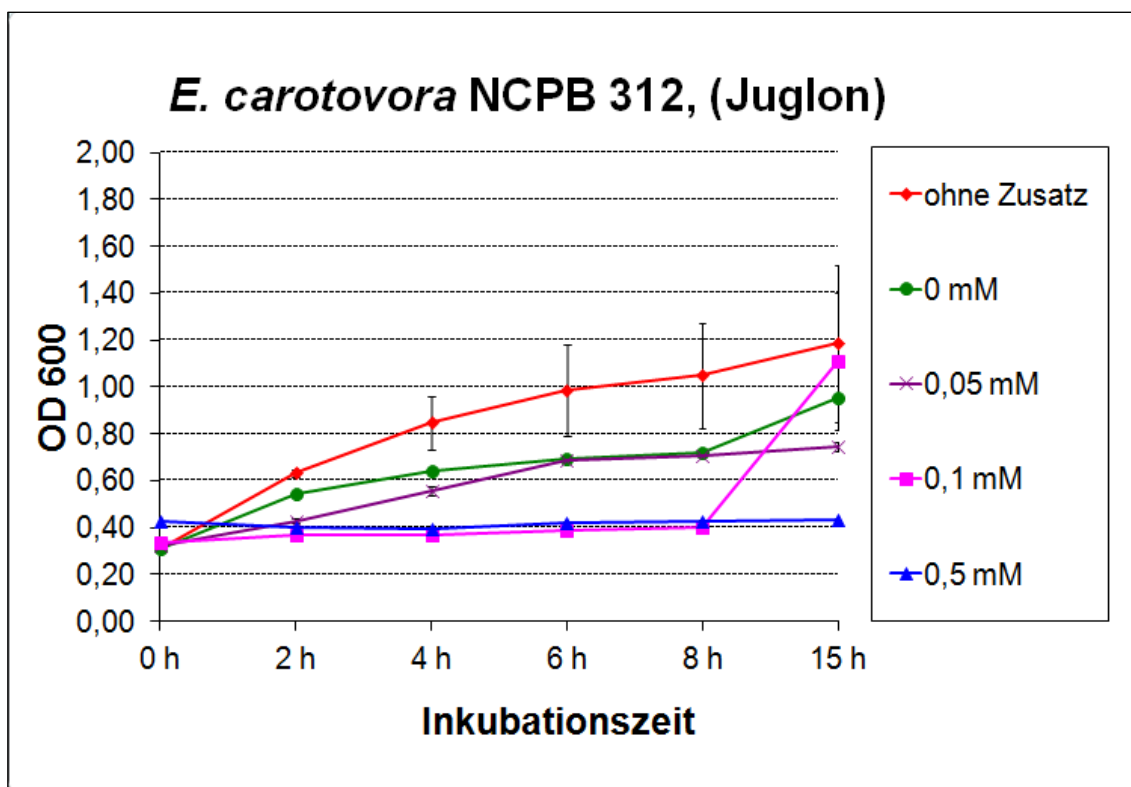


Abbildung 26: MIC für *E. carotovora* NCPB 312 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *E. papayae* 24570 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 1 mM im Küvettentest (Abbildung 27).

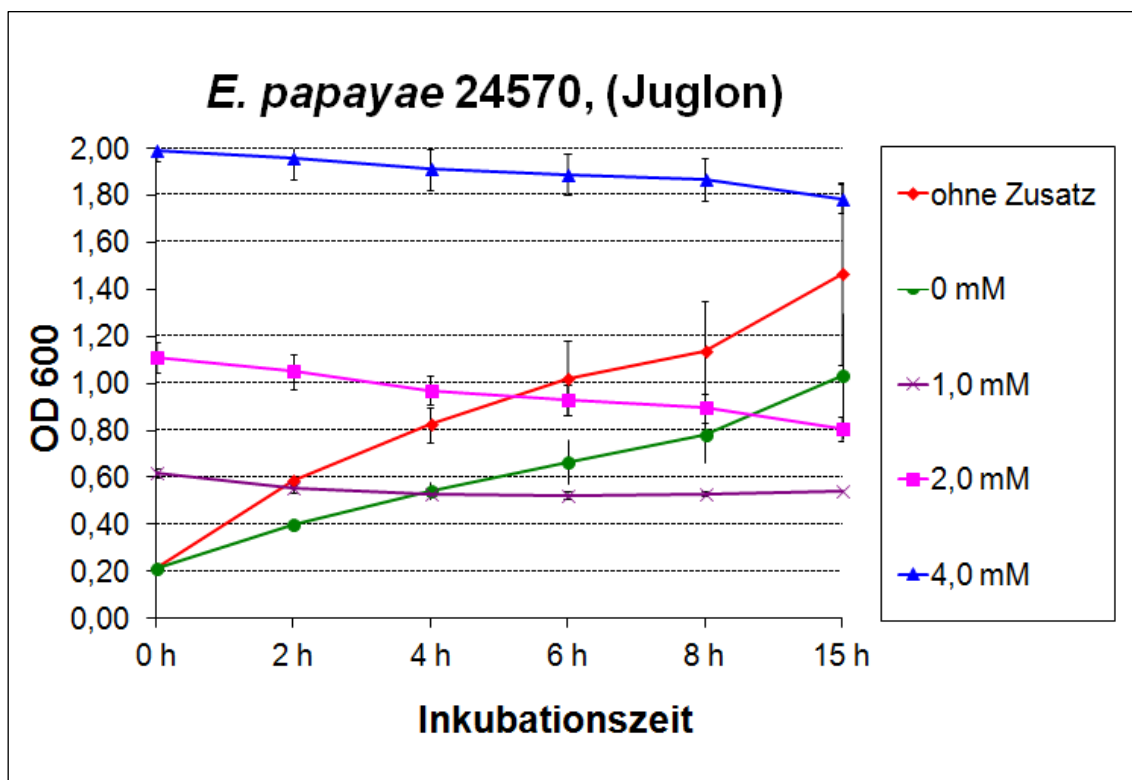


Abbildung 27: MIC für *E. papayae* 24570 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *E. piriflorinigrans* 5888 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 0,5 mM im Küvettentest (Abbildung 28).

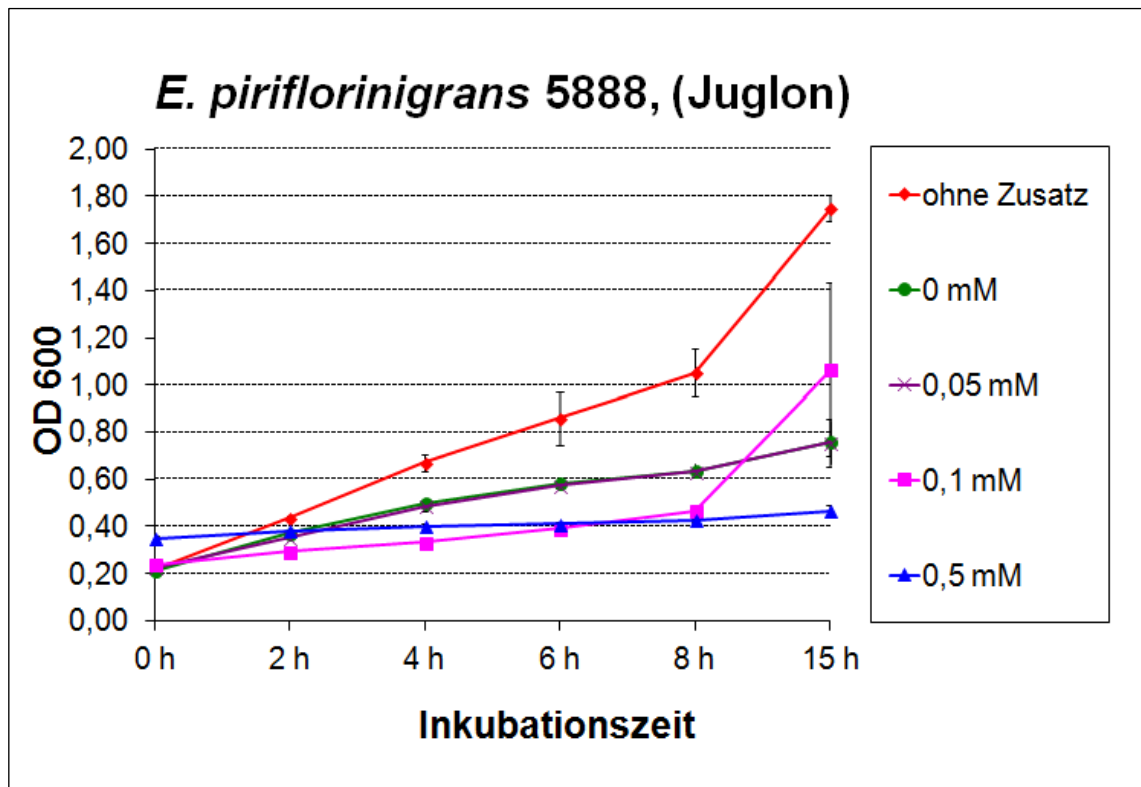


Abbildung 28: MIC für *E.piriflorinigrans* 5888 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *E. pyrifoliae* 4171 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 0,02 mM im Küvettentest (Abbildung 29).

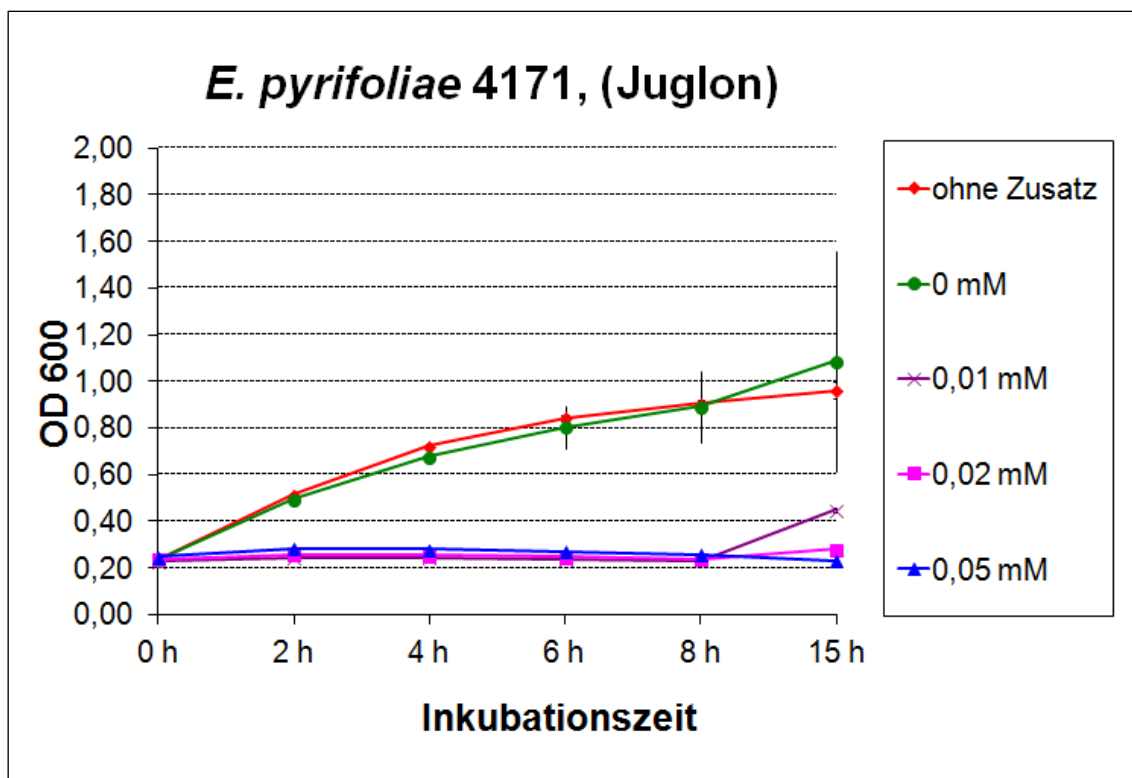


Abbildung 29: MIC für *E. pyrifoliae* 4171 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *E. tasmaniensis* 37/10 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 0,5 mM im Küvettentest (Abbildung 30).

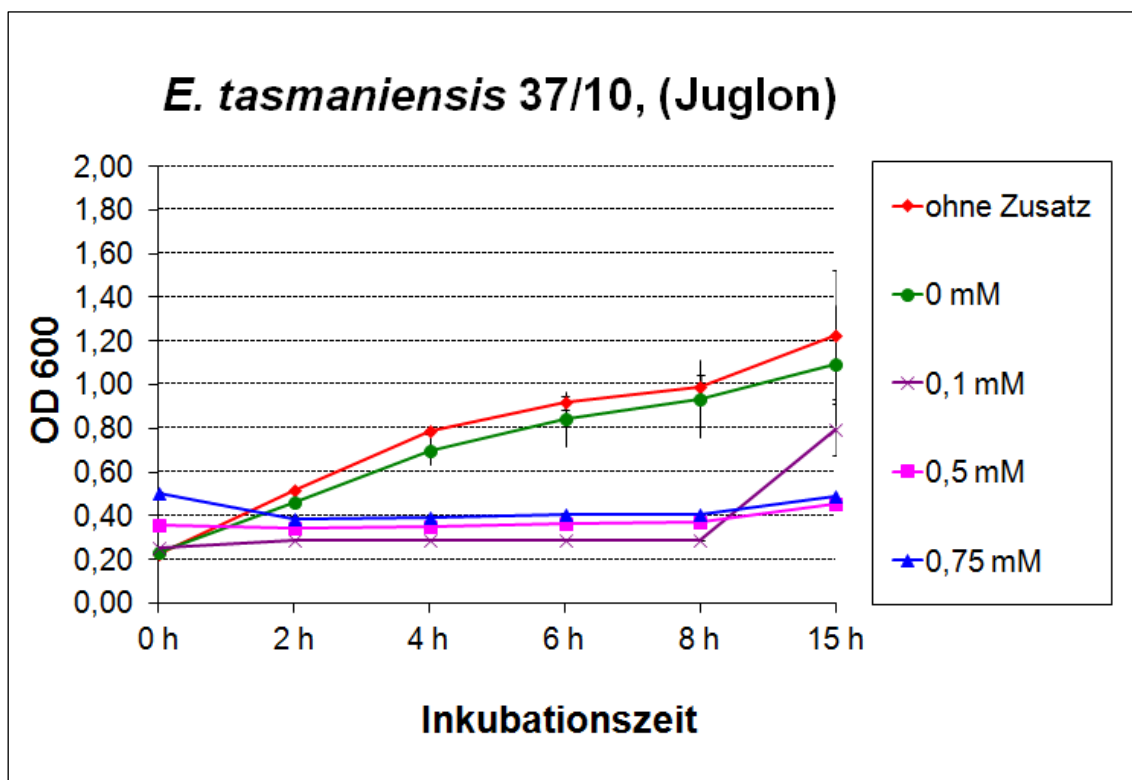


Abbildung 30: MIC für *E. tasmaniensis* 37/10 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *Aureobasidium pullulans* aus dem Handelspräparat Blossom protect gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 1 mM im Küvettentest (Abbildung 31).

