



**Kupferersatz im ökologischen Weinbau:
Entwicklung und Anwendung neuer
Formulierungs- und Produktionstechnologien
für den praxisgerechten Einsatz
bakterieller Antagonisten**

Herausgeberin:

Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau
in der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE)

Ferdinand-Lassalle-Straße 1-5, 53175 Bonn

Tel.: +49 228 6845-280 (Zentrale)

Fax: +49 228 6845-787

E-Mail: geschaeftsstelle-oekolandbau@ble.de

Internet: www.bundesprogramm-oekolandbau.de

Finanziert vom Bundesministerium für
Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft
im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau

Auftragnehmer:

Fachgebiet Phytomedizin, Institut für Biologie der
Forschungsanstalt Geisenheim

Dieses Dokument ist über <http://forschung.oekolandbau.de> verfügbar.



SCHLUSSBERICHT

Vertragspartner:

Forschungsanstalt Geisenheim
Von-Lade-Strasse 1
D – 65366 Geisenheim/Rhein

Ausführende Stelle:

Fachgebiet Phytomedizin, Institut für Biologie
Koordination: Prof. Dr. Beate Berkelmann-Löhnertz

Forschungsprojekt Nr. 514 – 43.10/02OE190

Kupferersatz im ökologischen Weinbau: Entwicklung und Anwendung neuer Formulierungs- und Produktionstechnologien für den praxismgerechten Einsatz bakterieller Antagonisten

Laufzeit: 01. September 2002 bis 31. Oktober 2003
Berichtszeitraum: 01. September 2002 bis 31. Oktober 2003

Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

Partner 1:

Universität Göttingen
Institut für Pflanzenpathologie und
Pflanzenschutz
Grisebachstr. 6
D – 37077 Göttingen
Projektbeteiligter: Prof. Dr. G.A. Wolf

Partner 2:

FZB Biotechnik
GmbH
Glienicke Weg 185
D – 12489 Berlin
Projektbeteiligter: Dr. H. Junge

Partner 3:

Staatliche Lehr- und
Versuchsanstalt für Obst- und
Weinbau
Traubenplatz 5
D – 74189 Weinsberg
Projektbeteiligter: Dr. W.K. Kast

1. Ziele und Aufgabenstellung des Projekts, Darstellung des mit der Fragestellung verbundenen Entscheidungshilfe-/Beratungsbedarfs im BMVEL

Die Bekämpfung der Rebenperonospora gehört weltweit ein größten Problemen bei der Produktion von Kelter- und Tafeltrauben (Falscher Mehltau; *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. & de Toni); im folgenden: *P. viticola* oder Peronospora). Um die Befallsstärke möglichst gering zu halten und damit eine gute Traubenqualität zu sichern, wird im ökologischen Weinbau in erster Linie Kupfer eingesetzt. Kupferapplikationen sind aber aus vielerlei Hinsicht negativ zu bewerten. Dabei stehen ökotoxikologische Aspekte im Vordergrund. Neben der generellen Kupferwirkung gegen den Schadpilz sind aber auch allgemeine phytosanitäre Effekte z.T. erwünscht (z.B. in Form einer Kupferabschlussbehandlung).

Vor allem in Jahren mit hohem Befallsdruck, wie in 1997, 2000, 2001 und 2002, bedarf es zur Regulierung dieses Schadpilzes schlagkräftiger alternativer Konzepte, die ohne Kupfer auskommen. Aus diesem Grunde ist das Gesamtziel des Vorhabens die praxisgerechte Einarbeitung der Applikation bakterieller Antagonisten gegen den Erreger des Falschen Mehltaus der Rebe in ein vorhandenes Bekämpfungskonzept des ökologischen Weinbaus („Öko-Standard“), welches alle anderen Schaderreger der Rebe berücksichtigt. Damit soll der ökologisch wirtschaftenden weinbaulichen Praxis eine wirkungsvolle und ökonomisch interessante Alternative zum Ersatz von Kupfer zur Verfügung gestellt werden.

Die im Projekt bearbeitete Thematik bezieht sich auf den Themenbereich „Status Quo Analysen und Erarbeitung von Strategien zur Lösung bestehender Probleme zum Pflanzenschutz (einschl. Vorratsschutz) im ökologischen Landbau sowie bei der ökologischen Saat- und Pflanzguterzeugung“.

Seitens des BMVEL besteht besonderer **Beratungs- und Entscheidungshilfebedarf bei der Erarbeitung von Ansätzen für erfolgversprechende Strategien zum Ersatz von Kupfer insbesondere zur Regulierung von Pilzkrankheiten im ökologischen Landbau.**

Aufgrund fehlender Alternativen stellen Kupferapplikationen leider noch immer das Hauptinstrument dar, um die Rebenperonospora im ökologischen Weinbau zu bekämpfen. Somit treffen die o.g. Programminhalte auf das Pathosystem *Vitis vinifera/Plasmopara viticola* in besonderem Maße zu.