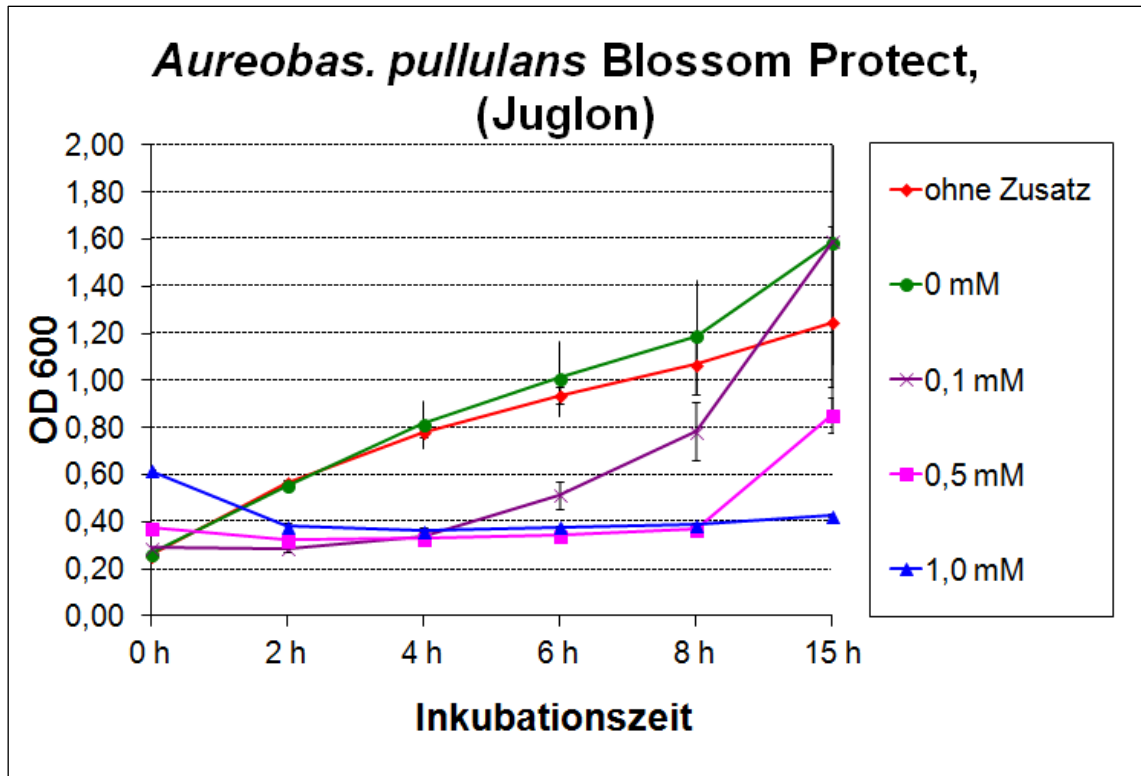


Abbildung 31: MIC für *Aureobas pullulans* Blossom Protect gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *Bacillus subtilis* NCTC 10315 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 0,05 mM im Küvettentest (Abbildung 32).

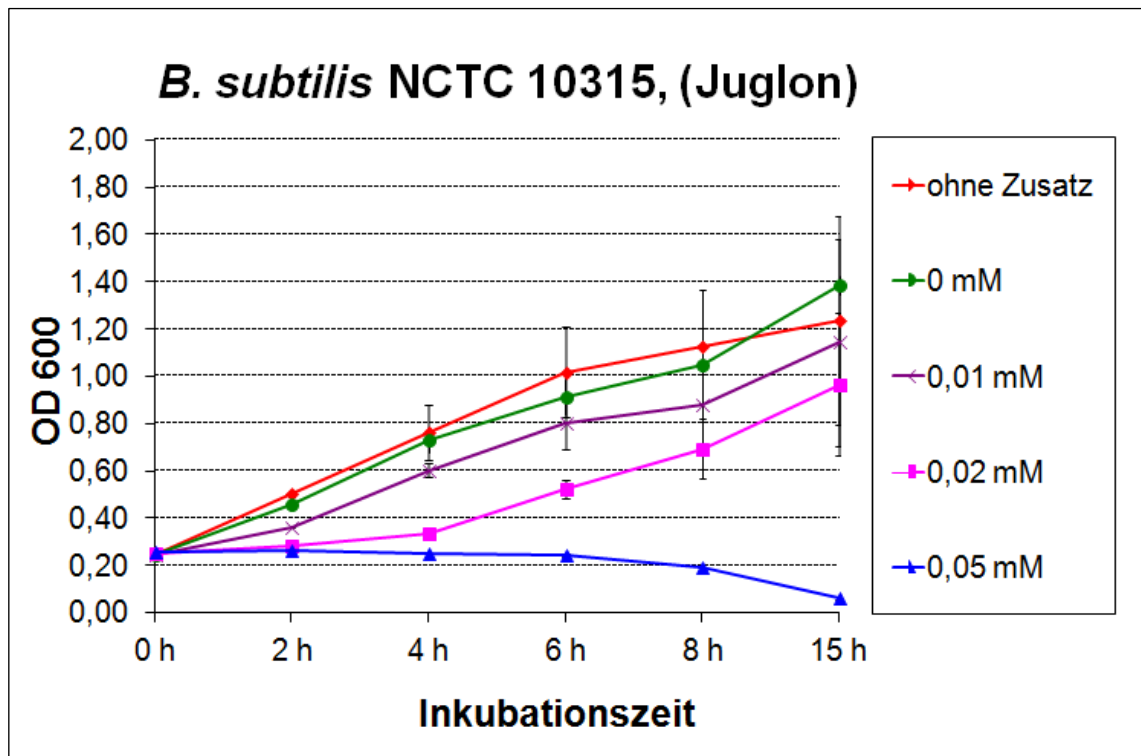


Abbildung 32: MIC für *B. subtilis* NCTC 10315 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *Pantoea agglomerans* C9-1 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 1 mM im Küvettentest (Abbildung 33).

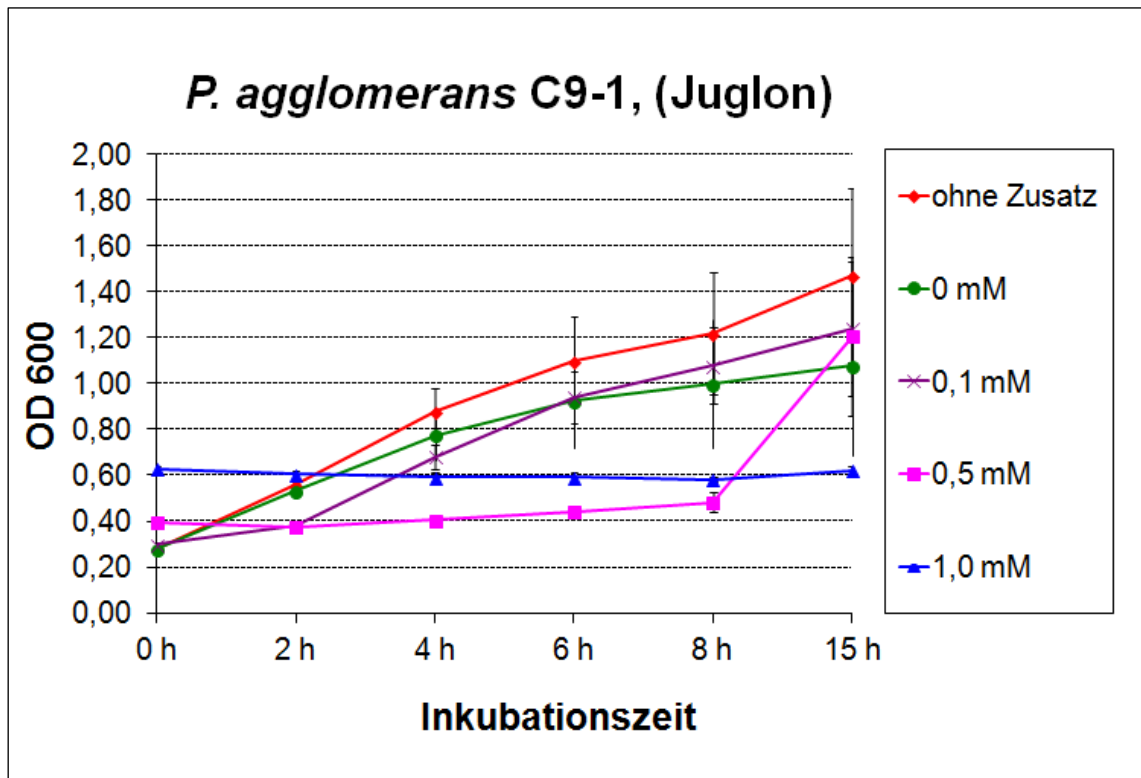


Abbildung 33: MIC für *P. agglomerans* C9-1 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *Pantoea agglomerans* 599 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 0,5 mM im Küvettentest (Abbildung 34).

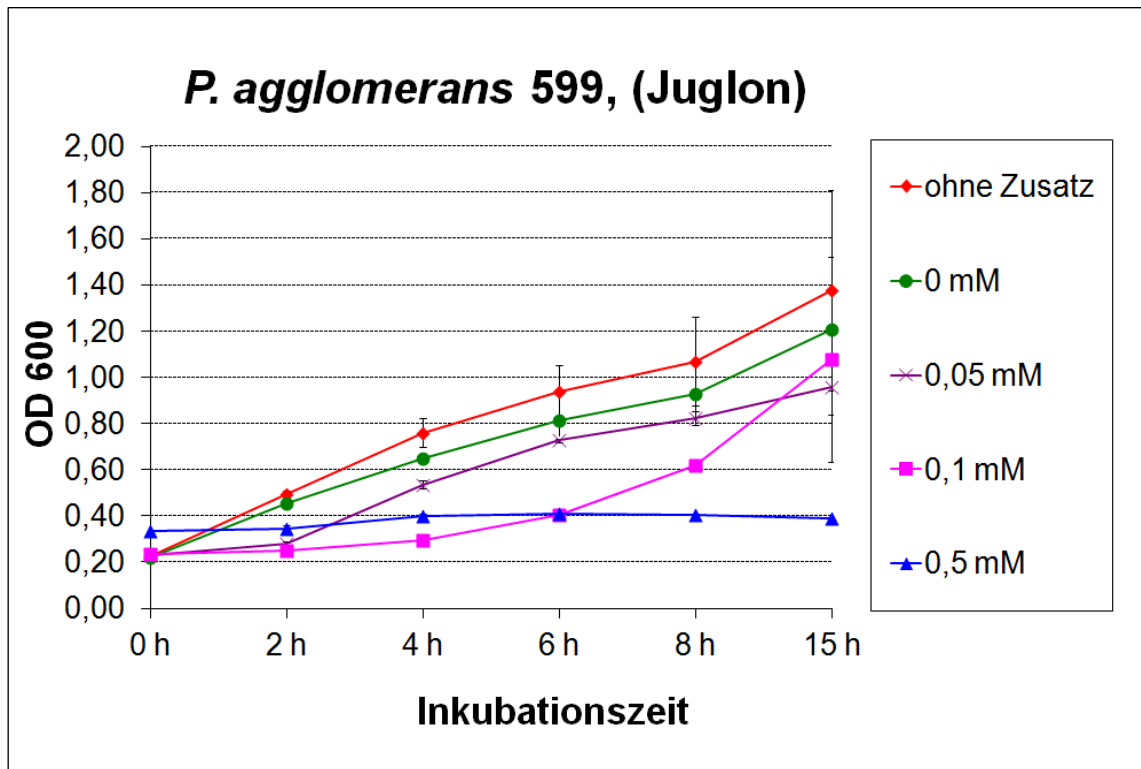


Abbildung 34: MIC für *P. agglomerans* 599 gegenüber Juglon

Die MIC für den Organismus *Pantoea flourescens* A506 gegenüber dem Naturstoff Juglon liegt in etwa bei einer Konzentration von 1 mM im Küvettentest (Abbildung 35).

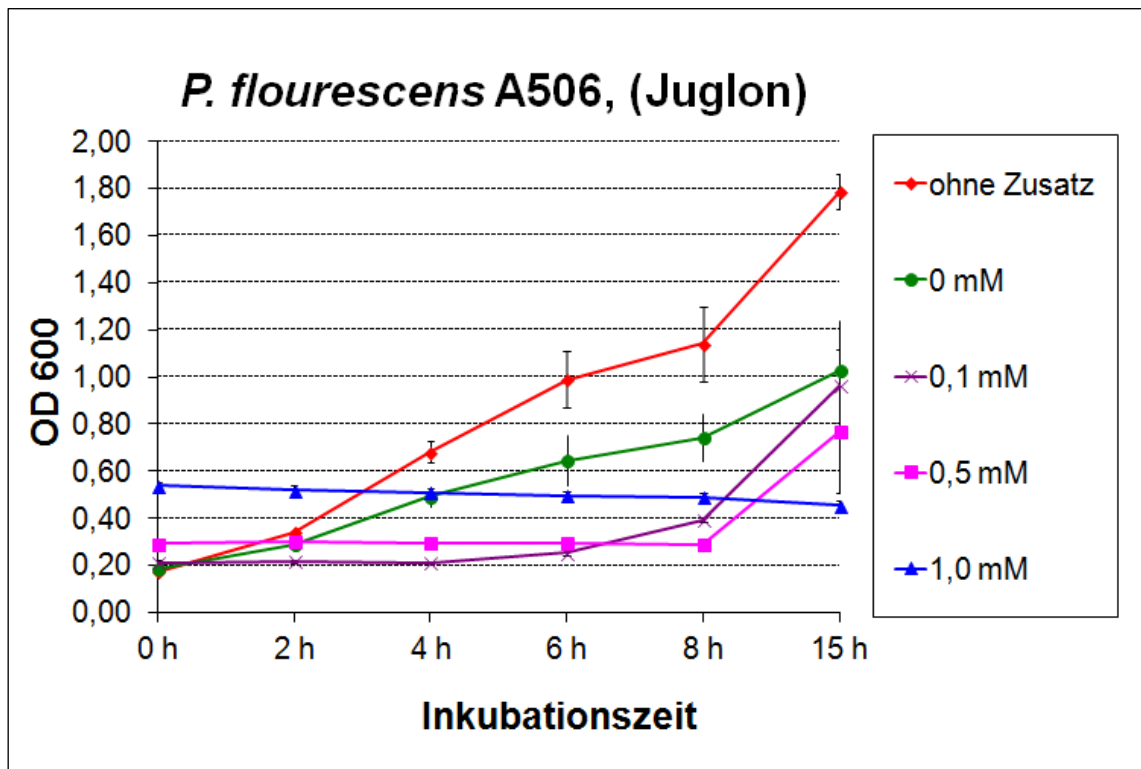


Abbildung 35: MIC für *P. flourescens* A506 gegenüber Juglon

Organismus		MIC
1	<i>E. amylovora</i> 295/93	10 µM
2	<i>E. amylovora</i> 763	20 µM
3	<i>E. billingiae</i> 6830	1000 µM
4	<i>E. carotovora</i> NCPB 312	500 µM
5	<i>E. papayae</i> 24570	1000 µM
6	<i>E. piriflorinigrans</i> 5888	500 µM
7	<i>E. pyrifoliae</i> 4171	20 µM
8	<i>E. tasmaniensis</i> 37/10	500 µM
9	<i>Aureobas. pullulans</i> Blossom protect	1000 µM
10	<i>B. subtilis</i> NCTC 10315	50 µM
11	<i>P. agglomerans</i> C9-1	1000 µM
12	<i>P. agglomerans</i> 599	500 µM
13	<i>P. fluorescens</i> A506	1000 µM

Tabelle 10: Zusammenfassung der MICs von Juglon gegenüber verschiedener Organismen

4.2.2 Elektrolysewässer

Na-Salze (NaCl, NaHCO₃)

Im Standardtest II (siehe Punkt 3.2.2.2) mit 200 µl Elektrolysewasser konnte vorerst kein zufriedenstellender Effekt gegen *E. amylovora* festgestellt werden (Abbildung 36). Unter adaptierten Testbedingungen (Standardtest III, siehe Punkt 3.2.2.3) mit 1800 µl Elektrolysewasser eine vollständige Wachstumshemmung bei den Varianten NaCl 1, NaCl 2 und NaCl 3 erzielt werden (Abbildung 37). Auch NaCl 0 zeigte bereits eine leichte Wirkung. Die NaHCO₃-Varianten hingegen hatten statt eines antibakteriellen Effekts eher eine fördernde Wirkung, weshalb die NaHCO₃-Varianten in den folgenden Versuchen nicht mehr weiter untersucht wurden.

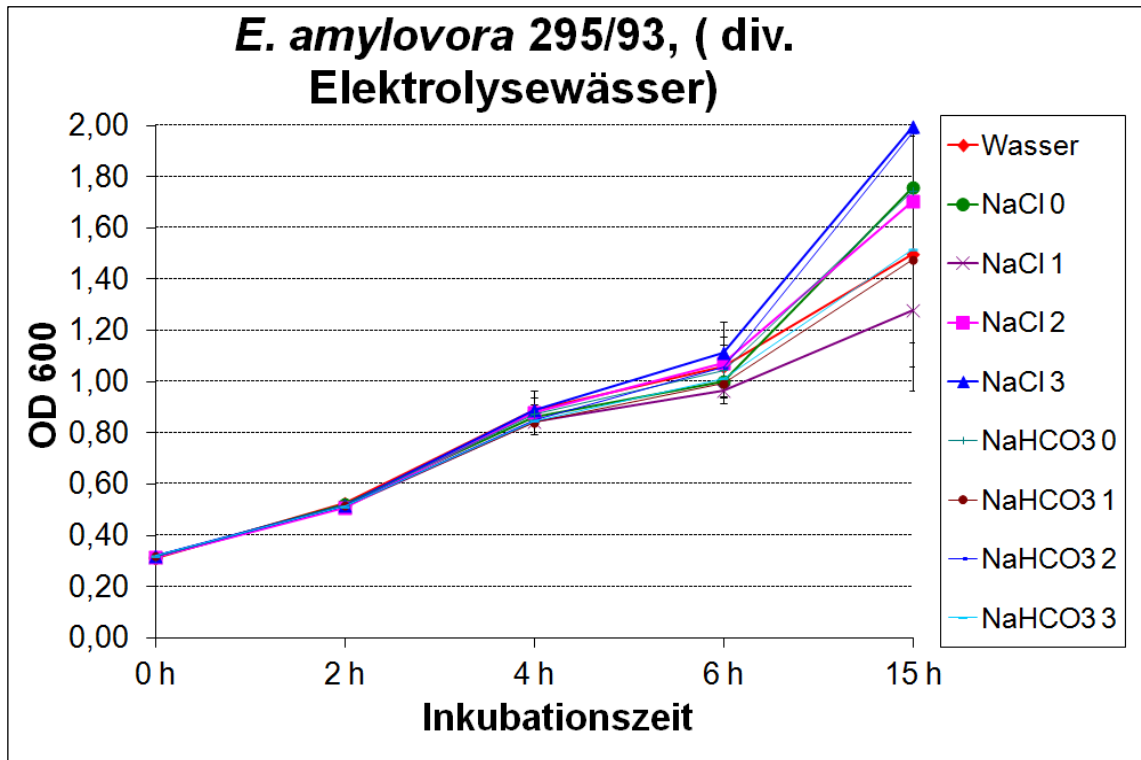


Abbildung 36: Auswirkung diverser Elektrolysewässer (200 µl) auf das Wachstum von *E. amylovora*

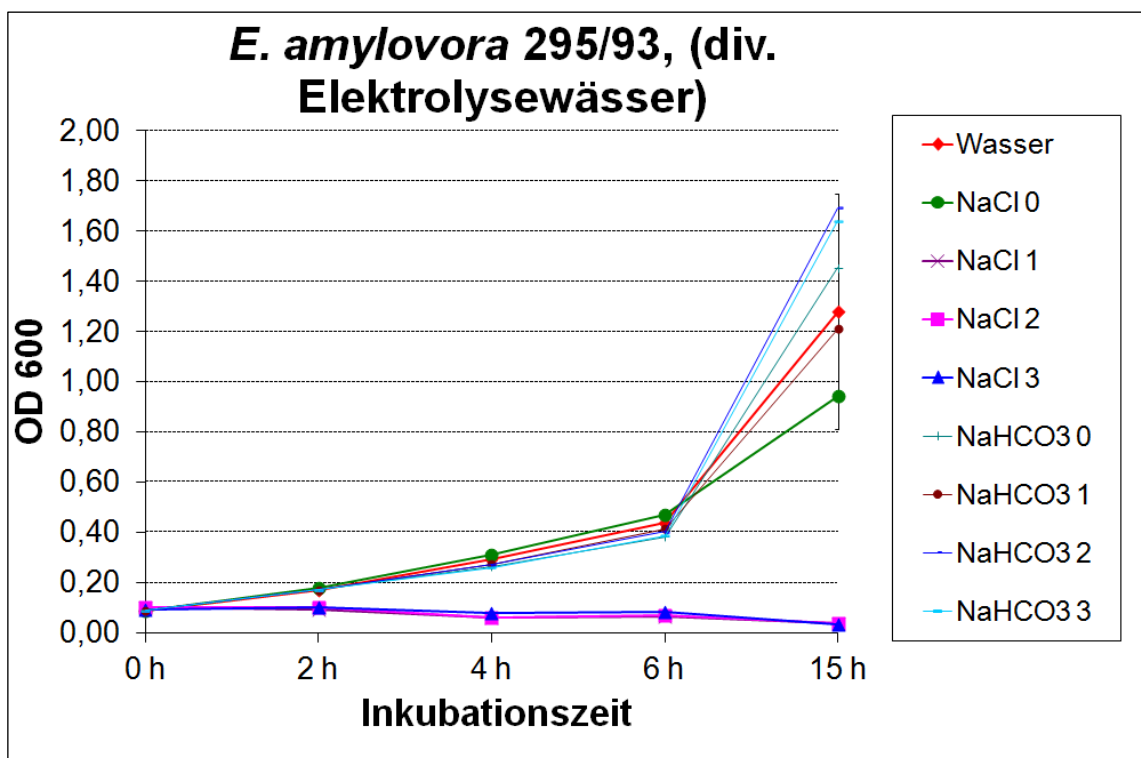


Abbildung 37: Auswirkung diverser Elektrolysewässer (1800 µl) auf das Wachstum von *E. amylovora*

Beim Wirkstoff NaCl 1 ist eine deutliche konzentrationsabhängige Wirksamkeit gegenüber *E. amylovora* 295/93 im Standardtest III (siehe Punkt 3.2.2.3) zu erkennen (Abbildung 38). Hier wurden die Differenzmengen mit sterilem entionisierten Wasser ergänzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von NaCl 1 erwartungsgemäß dosisabhängig ist, wobei ab einem Volumen von 600 µl eine Hemmung beobachtbar war, die ab 1400 µl vollständig war. Die Volumina, mit denen eine bestimmte Hemmung erzielt werden kann, variierten allerdings in Abhängigkeit vom Alter des Elektrolysewassers und auch zwischen den Herstellungsladungen, was in den weiteren Versuchen ersichtlich wurde. Deshalb wären zukünftig für jede Charge einfache Vorversuche sinnvoll, um die optimalen Volumina für eine Hemmung abschätzen zu können.

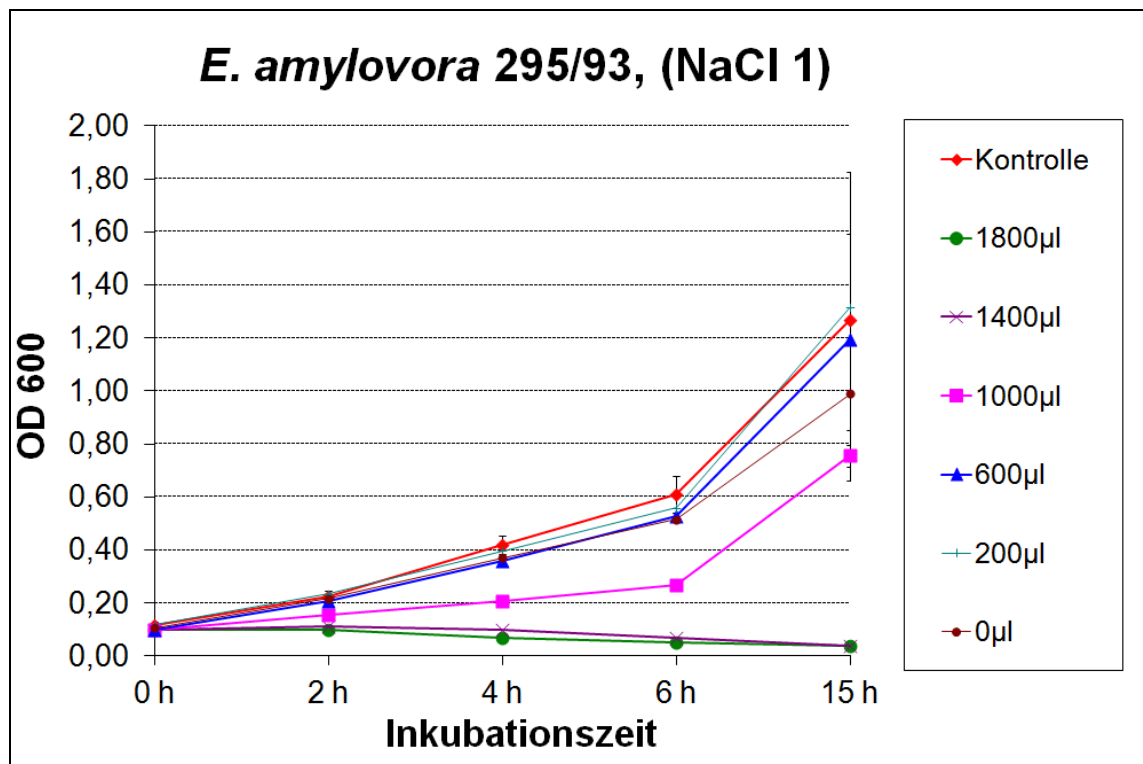


Abbildung 38: Konzentrationsabhängige Wirksamkeit des Elektrolysewassers NaCl 1 gegenüber *E. amylovora*

Auch konnte in weiteren Versuchen eine pH-Wert-abhängige Wirkung mit dem Elektrolysewasser NaCl 1 gegenüber *E. amylovora* 295/93 gezeigt werden (Abbildung 39). Hier wurde eine mittlere Hemmkonzentration von 1000 µl, wie in Abbildung 38 ersichtlich, gewählt und die Differenzmenge wieder mit sterilem, entionisierten Wasser ergänzt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte zuvor durch Zugabe von 2%iger HCl und 1 N NaOH. Der pH-Wert der Ausgangslösung lag in etwa bei jeder Charge hergestelltem NaCl 1 Elektrolysewasser bei 9,6. Eine Absenkung des pH-Wertes in den neutralen bis leicht sauren Bereich führt hierbei zu einer verbesserten Hemmwirkung des Elektrolysewassers gegenüber *E. amylovora* 295/93.

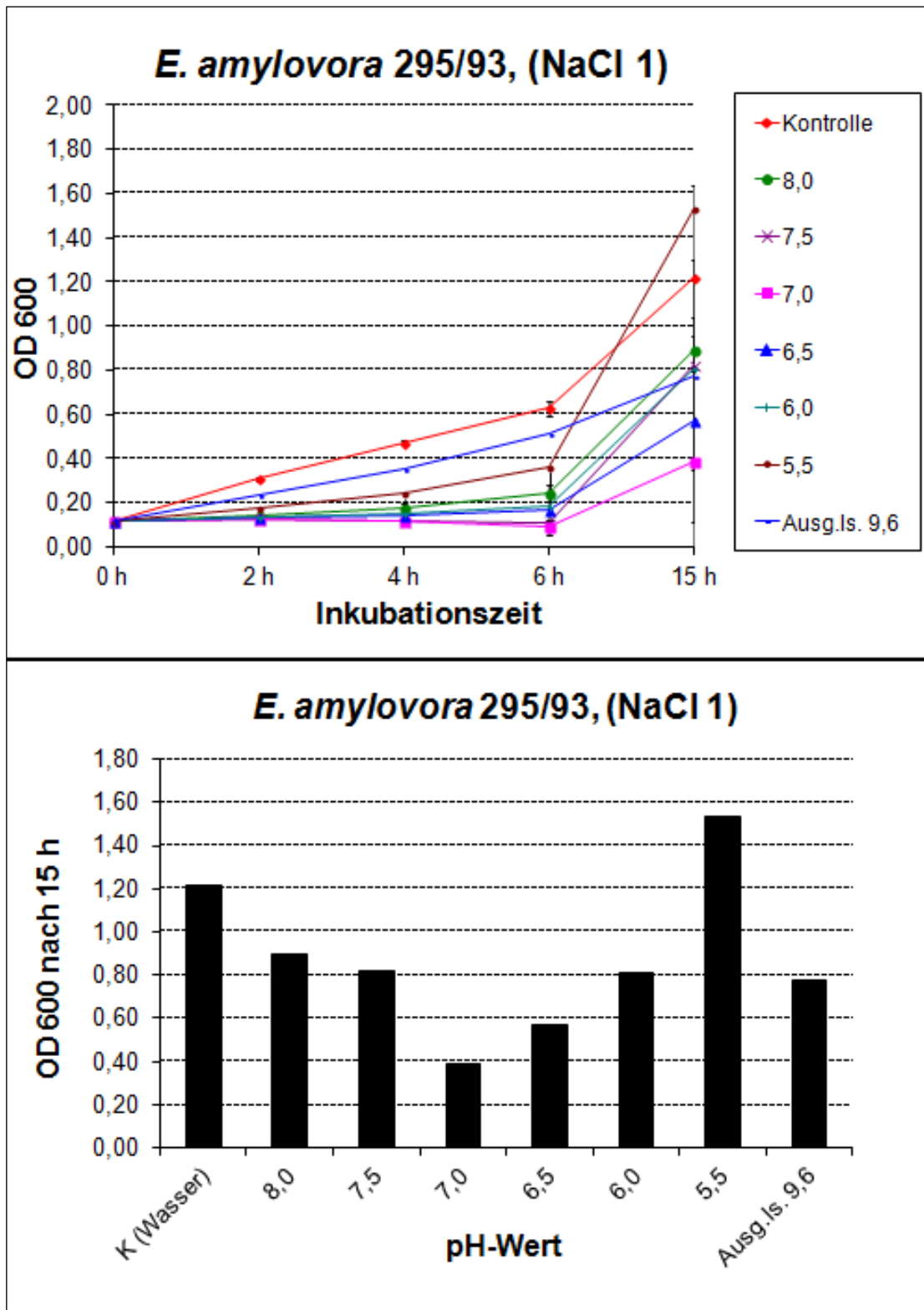


Abbildung 39: pH-Wert-abhängige Wirksamkeit des Elektrolysewassers NaCl 1 gegenüber *E. amylovora*

Einfluss von Netzmitteln

Da in der Praxis zu Spritzmitteln normal in etwa 0,01% Netzmittel hinzugefügt werden, wurde hierzu auch deren alleinige Wirksamkeit auf das Wachstum von *E. amylovora* 295/93 getestet. Netzmittel dienen dem Herabsetzen der Oberflächenspannung von Flüssigkeiten, wodurch diese nicht auf der pflanzlichen Wachsschicht abperlen, sondern einen schönen Flüssigkeitsfilm bilden, wodurch die Agenzien durch ihre bessere Verteilung ihre Wirkung besser ausüben können. Beide verwendete Netzmittel, Triton X-100 (Abbildung 40) und Tween 20 (Abbildung 42), zeigen in diesen niedrigen Konzentrationen keinerlei Hemmung. Ganz im Gegenteil ist hierbei noch ein Anstieg der OD₆₀₀ zu verzeichnen, was möglicherweise auf das Mehr an Substrat für die Bakterien zurückzuführen ist, auf Grund zuvor abgestorbener Organismen. Eine erkennbare Hemmung dieser Netzmittel in Suspensionskultur ist erst in höheren Konzentrationen auszumachen und dies nach längerer Beobachtung eher bei Triton X-100 als bei Tween 20 (Abbildung 41 und 43).

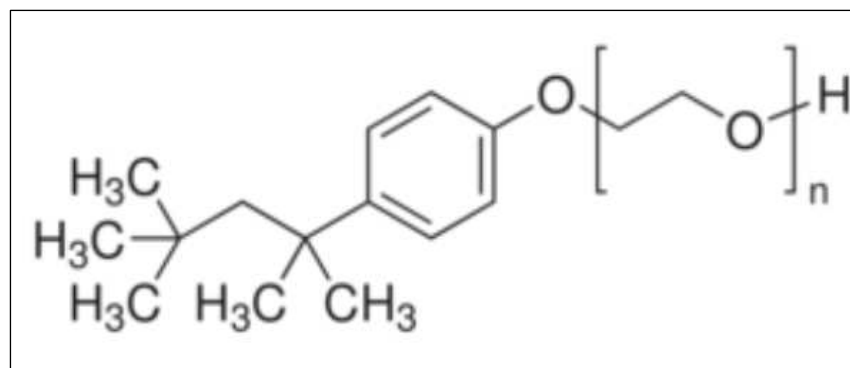


Abbildung 40: Strukturformel von Triton X-100

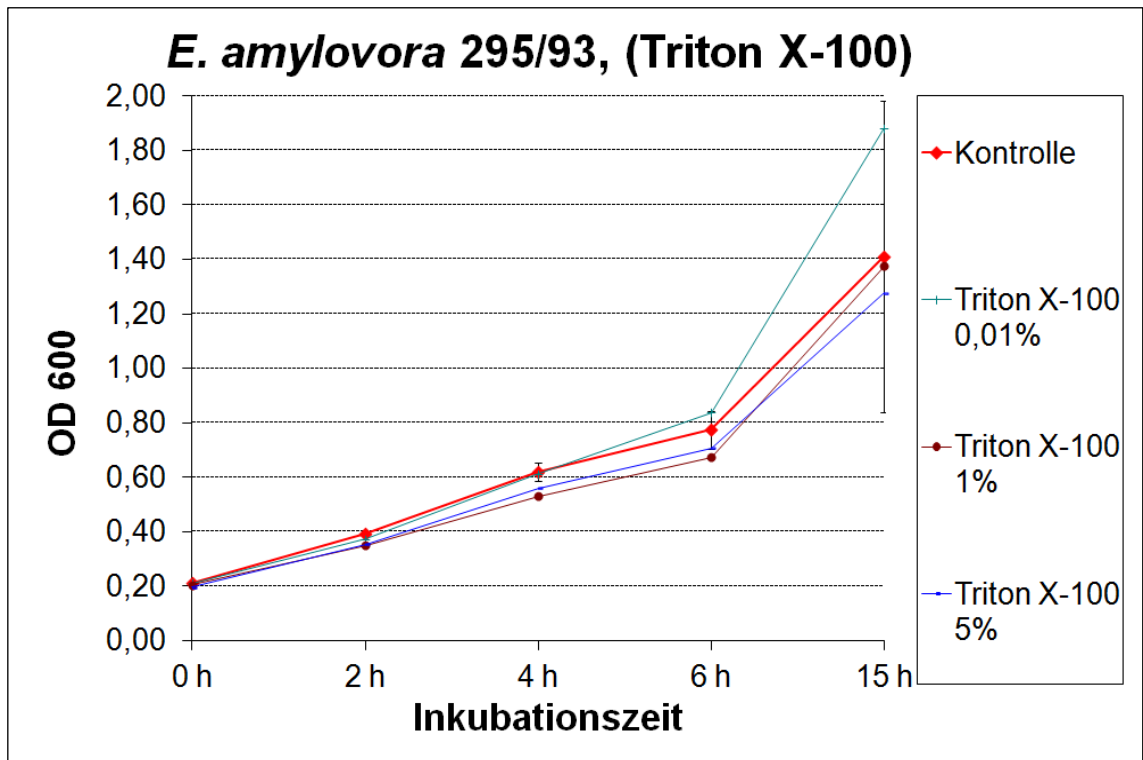


Abbildung 41: Wirkung von Triton X-100 auf das Wachstum von *E. amylovora* 295/93

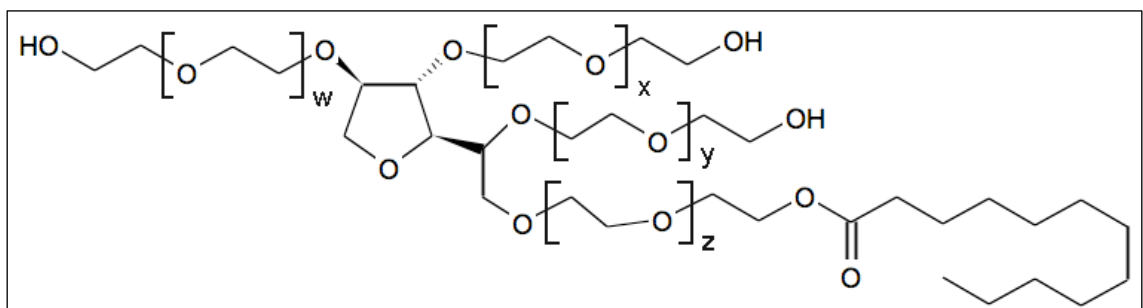


Abbildung 42: Strukturformel von Tween 20

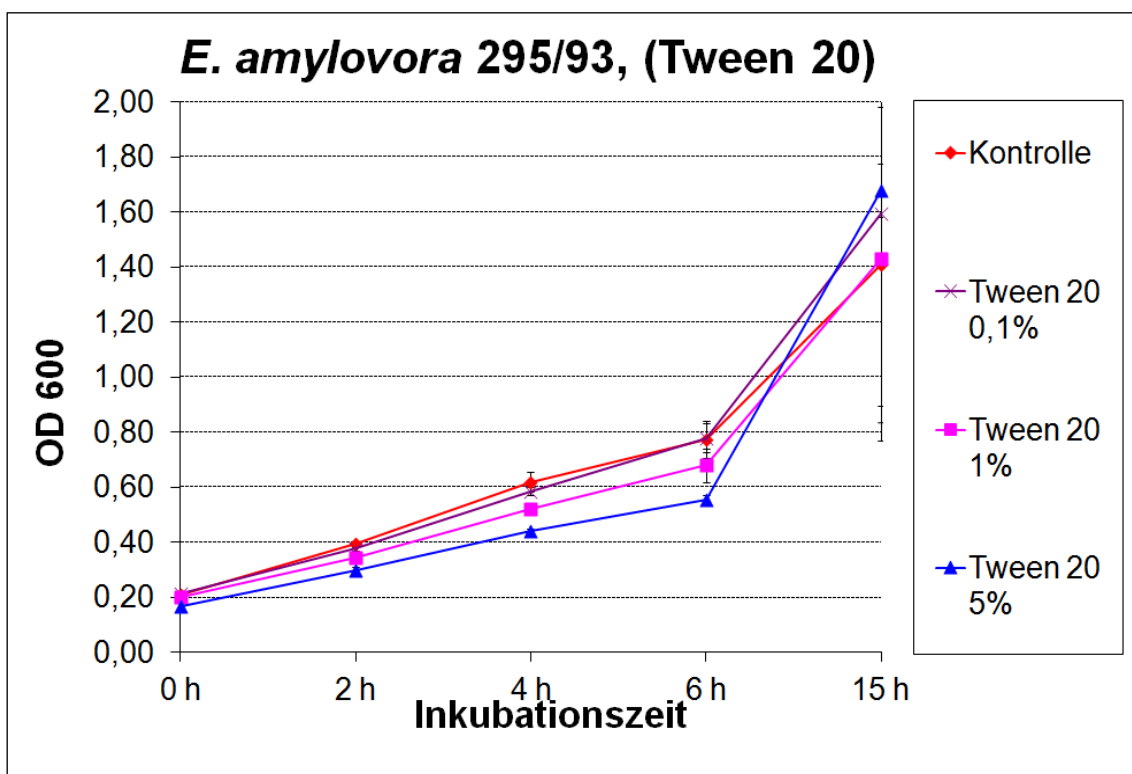


Abbildung 43: Wirksamkeit von Tween 20 auf das Wachstum von *E. amylovora* 295/93

In einem Standardtest III (siehe Punkt 3.2.2.3) mit dem Elektrolysewasser NaCl 1 und den Netzmitteln Triton X-100 und Tween 20 konnte im Küvettentest eine putativ gesteigerte Hemmung mit denselben Konzentrationen wie in Abbildung 38 erreicht werden. Bei der in Abbildung 44 dargestellten Wachstumskurve wurden 300 µl NaCl 1 eingesetzt und der Rest mit sterilem entionisiertem Wasser ergänzt. Bei der in Abbildung 45 gezeigten Wachstumskurve wurden 500 µl NaCl 1 eingesetzt und der Rest mit sterilem entionisiertem Wasser ergänzt. Obwohl es sich bei Triton X-100 wie bei Tween 20 um ein organisches Netzmittel handelt, konnten wirkungssteigernde Effekte festgestellt werden. Möglicherweise könnten die „fettlösenden“ Eigenschaften der Netzmittel die Lyse der Bakterienzellwände durch oxidative Chlorspezies begünstigen.

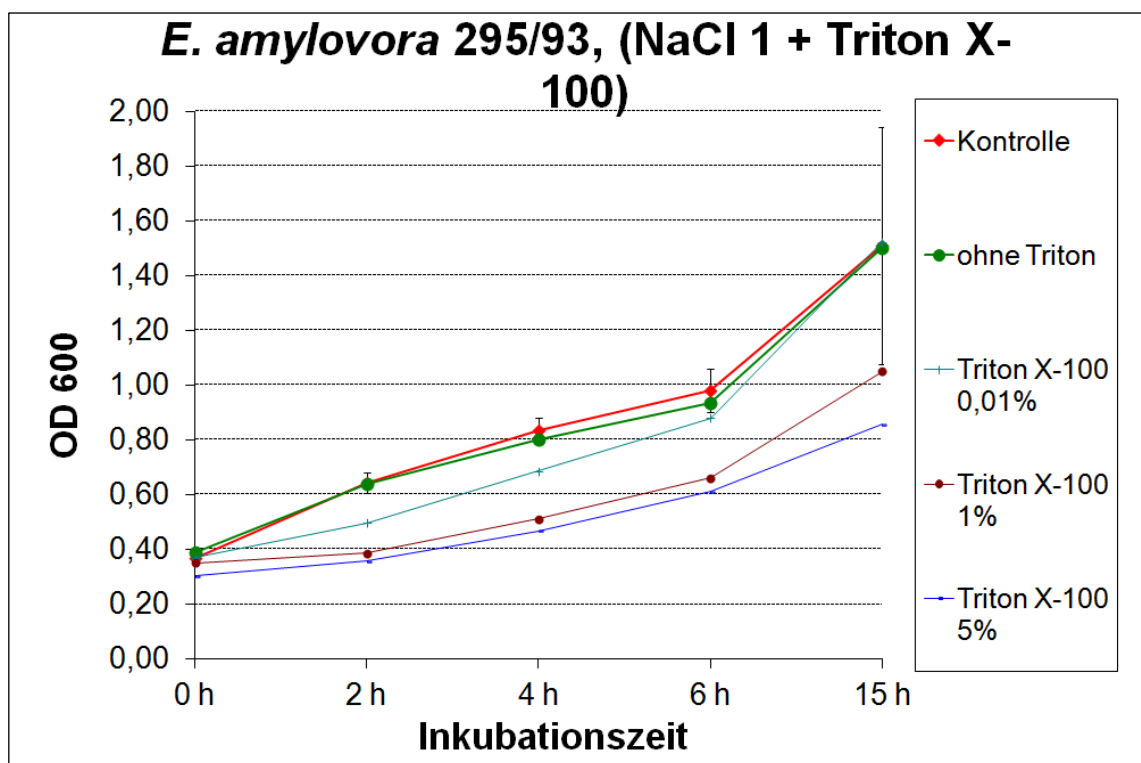


Abbildung 44: Wirksamkeit des Elektrolysewassers NaCl 1 (300 µl) mit dem Netzmittel Triton X-100 gegenüber *E. amylovora* 295/93

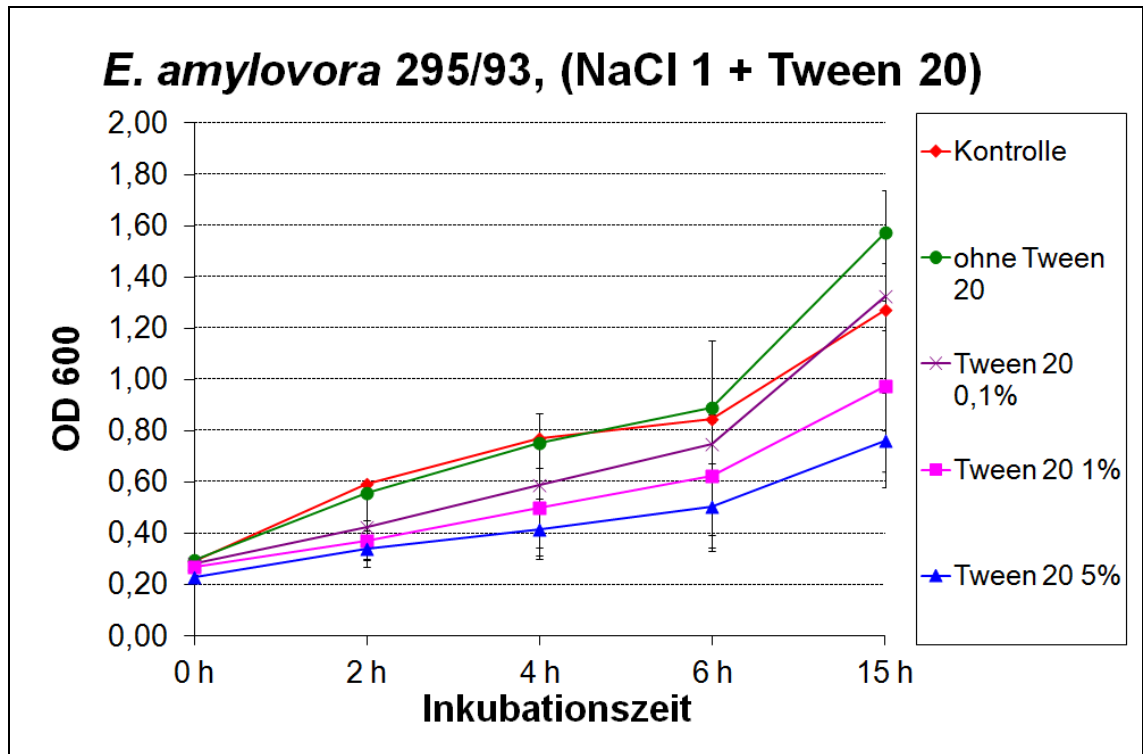


Abbildung 45: Wirksamkeit des Elektrolysewassers NaCl 1 (500 µl) mit dem Netzmittel Tween 20 gegenüber *E. amylovora* 295/93

Borax

Im Standardtest III (siehe Punkt 3.2.2.3) mit Borax konnte gezeigt werden, dass Borax in den beiden höheren Konzentrationen eine komplett wachstumshemmende Wirkung hat. Selbst die niedrigste Konzentration an Borax zeigte eine leichte Wirkung. Wurde die Boraxlösung durch die Elektrolysezelle geleitet, so konnte ebenfalls eine komplett wachstumshemmende Wirkung in den beiden höheren Konzentrationen beobachtet werden. Bei der niedrigsten Konzentration von 200 µl im 2 ml-Test konnte im Vergleich zur unbehandelten Boraxlösung ein etwas stärkerer Effekt festgestellt werden, der offensichtlich durch die oxidativen Verbindungen im Elektrolysewasser hervorgerufen wird (Abbildung 46).

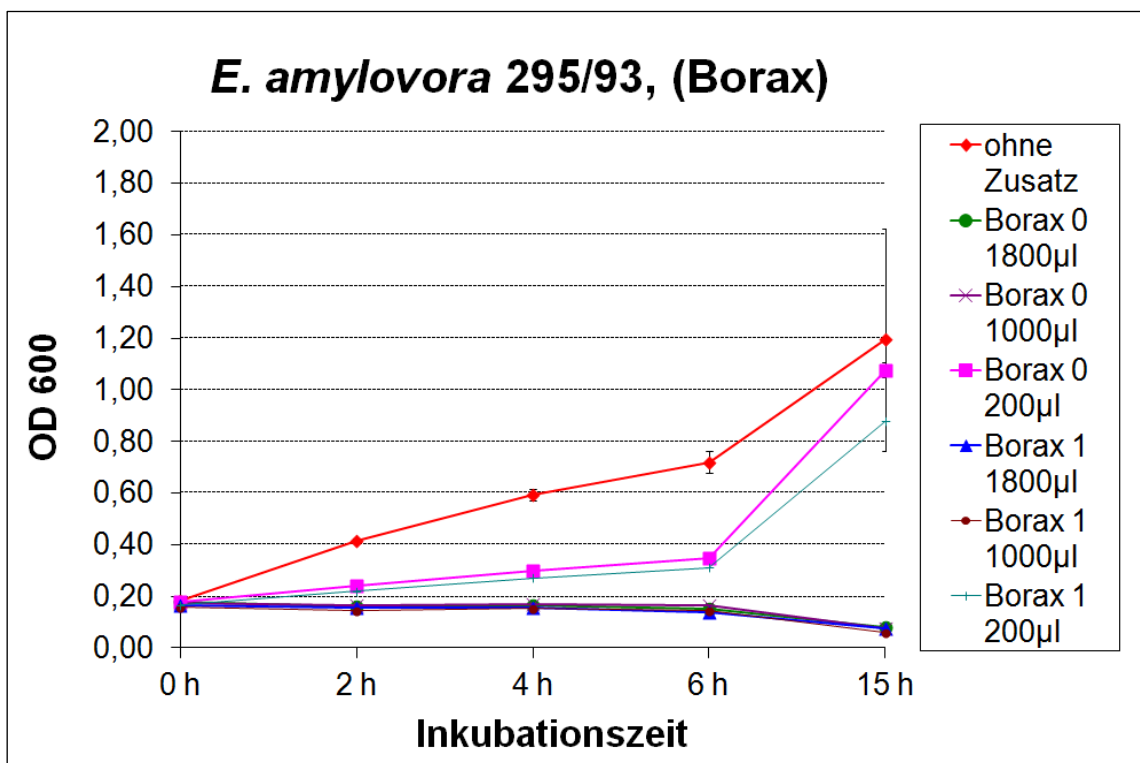


Abbildung 46: Wirkung von Borax auf das Wachstum von *E. amylovora* 295/93

4.3 Plattiertests

Die Plattiertests (siehe Punkt 3.2.3) wurden mit dem Elektrolysewasser NaCl 1 (siehe Tabelle 9) durchgeführt. Dabei sollte festgestellt werden, ob das Elektrolysewasser bakterizid oder bakteriostatisch wirkt.

4.3.1 Elektrolysewässer

Wie bei den Küvettentests ausführlich beschrieben, konnte im Standardtest III (siehe Punkt 3.2.2.3) nach Zugabe des Elektrolysewassers NaCl 1 mittels Photometer kein Bakterienwachstum mehr festgestellt werden (Abbildung 47). Aliquote aus dem Küvettentest, welche unmittelbar nach Zugabe des Elektrolysewassers (0 h), oder nach 2 bzw. 4 h nach der Zugabe in die Küvette entnommen und plattiert wurden, zeigten selbst in der minimalsten Verdünnung keinerlei Bakterienwachstum (Abbildungen 48 bis 50). Bei der Kontrolle ohne Elektrolysewasser ist hingegen ein gutes Bakterienwachstum je nach Verdünnung ersichtlich. Diese Ergebnisse – auch in Anbetracht der erhaltenen Wachstumskurve (Abbildung 47) - lassen den eindeutigen Schluss zu, dass das Elektrolysewasser NaCl 1 keine bakteriostatische, sondern eine äußerst bakterizide Wirkung gegenüber *E. amylovora* besitzt, bzw. sogar bakteriolysisch wirkt (Abnahme der OD₆₀₀ im Zeitverlauf).

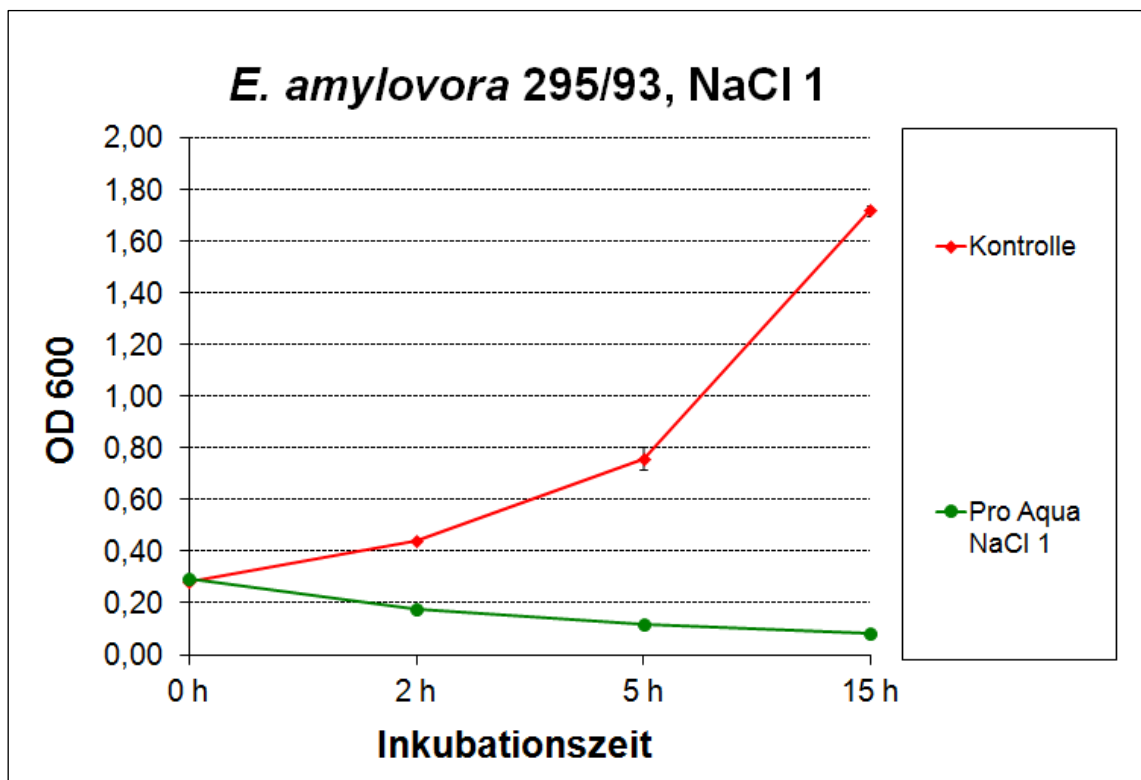


Abbildung 47: Wirkung des Elektrolysewasser NaCl 1 gegenüber *E. amylovora*

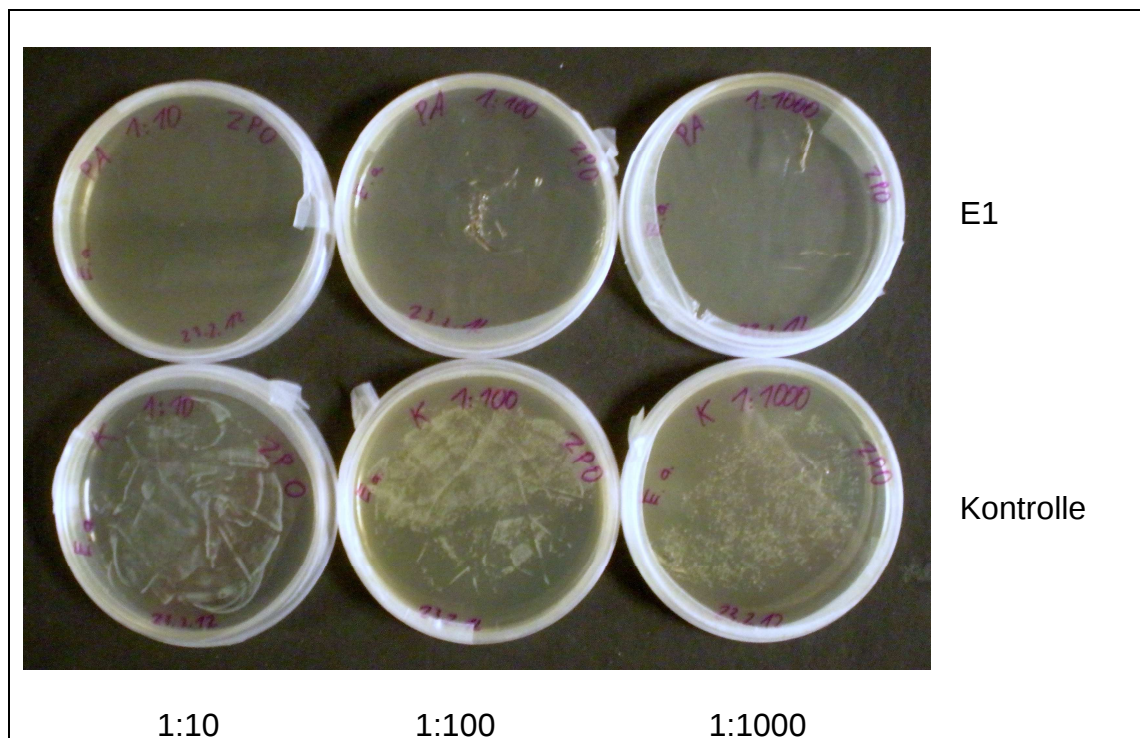


Abbildung 48: Plattierung von Aliquoten aus dem Küvettentest in verschiedenen Verdünnungen unmittelbar nach der Zugabe des Elektrolysewassers. obere Reihe: Elektrolysewasser NaCl 1, untere Reihe: Kontrolle ohne Elektrolysewasser.

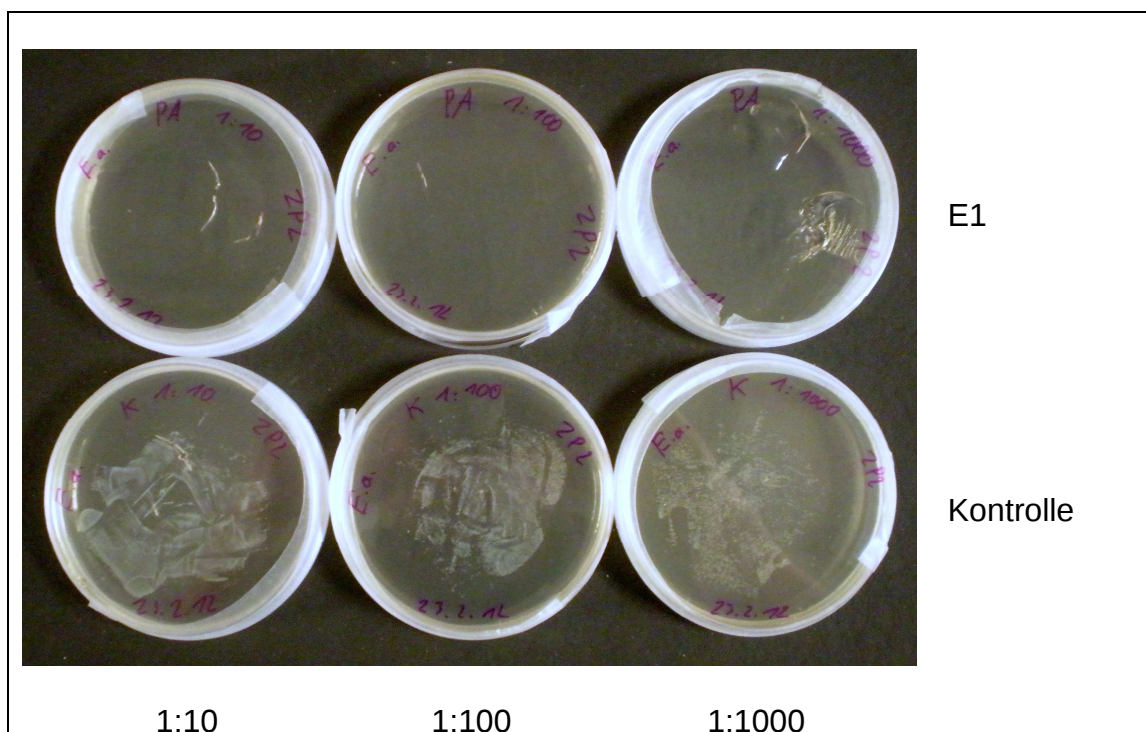


Abbildung 49: Plattierung von Aliquoten aus dem Küvettentest in verschiedenen Verdünnungen 2 h nach der Zugabe des Elektrolysewassers. obere Reihe: Elektrolysewasser NaCl 1, untere Reihe: Kontrolle ohne Elektrolysewasser.

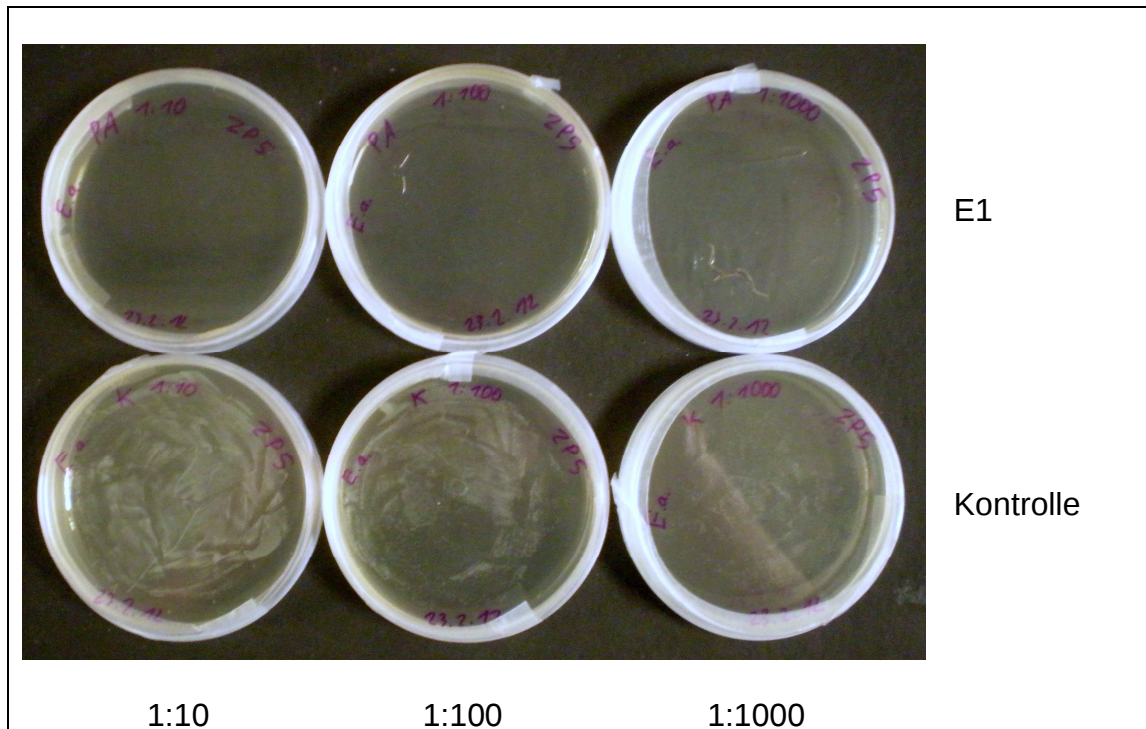


Abbildung 50: Plattierung von Aliquoten aus dem Küvettentest in verschiedenen Verdünnungen 5 h nach der Zugabe des Elektrolysewassers. obere Reihe: Elektrolysewasser NaCl 1, untere Reihe: Kontrolle ohne Elektrolysewasser.

4.4 Einzelblüten-Inokulationstests

Basierend auf den Ergebnissen der Küvettentests wurden entsprechende Einzelblüten-Inokulationstests mit Apfelblüten geplant. Bei den Einzelblütentests wurden ausschließlich Elektrolysewässer der Fa. „pro aqua“ auf ihre Wirksamkeit hin überprüft. Der Wirkungsgrad der Elektrolysewässer wurde im Vergleich zu den Kontrollen (Wasser, Streptomycin) ausgewertet.

$$\eta = (1 - (\text{Infektionsrate bei der Testsubstanz}) / (\text{Infektionsrate bei der Wasserkontrolle})) \times 100.$$

4.4.1 Elektrolysewässer im Einzelblüten-Inokulationstest

4.4.1.1 Elektrolysewasser NaCl 1 (0,3 Ah/l), Dosiseffekt

In einem ersten Versuch wurde mit dem Elektrolysewasser NaCl 1 (0,3 Ah/l) ohne Netzmittel ein Dosis abhängiger Effekt getestet. Jede Blüte wurde mit jeweils zwei Hüben á 200 µl aus dem Pumpzerstäuber in folgenden Mischverhältnissen (Elektrolysewasser+destilliertes Wasser) behandelt: 20+0 ($\eta=0$ %), 16+4 ($\eta=0$ %), 12+8 ($\eta=10$ %), 8+12 ($\eta=8$ %), 4+16 ($\eta=13$ %), Streptomycin ($\eta=98$ %). Einen Tag nach der Wirkstoffapplikation ist eine leichte Phytotoxizität an den Petalen bei den höheren Dosen an ca. 20-30 % der Blüten erkennbar (Abbildung 51). Mit diesen Varianten konnte somit kein zufrieden stellender Wirkungsgrad erzielt werden.



Abbildung 51: Phytotoxizität nach Wirkstoffapplikation

4.4.1.2 Elektrolysewasser NaCl 1 (0,3 Ah/l), pH-Effekt

Wie auch im Küvettentest wurde mit dem Elektrolysewasser NaCl 1 getestet, ob eine pH-Wert-Absenkung zu einer Wirkungssteigerung führt. Appliziert wurden je zwei Hübe á 200 µl, wobei der pH-Wert durch Zugabe von HCl und NaOH vom nativen pH-Wert von 9,7 ($\eta=23\%$), auf 8 ($\eta=13\%$), auf 7 ($\eta=8\%$) und weiter auf 5,5 ($\eta=18\%$) abgesenkt wurde. Streptomycin erreichte einen Wirkungsgrad von $\eta=98\%$. Im Vergleich zum Versuch unter Punkt 4.4.1.1 konnten mit der höchsten Konzentration (pur) bis zu 23 % Wirkungsgrad erzielt werden, wobei eine leichte Absenkung des pH-Wertes nicht wie im Küvettentest zu einer Wirkungssteigerung führte.

4.4.1.3 Elektrolysewasser NaCl 1 (0,6 Ah/l), 10 Hübe + Dosisseffekt

Um den Wirkungsgrad des Elektrolysewassers NaCl 1 aus dem Versuch unter Punkt 4.4.1.1. zu erhöhen, wurden mit Ausnahme von Streptomycin statt 2 Hübe 10 Hübe á 200 µl appliziert und der Ladungseintrag auf 0,6 Ah/l erhöht. Mit dem Pumpzerstäuber wurde in folgenden Mischverhältnissen (Elektrolysewasser+destilliertes Wasser) gesprüht: 20+0 ($\eta=78\%$), 16+4 ($\eta=81\%$), 12+8 ($\eta=64\%$), 8+12 ($\eta=56\%$), 4+16 ($\eta=39\%$), Streptomycin ($\eta=100\%$). Mit diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die Verdoppelung

des Ladungseintrages und/oder das 5-fache Applikationsvolumen mit einer massiven Steigerung des Wirkungsgrades einhergeht. Gleichmaßen stieg dosisabhängig die phytotoxische Reaktion.

4.4.1.4 Elektrolysewasser NaCl 1 (0,3 Ah/l), 10 Hübe + Dosisseffekt

Dieser Versuch ist ident mit dem Versuch unter Punkt 4.4.1.3, jedoch mit dem standardmäßigen Ladungseintrag von 0,3 Ah/l. Um Blüten zu sparen wurde das kleinste Mischverhältnis weggelassen. Mit dem Pumpzerstäuber wurde in folgenden Mischverhältnissen (Elektrolysewasser+destilliertes Wasser) aufgetragen: 20+0 ($\eta=26\%$), 16+4 ($\eta=33\%$), 12+8 ($\eta=18\%$), 8+12 ($\eta=13\%$), Streptomycin ($\eta=100\%$). Mit diesem Versuch konnte im Vergleich zum Versuch unter Punkt 4.4.1.3 gezeigt werden, dass die alleinige Anhebung des Applikationsvolumens nicht für die Steigerung des Wirkungsgrades verantwortlich ist.

4.4.1.5 Elektrolysewasser NaCl 1 (0,3 Ah/l), 10 Hübe + pH-Effekt

Dieser Versuch ist ident mit dem Versuch unter Punkt 4.4.1.2, jedoch wurde hier mit Ausnahme von Streptomycin mit 10 Hüben statt 2 Hüben á 200 μ l gearbeitet. Vom nativen pH-Wert von 9,5 ($\eta=50\%$) wurde auf 8 ($\eta=55\%$), auf 7 ($\eta=47\%$) und weiter auf 5,5 ($\eta=37\%$) abgesenkt. Streptomycin erreichte einen Wirkungsgrad von $\eta=97\%$. Wie in Versuch unter Punkt 4.4.1.2 führte eine leichte Absenkung des pH-Wertes, anders als im Küvettentest, nicht zu einer Wirkungssteigerung. Durch die Anhebung des Applikationsvolumens (10 Hübe statt 2 Hübe) konnte die Wirkung im Vergleich gesteigert werden.

4.4.1.6 Elektrolysewasser NaCl 1 (0,6 Ah/l), versch. Hubzahl

Um auch den Volumeneffekt des applizierten Wirkstoffes NaCl 1 mit einem Ladungseintrag von 0,6 Ah/l ohne Netzmittel zu überprüfen, wurden mit dem

Pumpzerstäuber 10 ($\eta=60\%$), 8 ($\eta=73\%$), 6 ($\eta=80\%$), 4 ($\eta=73\%$) und 2 HÜbe ($\eta=33\%$) á 200 μl des puren Elektrolysewassers aufgetragen. Streptomycin (2 HÜbe) erreichte einen Wirkungsgrad von $\eta=100\%$. Dieser Versuch zeigt, dass mit steigender Anzahl der HÜbe und einer damit gesteigerten Menge an „Wirkstoff“ nicht unbedingt ein höherer Wirkungsgrad zu erzielen ist. Eine Erklärung wäre, dass durch das gesteigerte Sprühvolumen bereits lebende Bakterien in den Blütenboden gewaschen werden und sich dort vermehren können. Sehr geringe Applikationsvolumina (2 HÜbe) hingegen töten zu wenige Bakterien ab, wodurch der Wirkungsgrad ebenfalls niedrig ist.

4.4.1.7 Elektrolysewasser KCl 1 (0,6 Ah/l), 10 HÜbe + Dosisseffekt

Dieser Versuch ist ident mit dem Versuch unter Punkt 4.4.1.3, jedoch wurde anstelle von NaCl das Salz KCl zur Herstellung des Elektrolysewassers verwendet. Mit dem Pumpzerstäuber wurde in folgenden Mischverhältnissen (Elektrolysewasser+destilliertes Wasser) aufgetragen: 20+0 ($\eta=55\%$), 16+4 ($\eta=63\%$), 12+8 ($\eta=55\%$), 8+12 ($\eta=28\%$), 4+16 ($\eta=25\%$), Streptomycin ($\eta=100\%$). In einem ersten Versuch konnte eine dosisabhängige phytotoxische Reaktion festgestellt werden, die allerdings etwas geringer als in der NaCl-Variante scheint, aber mangels Blüten nicht wiederholt werden konnte. Auch liegt der Wirkungsgrad der einzelnen getesteten Mischverhältnisse unter der NaCl-Variante.

4.4.1.8 Elektrolysewasser NaCl 1 (0,6 Ah/l), 10 HÜbe + Netzmittel

In diesem Versuch wurde ob des Einflusses von Netzmitteln, pur und mit NaCl 1 mit einem Ladungseintrag von (0,6 Ah/l), getestet. Es wurden wieder 10 HÜbe statt der üblichen 2 HÜbe á 200 μl aufgetragen, wobei die Streptomycin-Kontrolle auf Grund von zu wenig verfügbarer Blüten weggelassen wurde. Die verwendeten Netzmittel Triton X-100 und Tween 20 wurden zu einem Prozent, wie sie auch bei Freilandspritzungen verwendet

werden, zum reinen NaCl 1 oder destillierten Wasser zugesetzt. Getestet wurde folgendermaßen: NaCl 1 ohne Netzmittel ($\eta=65\%$), NaCl 1 mit Triton X-100 ($\eta=35\%$), NaCl 1 mit Tween 20 ($\eta=40\%$), nur Triton X-100 ($\eta=0\%$), nur Tween 20 ($\eta=0\%$). Der Wirkungsgrad des Elektrolysewassers wurde durch die beiden Netzmittel herabgesetzt. Die Netzmittel selbst – ohne Elektrolysewasser – zeigten keinerlei Wirkung. Das Netzmittel Triton X-100 zeigt bereits ohne Zugabe von Elektrolysewasser eine phytotoxische Wirkung (Abbildung 52). In den Küvettentests führten zwar sowohl Triton X-100 als auch Tween 20 zu einer Verstärkung der Wirkung der Elektrolysewässer, wobei der Effekt bei Triton X-100 stärker war (siehe Abbildung 44 und 45). Die beiden Netzmittel alleine hingegen führten nicht zu einer maßgeblichen Beeinträchtigung des Bakterienwachstums im Küvettentest (siehe Abbildung 41 und 43). Die vorliegenden Netzmittel scheinen daher für einen Praxiseinsatz nicht geeignet.



Abbildung 52: Phytotoxische Reaktion aufgrund der eingesetzten Netzmittel und des Elektrolysewassers: V.l.n.r.: Kontrolle, Elektrolysewasser pur ohne Netzmittel, Tween 20 mit destilliertem Wasser, Tween 20 mit Elektrolysewasser, Triton X-100 mit destilliertem Wasser, Triton X-100 mit Elektrolysewasser

4.4.1.9 Elektrolysewasser NaCl 1 (0,9 Ah/l), 10 Hübe + Dosisseffekt

Dieser Versuch ist ident mit dem Versuch unter Punkt 4.4.1.3, jedoch wurde, um möglicherweise einen noch höheren Wirkungsgrad zu erzielen, der Ladungseintrag auf 0,9 Ah/l erhöht. Mit dem Pumpzerstäuber wurde in folgenden Mischverhältnissen (Elektrolysewasser+destilliertes Wasser) gesprüht: 20+0 ($\eta=64\%$), 16+4 ($\eta=82\%$), Streptomycin ($\eta=100\%$). Durch die Erhöhung des Ladungseintrages konnte ein Wirkungsgrad von bis zu 82 % erzielt werden, wobei wie bereits bei anderen Varianten beobachtet, eine leichte

Verdünnung des Elektrolysewassers zu einem besseren Effekt führte. Der höhere Ladungseintrag führte in beiden NaCl-Varianten allerdings auch zu einer starken phytotoxischen Reaktion an den Petalen (Abbildung 53).



Abbildung 53: Phytotoxische Reaktion vom Elektrolysewasser NaCl 1 : V.l.n.r.: Kontrolle, Streptomycin, NaCl 1 pur

4.4.1.10 Elektrolysewasser Borax 1 (0,6 Ah/l), 10 Hübe + Dosisseffekt

Dieser Versuch ist ident mit dem Versuch unter Punkt 4.4.1.3, jedoch mit einem erhöhten Ladungseintrag von 0,9 Ah/l und dem Borax-Salz anstelle von NaCl. Mit dem Pumpzerstäuber wurde in folgenden Mischverhältnissen (Elektrolysewasser+destilliertes Wasser) gesprüht: 20+0 ($\eta=10\%$), 16+4 ($\eta=5\%$), Streptomycin ($\eta=100\%$). Das Borax-Elektrolysewasser in verschiedenen Verdünnungen führte im Einzelblütentest in der vorliegenden Formulierung nur zu einem sehr geringen Wirkungsgrad. Das applizierte Volumen an Elektrolysewasser führte nur zu einer sehr leichten phytotoxischen Reaktion im Vergleich zur Kontrolle und Streptomycin (Abbildung 54).

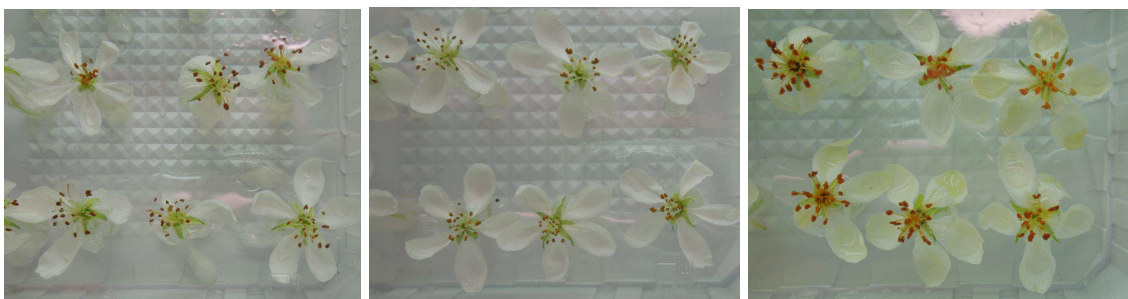


Abbildung 54: Phytotoxische Reaktion vom Elektrolysewasser Borax 1: V.l.n.r.: Kontrolle, Streptomycin, Borax 1 pur

4.5 Phyto- und Ökotoxizität von Juglon

Diese Versuche wurden nur mit Juglon durchgeführt, da der Entwicklungsstand im Vergleich zu den 3-Deoxyflavonoiden und den verschiedenen Elektrolysewässern bereits sehr weit fortgeschritten ist und das Juglon als Reinstoff als giftig (T) ausgewiesen ist. Wie in Abbildung 55 ersichtlich, liegt der Peak für den Juglon-Standard in der HPLC bei 11,44 min. Die in die HPLC eingespritzten 10 µl entsprechen einer Referenz-Konzentration von 0,87 mg Juglon/ml MeOH.

Wie aus den nachfolgenden Abbildungen ersichtlich, konnte nach 10 Tagen in keinen der mit Juglon behandelten Proben - sowohl die Pflanze selbst wie auch den Boden betreffend - Rückstände von Juglon nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass Juglon im Boden und auf dem Pflanzengewebe in kurzer Zeit ab- oder umgebaut wird, wodurch das Problem von Rückständen in Früchten oder eine Anreicherung im Boden nicht gegeben sein dürfte, zumal die beabsichtigte Aufwandmenge und -zeit (ca. 2-4 Applikationen während der Kernobstblüte) ohnehin sehr gering sind. Dies alles sind Faktoren, welche positiv für ein zukünftiges Pflanzenschutzmittel-Zulassungsverfahren zu werten sind.

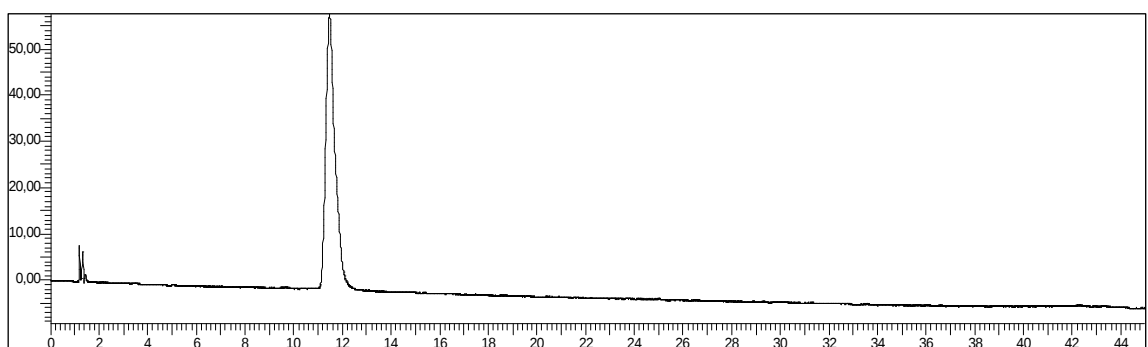


Abbildung 55: HPLC-Chromatogramm vom Juglon-Standard (11,44 min)

4.5.1 Phytotoxizität von Juglon

Auf Grund der visuellen Auswertung der mit Juglon behandelten Blüten, konnten keinerlei phytotoxische Auswirkungen festgestellt werden. Bei den mit Juglon behandelten Blüten konnte ein Fruchtansatz von 26,7 % beobachtet werden, während der Fruchtansatz bei der Kontrollbehandlung (nur die Formulierung ohne Juglon) bei 59,4 % lag. Diese Ergebnisse legen einen Einfluss von Juglon auf den Fruchtansatz nahe. Ein verringerter Fruchtansatz muss dabei allerdings nicht unbedingt negativ bewertet werden, da in der Praxis in der Regel ohnehin eine Ausdünnung des Fruchtansatzes – maschinell oder chemisch – durchgeführt werden muss. Für die Bonitur der Berostung waren die Früchte am Ende der Projektlaufzeit noch zu jung um eine adäquate Auswertung durchführen zu können.

4.5.2 Rückstandsanalytik von Juglon

Vergleicht man den Juglon-Standard in Abbildung 55 mit der HPLC-Analyse von unbehandelten (Abbildung 56) und mit Juglon-behandelten Früchten (Abbildung 57), kann behauptet werden, dass mit der verwendeten Methode keinerlei Juglon in den Früchten nachweisbar ist. Der Verzehr von Früchten, die aus Juglon-behandelten Blüten hervorgegangen sind, scheint demnach unbedenklich zu sein, zumal die Analyse bereits an jungen Früchten durchgeführt wurde.

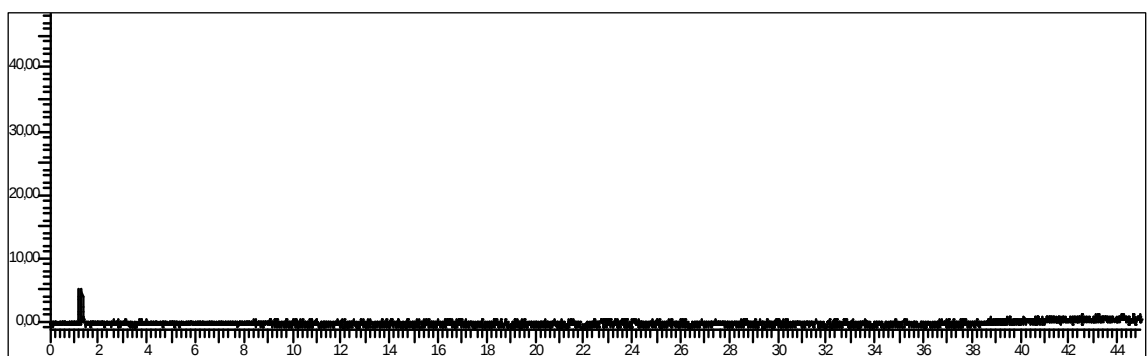


Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm von Chloroform-Extrakten aus unbehandelten Früchten

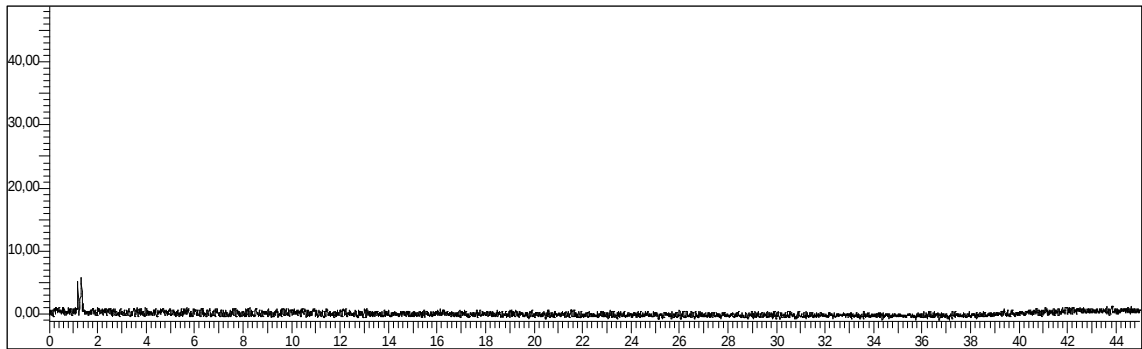


Abbildung 57: HPLC-Chromatogramm von Chloroform-Extrakten aus Früchten, die aus Juglon-behandelten Blüten hervorgegangen sind.

4.5.3 Persistenz von Juglon im Boden

Vergleicht man den Juglon Standard in Abbildung 55 mit der HPLC-Analyse der Juglon-Persistenz im Boden (Abbildung 59) bez. der Kontrolle (Abbildung 58), kann mit absoluter Sicherheit behauptet werden, dass keinerlei Rückstände – auch minimalistischer Art- im Boden nachgewiesen werden können und somit für diesen und die darin lebenden Bodenorganismen, nach einem großflächigen Einsatz von Juglon als Spritzmittel, nur eine kurzfristige Beeinträchtigung – falls überhaupt - besteht, bis das in den Boden gelangte Juglon ganzheitlich abgebaut ist.

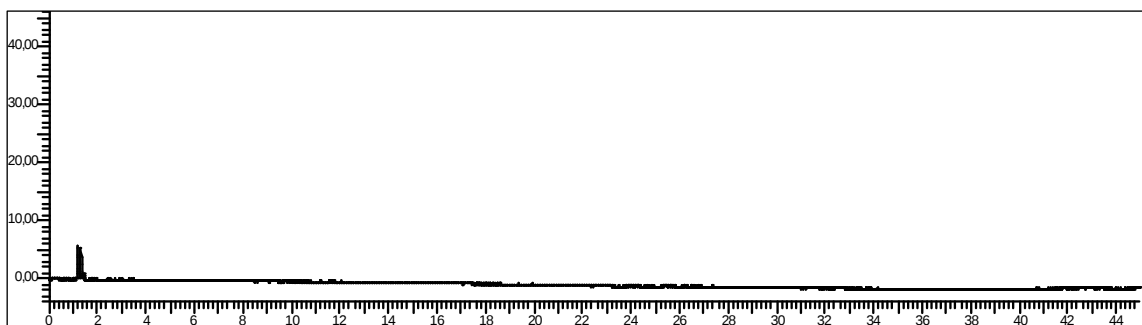


Abbildung 58: HPLC-Chromatogramm von Chloroform-Extrakten aus unbehandeltem Boden

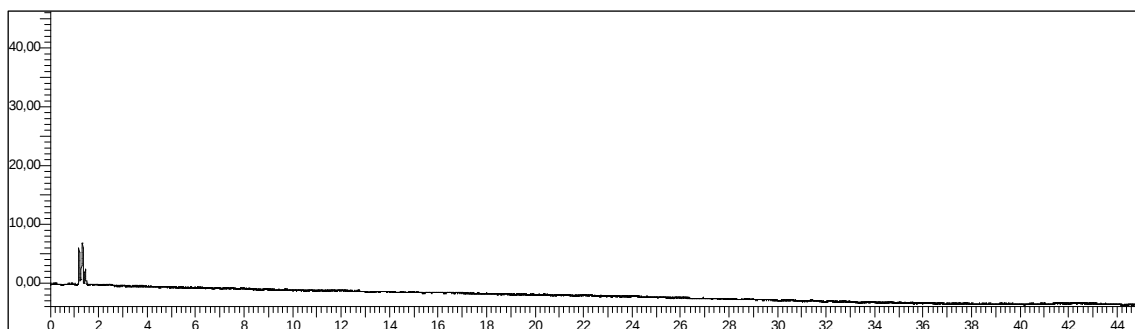


Abbildung 59: HPLC-Chromatogramm von Chloroform-Extrakten aus Boden, der mit Juglon-Lösung getränkt wurde.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

5.1 3-Deoxyflavonoide

Eine Alternative zu streptomycinhaltigen Pflanzenschutzmitteln könnten in Zukunft die 3-Deoxyflavonoide sein (RÖMMELT *et al*, 2003), (SPINELLI *et al*, 2005), hier im Speziellen das aus Naringenin oder Naringin synthetisierte Apiforol. Ein großes Problem bei der Verwendung von Apiforol ist dessen Instabilität als Molekül selbst. Daher wäre es unumgänglich, den Wirkstoff vor jeder Verwendung frisch herzustellen und direkt als Pflanzenschutzmittel einzusetzen. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Strategien bearbeitet, um den Nachteil der Instabilität zu umgehen. Die Verwendung von Naringin, das durch einen Reduktionsschritt in das stabile Zwischenprodukt Apiforol-(Di)-Glycosid umgewandelt und nachfolgend (unmittelbar vor der Anwendung als Pflanzenschutzmittel) enzymatisch zum aktiven Apiforol hydrolysiert werden sollte, wurde als mögliche Alternative weiterentwickelt. Bei der Herstellung von Apiforol-(Di)-Glykosid aus Naringin war zwar eine Extraktion mit n-Butanol wie auch mit EtOAc erfolgreich, die Extraktion mit n-Butanol verlief allerdings weitaus besser. Außerdem können zur Hydrolyse des Apiforol-(Di)-Glycosides an Stelle von Naringinase in Zukunft auch weitere β -Glykosidasen wie die Hesperidinase und das Lyseenzym aus *Trichoderma harzianum* mit der Sigma-Nummer L1412 verwendet werden, wobei diesbezüglich allerdings noch Optimierungsschritte von Nöten sind. Die Möglichkeit, dass Enzyme, die vom Pathogen *E. amylovora* selbst produziert werden, in der Lage sind, das Apiforol-(Di)-Glykosid zu hydrolysieren und sich damit bei Kontakt mit dem Mittel selber schädigen, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zur Lagerung von Apiforol über längere Zeit, zeigte das stabile Apiforol-(Di)-Glycosid keinerlei Veränderung im Zeitraum von 20 Tagen bei -20 °C bzw. Raumtemperatur. Auf Grund dieser Vorteile, speziell im Bereich der Stabilität, könnte die Synthese von Apiforol über das Zwischenprodukt Apiforol-(Di)-Glycosid zu einem erfolgreichen Pflanzenschutzmittel führen.

5.2 Juglon

Die an der TU Wien gefundene hohe Aktivität des Naturstoffs Juglon gegenüber *E. amylovora* sollte mittels Küvettentests auch für andere *Erwinia*-Arten und antagonistische Bakterien überprüft werden. Dabei zeigte sich, dass Juglon auch auf anderen Mikroorganismen hemmend wirkt, jedoch mit teilweise 100fach geringerer Wirkung. Einzig die zu *E. amylovora* nah verwandte Spezies *E. pyrifolia* aus dem asiatischen Raum zeigte eine vergleichbare MIC. Allerdings muss gesagt werden, dass nur eine kleine Auswahl an Bakterien-Spezies in der vorliegenden Arbeit getestet wurde, um prinzipiell zu klären, ob ein spezifischer oder unspezifischer Wirkmechanismus vorliegt. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit haben sowohl positive wie auch negative Konsequenzen auf den möglichen Einsatz von Juglon als zukünftiges Pflanzenschutzmittel. Einerseits werden durch die niedrigen Konzentrationen die nötig sind um *E. amylovora* zu bekämpfen und der spezifische Effekt gegen dieses Bakterium die Antagonisten verschont, welche eine Besiedlung der Pflanze durch den Feuerbranderreger *E. amylovora* erschweren. Zudem würde eine Juglonbehandlung nicht mit dem gezielten Einsatz von Antagonisten als alternatives Pflanzenschutzmittel (z.B. Blossom Protect) interferieren. Andererseits könnte die spezifische Wirkung von Juglon dessen Einsatz gegen weitere wichtige pflanzliche Bakteriosen einschränken. Somit muss die Wirkung von Juglon von Fall zu Fall für jede Bakteriose untersucht werden. Alles in allem stellt Juglon eine potentielle Alternative zu streptomycinhaltigen Präparaten dar, wobei es einerseits in der Produktion relativ einfach und günstig ist (Kostenfaktor; evtl. Extrakte aus Walnüssen), andererseits handelt es sich um ein reines Naturprodukt, welches auch für den ökologischen Obstbau von Interesse sein könnte. Bezüglich der Toxizität – Juglon als Reinstoff ist als giftig (T) eingestuft – kann festgehalten werden, dass in den Versuchen die phytotoxischen Reaktionen gering waren und keine Rückstände in den Früchten oder dem Boden nach einem Spritzmitteleinsatz von Juglon (0,5 mM) festgestellt werden konnten.

5.3 Elektrolysewässer

In den verschiedenen Testsystemen konnte mit der NaCl-Variante eine eindeutige Wirkung der Elektrolysewässer gegen das Feuerbrandbakterium *E. amylovora* festgestellt werden. Die NaCl-Elektrolysewässer waren dabei bakterizid bzw. bakteriolytisch und nicht bakteriostatisch. Die besten Wirkungsgrade im Einzelblüten-Inokulationstest lagen bei 81-82 %. Insgesamt lagen die Wirkungsgrade bei den besseren Varianten mit Elektrolysewasser etwa zwischen 55 und 70 %, wodurch für einen möglichen Praxiseinsatz noch Optimierungsbedarf besteht. Im Allgemeinen konnte eine Wirkungssteigerung durch die Erhöhung des Applikationsvolumens und des Ladungseintrags von 0,3 Ah/l auf 0,6 bzw. 0,9 Ah/l erreicht werden, dies ging allerdings mit einer gesteigerten phytotoxischen Reaktion einher. Wurde das Elektrolysewasser leicht verdünnt (z.B. 16 Teile Elektrolysewasser + 4 Teile destilliertes Wasser), so konnte oft eine bessere Wirkung als bei der unverdünnten Variante beobachtet werden. Die Absenkung des pH-Wertes, die im Küvettentest eine Verbesserung der Wirksamkeit brachte, konnte im Einzelblüten-Inokulationstest hingegen nicht bestätigt werden. Auch die Ergebnisse bezüglich der Netzmittel (Tween 20 bzw. Triton X-100) waren nicht vom Küvettentest auf den Einzelblüten-Inokulationstest übertragbar. Die Variante mit NaHCO₃ statt NaCl brachte in den verwendeten Versuchsanordnungen keine zufrieden stellenden Ergebnisse und wurde deshalb nicht weiter untersucht. Wurde statt NaCl das Salz KCl verwendet (nur 1 Versuchsreihe), konnte ebenfalls eine hemmende Wirkung festgestellt werden, die erwartete geringere Phytotoxizität müsste allerdings in weiteren Wiederholungen evaluiert werden. Auch konnte mit den Borax-Varianten ein wachstumshemmender Effekt auf das Wachstum von *E. amylovora* festgestellt werden, welcher im Küvettentest allerdings ausgeprägter war als beim Einzelblüten-Inokulationstest. Alle Ergebnisse müssen unter dem Gesichtspunkt beurteilt werden, dass versuchsbedingt unterschiedliche Chargen und (bei den Küvettentests) verschieden alte Elektrolysewässer verwendet wurden, dadurch der Gehalt und die relative Zusammensetzung der (unterschiedlich stabilen) reaktiven Chlorspezies in den einzelnen Tests variieren könnte und damit die Ergebnisse der durchgeführten

Experimente schwanken können (vgl. z.B. das minimal inhibitorische Volumen an Elektrolysewasser im Küvettentest unter Punkt 4.2.2). Dennoch konnte eindeutig eine hemmende Wirkung der Elektrolysewässer auf die Entwicklung von *E. amylovora* festgestellt und Ansätze zu einer Optimierung für zukünftige Versuche erarbeitet werden.

5.4 Ausblick

Aus der vorliegenden Arbeit kann der Schluss gezogen werden, dass alle drei getesteten Wirkstoffgruppen, die 3-Deoxyflavonoid-Derivate (Apiforol bzw. Apiforol-Diglykosid), Juglon und die Elektrolysewässer, als potentielle Alternative zu streptomycinhaltigen Präparaten im Kampf gegen den Feuerbrand in Frage kommen. Allerdings sind bei allen getesteten Substanzen noch Optimierungsschritte notwendig.

Am Erfolg versprechendsten erscheint zum jetzigen Zeitpunkt der Naturstoff Juglon, da die Forschung hier schon sehr weit fortgeschritten ist und bereits Firmen an der Weiterentwicklung Interesse zeigen.

Die Resultate mit den 3-Deoxyflavonoiden zeigen, dass noch intensive Forschungsarbeit vonnöten ist, sowohl zur optimalen Synthese, Quantifizierung, Applikation und Wirksamkeit.

Mit den diversen Elektrolysewässern konnte eine eindeutige hemmende Wirkung auf das Wachstum von *E. amylovora* in verschiedenen Testsystemen festgestellt werden. Die Ergebnisse hierzu stimmen optimistisch und sind eine wesentliche Grundlage für eine zukünftige Optimierung weiterführender Forschung darstellen.

Zusammengefasst wurden in der vorliegenden Arbeit wesentliche Ergebnisse für die Entwicklung von Alternativprodukten zu streptomycinhaltigen Präparaten im Kampf gegen den Feuerbrand zur Verfügung zu haben!

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>E. amylovora</i> ist ein peritrich begeißeltes, gram-negatives Bakterium (Quelle: http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/FireBlight.aspx).....	2
Abbildung 2: Dunkelbraun verfärbte Blätter nach einer Infektion mit <i>E. amylovora</i> (Quelle: http://www.wirtschaft.ch/Zwangsrodung+von+Birnenbaeumen+wegen+Feuerbrand/492403/detail.htm)	4
Abbildung 3: Abgesonderter Bakterien Schleim an einem mit <i>E. amylovora</i> infizierten Apfel (Quelle: http://www.fltimes.com/news/local/collection_8cb5f7fa-42af-11e1-aca7-001871e3ce6c.html)	4
Abbildung 4: Entwicklungszyklus von <i>E. amylovora</i> (Quelle: http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/FireBlight.aspx).....	6
Abbildung 5: Canker an einem verholztem Trieb (Quelle: http://www.landwirtschaft.sg.ch/home/landwirtschaftliches/Beratung/Pflanzenbau/Pflanzenschutz/Feuerbrand/_Allgemeine_Informationen.html)	6
Abbildung 6: Verbreitungsgebiete weltweit von <i>E. amylovora</i> (Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Feuerbrand)	7
Abbildung 7: Wirkung vom Naturstoff Juglon im Vergleich zum Antibiotikum Streptomycin auf das Wachstum von <i>E. amylovora</i> in Suspensionskultur	11
Abbildung 8: Wirkungsweise von Juglon in der Natur	12
Abbildung 9: Syntheseweg der 3-Deoxyflavonoide nach Behandlung der Apfelpflanze mit Prohexadion-Ca	13
Abbildung 10: Strukturformel von Naringenin	21
Abbildung 11: Strukturformel von Naringin	22
Abbildung 12: Abspaltung des Zuckers vom Apiforol-Glycosid zu Apiforol	23

Abbildung 13: Schematischer Aufbau der „pro aqua“-Diamantelektroden (Quelle: Fa. pro aqua)	29
Abbildung 14: Verschiedene Wirkungsweisen von Agenzien auf das Zellwachstum (Quelle: BROCK, 2006)	33
Abbildung 15: Arbeitsschritte der Einzelblüten-Inokulationstests.....	36
Abbildung 16: Detailaufnahme einer gesunden (links) und mit Feuerbrand befallenen (rechts) Apfelblüte aus dem Einzelblüten-Inokulationstest.....	36
Abbildung 17: Spektrum der Ober- (blau) und Unterphase (rot) nach der EtOAc- Extraktion	40
Abbildung 18: Apiforol mit EtOAc extrahiert und auf DC-Platten chromatographiert: links nach HCl-Bedampfung, rechts nach Fast Blue BB und NH ₃ -Bedampfung (Spur 1-4 und 6-9: Apiforol (5 µl, 10 µl, 20 µl und 50 µl), Spur 5 und 10: 10 µl 1 M Naringenin).....	41
Abbildung 19: Extraktionsverhalten von Apiforol-(Di)-Glykosid durch zweifache Extraktion mit mit n-Butanol bzw. EtOAc (links) und umgekehrt (rechts)..	42
Abbildung 20: Lagerung von Apiforol-(Di)-Glycosid: links: unmittelbar nach der Reduktion; Mitte: nach 8 Tagen; rechts: nach 20 Tagen (Spur 1-4, 5-8, 9- 12: RT ohne Naringinase, RT mit Naringinase, -20 °C ohne Naringinase, - 20 °C mit Naringinase)	43
Abbildung 21: DC-Chromatogramme der EtOAc-Extrakte nach Hydrolyse von Apiforol-(Di)-Glykosid durch verschiedene β -Glykosidasen. (1: Kontrolle mit Puffer, 2: Naringinase, 3: Hesperidinase 4: C1184, 5: C8546, 6: C9422, 7: L8757, 8: L1412, 9: L2524, 10: L4025) (SIGMA-Nummern: vgl. Tabelle 4)	44
Abbildung 22: Hydrolyse von Apiforol-(Di)-Gykosid durch Naringinase (Spur 1) bzw. durch lebende <i>E. amylovora</i> (Spur 3). Spur 2: Kontrolle mit Puffer statt Naringinase. Spur 4: Kontrolle mit abgekochten <i>E. amylovora</i> - Bakterien	46
Abbildung 23: MIC für <i>E. amylovora</i> 295/93 gegenüber Juglon.....	49
Abbildung 24: MIC für <i>E. amylovora</i> 763 gegenüber Juglon.....	50
Abbildung 25: MIC für <i>E. billingiae</i> 6830 gegenüber Juglon	51
Abbildung 26: MIC für <i>E. carotovora</i> NCPB 312 gegenüber Juglon.....	52

Abbildung 27: MIC für <i>E. papayae</i> 24570 gegenüber Juglon.....	53
Abbildung 28: MIC für <i>E.piriflorinigra</i> ns 5888 gegenüber Juglon	54
Abbildung 29: MIC für <i>E. pyrifoliae</i> 4171 gegenüber Juglon	55
Abbildung 30: MIC für <i>E. tasmaniensis</i> 37/10 gegenüber Juglon	56
Abbildung 31: MIC für <i>Aureobas pullulans</i> Blossom Protect gegenüber Juglon.....	57
Abbildung 32: MIC für <i>B. subtilis</i> NCTC 10315 gegenüber Juglon.....	58
Abbildung 33: MIC für <i>P. agglomerans</i> C9-1 gegenüber Juglon.....	59
Abbildung 34: MIC für <i>P. agglomerans</i> 599 gegenüber Juglon.....	60
Abbildung 35: MIC für <i>P. fluorescens</i> A506 gegenüber Juglon.....	61
Abbildung 36: Auswirkung diverser Elektrolysewässer (200 µl) auf das Wachstum von <i>E. amylovora</i>	63
Abbildung 37: Auswirkung diverser Elektrolysewässer (1800 µl) auf das Wachstum von <i>E. amylovora</i>	63
Abbildung 38: Konzentrationsabhängige Wirksamkeit des Elektrolysewassers NaCl 1 gegenüber <i>E. amylovora</i>	64
Abbildung 39: pH-Wert-abhängige Wirksamkeit des Elektrolysewassers NaCl 1 gegenüber <i>E. amylovora</i>	66
Abbildung 40: Strukturformel von Triton X-100	67
Abbildung 41: Wirkung von Triton X-100 auf das Wachstum von <i>E. amylovora</i> 295/93	68
Abbildung 42: Strukturformel von Tween 20	68
Abbildung 43: Wirksamkeit von Tween 20 auf das Wachstum von <i>E. amylovora</i> 295/93	69
Abbildung 44: Wirksamkeit des Elektrolysewassers NaCl 1 (300 µl) mit dem Netzmittel Triton X-100 gegenüber <i>E. amylovora</i> 295/93	70
Abbildung 45: Wirksamkeit des Elektrolysewassers NaCl 1 (500 µl) mit dem Netzmittel Tween 20 gegenüber <i>E. amylovora</i> 295/93	71
Abbildung 46: Wirkung von Borax auf das Wachstum von <i>E. amylovora</i> 295/93	72
Abbildung 47: Wirkung des Elektrolysewasser NaCl 1 gegenüber <i>E. amylovora</i>	74

Abbildung 48: Plattierung von Aliquoten aus dem Küvettentest in verschiedenen Verdünnungen unmittelbar nach der Zugabe des Elektrolysewassers. obere Reihe: Elektrolysewasser NaCl 1, untere Reihe: Kontrolle ohne Elektrolysewasser.....	75
Abbildung 49: Plattierung von Aliquoten aus dem Küvettentest in verschiedenen Verdünnungen 2 h nach der Zugabe des Elektrolysewassers. obere Reihe: Elektrolysewasser NaCl 1, untere Reihe: Kontrolle ohne Elektrolysewasser.....	75
Abbildung 50: Plattierung von Aliquoten aus dem Küvettentest in verschiedenen Verdünnungen 5 h nach der Zugabe des Elektrolysewassers. obere Reihe: Elektrolysewasser NaCl 1, untere Reihe: Kontrolle ohne Elektrolysewasser.....	76
Abbildung 51: Phytotoxizität nach Wirkstoffapplikation	78
Abbildung 52: Phytotoxische Reaktion aufgrund der eingesetzten Netzmittel und des Elektrolysewassers: V.l.n.r.: Kontrolle, Elektrolysewasser pur ohne Netzmittel, Tween 20 mit destilliertem Wasser, Tween 20 mit Elektrolysewasser, Triton X-100 mit destilliertem Wasser, Triton X-100 mit Elektrolysewasser.....	81
Abbildung 53: Phytotoxische Reaktion vom Elektrolysewasser NaCl 1 : V.l.n.r.: Kontrolle, Streptomycin, NaCl 1 pur	82
Abbildung 54: Phytotoxische Reaktion vom Elektrolysewasser Borax 1: V.l.n.r.: Kontrolle, Streptomycin, Borax 1 pur	82
Abbildung 55: HPLC-Chromatogramm vom Juglon-Standard (11,44 min)	83
Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm von Chloroform-Extrakten aus unbehandelten Früchten.....	84
Abbildung 57: HPLC-Chromatogramm von Chloroform-Extrakten aus Früchten, die aus Juglon-behandelten Blüten hervorgegangen sind.....	85
Abbildung 58: HPLC-Chromatogramm von Chloroform-Extrakten aus unbehandeltem Boden	85
Abbildung 59: HPLC-Chromatogramm von Chloroform-Extrakten aus Boden, der mit Juglon-Lösung getränkt wurde.	86

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme	16
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 3: Verwendete Geräte und Einrichtungen	20
Tabelle 4: Getestete Enzyme zur Zuckerabspaltung vom Apiforol-(Di)-Glycosid	24
Tabelle 5: Juglon-Stammlösungen.....	25
Tabelle 6: Mischtablette I für bestimmte Endkonzentrationen in der Küvette	26
Tabelle 7: Mischtablette II für bestimmte Endkonzentrationen in der Küvette	26
Tabelle 8: Mischtablette III für bestimmte Endkonzentrationen in der Küvette ...	27
Tabelle 9: Standard-Parameter zur Herstellung der Elektrolysewässer	30
Tabelle 10: Zusammenfassung der MICs von Juglon gegenüber verschiedener Organismen	62

7 Literaturverzeichnis

ACW – Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil (2010) Schweizerische Zeitschrift für Obst- und Weinbau. 12. Internationaler Feuerbrand-Workshop 22/10

AGES - Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (2009) Gesamtheitliche Strategie zur Bekämpfung des Feuerbrandes in Österreich 2009-2013

ARGE Streuobst (2007) Streuobst-Info 2/2007

BBA – Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin und Braunschweig (2003) Eine Gefährdung für den Streuobstbau: Der Feuerbrand

Billing E (1974) The effect of temperature on the growth of the fireblight pathogen, *Erwinia amylovora*. Journal of Applied Microbiology 37/4 (643-648)

Brock T, Madigen T, Martinko J (2006) Brock Mikrobiologie. Pearson Studium. 11. Aufl. dt. 20.2.1

Denning W (1794) On the decay of apple trees. New York Society for the Promotion of Agricultural Arts and Manufacturers Transaction 2: 219-222

Fischer T, Gosch C, Mirbeth B, Gselmann M, Thallmair V, Stich K (2012) Juglone (5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) has a strong and specific bactericidal effect on the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60: 12074–12081 (eingereicht)

Fischer T, Gosch C, Stich K (2010) Pflanzenschutzmittel. Austrian patent AT 09 501 B1 2012-06-15, International patent application PCT/AT2011/000092. Austria: Vienna University of Technology

Gosch C, Fischer T, Stich K, Persen U, Reisenzein H, Moosbeckhofer R, Oberlerchner J (2009) Ambitionierte Forschung in Sachen Feuerbrand: Entwicklung neuer Wirkstoffe und eines schnelleren Nachweisverfahrens. Besseres Obst 5/2009

Gosch C, Gottsberger A, Stich K, Fischer T (2012a) Blue ^{Ea}LAMP - a specific and sensitive method for visual detection of genomic *Erwinia amylovora* DNA. European Journal of Plant Pathology. DOI 10.1007/s10658-012-0059-5

Gosch C, Fischer T, Stich K (2012b): Juglon gegen Feuerbrand – Erste Erfahrungen stimmen positiv Obstbau, Weinbau 2/2012: 63-66

Gottsberger A (2010) Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. Letters in Applied Microbiology 51: 285-292

Moradi A, Nasiri J, Abdollahi H, Almasi M (2012) Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Erwinia amylovora* based on chromosomal DNA. European Journal of Plant Pathology, 2, 1-12

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Oxford University Press 28(12): e63 1-7

Pirc M, Ravnkar M, Tomlinson J, Dreo T (2009) Improved fireblight diagnostics using quantitative real-time PCR detection of *Erwinia amylovora* chromosomal DNA. Plant Pathology 58: 872-881

Prize 2010 (2010), Umweltverträgliche Bakterizide gegen den Feuerbranderreger und andere pflanzenpathogene *Erwinia*-Spezies. aws-gefördertes Projekt Z100355.

Römmelt S, Zimmermann N, Rademacher W, Treutter D (2003) Formation of novel flavonoids in apple (*Malus x domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry* 64: 709-716

Spinelli F, Speakman J, Rademacher W, Halbwirth H, Stich K, Costa G (2005) Luteoforol, a flavan 4-ol, is induced in pome fruits by prohexadione-calcium and shows phytoalexin-like properties against *Erwinia amylovora* and other plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 112: 133-142

Stich K, Forkmann G (1987) Biosynthesis of 3-deoxyanthocyanins with flower extracts from *Sinningia cardinalis*. *Phytochemistry* (1988) 27(3): 785-789

Stich K, Fischer T, Gosch C, Halbwirth H (2011) Verfahren zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen bei einer Pflanze. Austrian patent application, A526/2011. Austria: Vienna University of Technology.

Temple N & Johnson B (2011). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Erwinia amylovora* on pear and apple fruit flowers. *Plant Disease* 95: 423-430

Vanneste J (2000) The Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing

8 Publikationsliste

Publikationen die aus vorliegender Arbeit hervorgegangen sind:

Fischer T, Gosch C, Mirbeth B, Gselmann M, Veronika Thallmair, Stich K (2012) Potent and Specific Bactericidal Effect of Juglone (5-Hydroxy-1,4-naphthoquinone) on the Fire Blight Pathogen *Erwinia amylovora*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60: 12074–12081

Gosch C, Stich K, Fischer T, Gselmann M (2012) Entwicklung von neuen, umweltverträglichen Bakteriziden zur Bekämpfung von *E. amylovora* als Alternative zu Streptomycin. Feuerbrand Round Table, AGES, 11.1.2012

9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit bestätige ich, Markus Gselmann, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Wien, im April 2013

Markus Gselmann

10 Lebenslauf

Angaben zur Person

Nachname(n)/ Vorname(n)

Adresse(n)

Telefon

Fax

e-mail

Staatsangehörigkeit

Geburtsdatum

Geschlecht

Berufserfahrung

Daten

Schul- und Berufsbildung

Daten



Gselmann Markus

*Badenerstraße 17, 2486 Landegg,
Österreich*

0664/7880888

-

markus.werner@aon.at

Österreich

13.12.1984

männlich

*2000-2005 Erntehelfer im RLH
Ebreichsdorf*

*2004-2011 LKW-Chauffeur Firma
FrankStahl in Guntramsdorf*

*2007-laufend Gartengestalter Firma
Mozelt in Zillingdorf/Bergwerk*

*2010-2013 Snowboardlehrer Skischule
Krainer in Bad Kleinkirchheim*

1988-1991 Kindergarten Pottendorf

1991-1995 VS Pottendorf

1995-2003 BRG Gröhrmühlgasse Wr.

Persönliche Fähigkeiten und Kompetenzen

Muttersprache(n)

Neustadt

2003-2004 Grundwehrdienst

*2004-2005 Medizinische Universität
Wien*

*2005-2013 Hauptuniversität Wien,
Diplomstudium Biologie*

*2008-2010 Miliz beim ÖBH, ABC-
Abweherschule Korneuburg*

Deutsch

Sonstige Sprachen(n)

Englisch, Latein

Soziale Fähigkeiten und Kompetenzen

*Rettungssanitäter seit 2004,
Feuerwehr-Atemschutzträger seit
2003, AFDRU Grundkurs*

*Sonstige Fähigkeiten und
Kompetenzen*

*Staatlicher Snowboardinstruktor,
Tauchschein PADI, Klettersteig und
Felskletternkurs*

Führerschein(e)

ABCE