1.1 Planung und Ablauf des Projektes

Das Projekt wurde in drei Projektphasen unterteilt. In der **ersten Projektphase** wurden bereits vorhandene bakterielle Antagonisten im Blattscheibentest sowie an Topfreben unter Gewächshausbedingungen auf ihre biologische Wirkung gegenüber *P. viticola* untersucht. Im nächsten Schritt wurde die großtechnische Fermentation aussichtsreicher Kandidaten sowie deren Formulierung für die Applikation im Freiland optimiert. In der **zweiten Projektphase** wurden die Antagonisten (integriert in das Bekämpfungskonzept „Öko-Standard“) an zwei unterschiedlichen Standorten (Geisenheim, Weinsberg) auf ökologisch bewirtschafteten Weinbergen appliziert. Das Lesegut wurde nach der Mostanalytik zur Vinifikation an die Versuchskeller der beiden Forschungseinrichtungen weitergegeben. Da die Ergebnisse zur Weinanalytik und zur Sensorik erst im Frühjahr 2004 vorliegen, wurde vereinbart, diese nachzureichen. In der **dritten Projektphase** fand der Technologie- und Wissenstransfer statt. Aufgrund des extrem trockenen und heißen Sommers 2003 war der Befall mit *P. viticola* so gering, dass eine Bewertung der unterschiedlichen Behandlungen nicht möglich war. Da den ökologisch wirtschaftenden Winzern somit keine Ergebnisse aus der Praxis mitgeteilt werden konnten, wurde der Umfang des Projektteils „Technologie- und Wissenstransfer“ entsprechend reduziert.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der Stand der Forschung im Bereich Kupferersatz/Kupferreduzierung wurde von der Projekt-Koordinatorin im Rahmen des Eröffnungsvortrags zum internationalen Symposium „EcoFruVit“ im Jahr 2002 umfassend dargelegt (vgl. 10th International Conference on Cultivation Techniques and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture, Weinsberg, 4. und 7. Februar 2002).

Nach wie vor existieren zur Bekämpfung der Rebenperonospora im Bereich Kupferersatz keine praxistauglichen Konzepte. Dies betrifft alle vier Bereiche der möglichen Alternativen zum Kupfereinsatz und/oder deren Mischung: (i) Antagonisten, (ii) Pflanzen- oder Algenextrakte, (iii) Induzierte Resistenz, (iv) antifungische Substanzen. Insbesondere vor dem Hintergrund der dramatischen

Befallssituationen der letzten Jahre sind Alternativ-Strategien mit Wirkungsgraden von 50 bis 60 % völlig unzureichend (vgl. Proceedings der EcoFruVit 2002).

Auf der Basis des Einsatzes bakterieller Antagonisten sind die Voraussetzungen für die Entwicklung einer praxistauglichen Bekämpfungsstrategie am ehesten gegeben, da die Kriterien zur Charakterisierung der Produktqualität im Falle dieses Bekämpfungskonzeptes schon jetzt zu einem hohen Prozentsatz positiv zu bewerten sind bzw. im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens weiter optimiert wurden. Diese betreffen die Bereiche Ökonomie, Ökologie, Ökobilanz, Gesundheit, Technologie sowie gesellschaftlicher Nutzen.

Die Basis für die im Rahmen dieses Vorhabens ausgewählte Kupferersatz-Strategie wurde Anfang der 90er Jahre gelegt. In Kooperation mit der Universität Göttingen wurde an der Forschungsanstalt Geisenheim eine Promotionsarbeit durchgeführt, die sich mit dem Einsatz bakterieller Antagonisten gegen *P. viticola* befasst hat. Die hierbei selektierten und getesteten Bakterien bildeten die Grundlage für das vorliegende Projekt. **Neben einer sehr guten protektiven Wirkung (80 bis 90 % Wirkungsgrad im Freilandversuch) und leichten kurativen Effekten war im Rahmen der Promotionsarbeit nur folgende Schwachstellen zu verzeichnen: die Formulierung der Bakterien sowie die Bereitstellung großer Mengen der antagonistisch wirksamen Isolate. Daraus resultierten wiederum technische Probleme bei der Applikation der Substanzen unter Praxisbedingungen. Somit sollte sich das hier zugrundeliegende Projekt in erster Linie mit diesen drei Aspekten befassen.**

2. Material und Methoden

Selektion der bakteriellen Antagonisten

Aus vorhandenen Stammsammlungen wurden insgesamt 54 bakterielle Antagonisten ausgewählt, die den Gattungen *Pseudomonas* spp. sowie *Bacillus* spp. angehörten. Die Isolate wurden im Rahmen vorheriger Untersuchungen von der Rebphylloplane bzw. aus ackerbaulich genutzten Böden isoliert. Sie stammten aus der Forschungsanstalt Geisenheim, der Georg-August-Universität Göttingen, der FZB

Biotechnik in Berlin bzw. aus dem „Institut für Biologische Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten“ der Biologischen Bundesanstalt in Darmstadt.

Die Bakterien-Isolate wurden auf TSA bei einer Temperatur von 20 °C kultiviert (Tryptic Soy Agar; Bestandteile: Tryptic Soy Broth 20 g, Agar-Agar 15 g, dest. Wasser 1000 ml; pH 6.5 – 7; das Medium wurde bei 121 °C für 20 Min. autoklaviert). Für die langfristige Lagerung wurden die Bakterien auf TSA bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt.

Kultivierung von Pythium ultimum und Phytophthora infestans

Zur Durchführung der Dual-Kultur-Tests *in vitro* wurden Verwandte des Zielorganismus *P. viticola* ausgewählt, die in der Lage sind, auf Nährmedien zu wachsen: *Pythium ultimum* und *Phytophthora infestans*.

Pythium ultimum wurde auf Mais-Extrakt-Medium bei einer Temperatur von 20 °C kultiviert. Zur Zubereitung des Mediums wurden 10 g Mais-Schrot in 200 ml dest. Wasser für 90 Min. gekocht. Das Filtrat wurde auf 1000 ml aufgefüllt und 5 g Glucose-Monohydrat sowie 10 g Agar-Agar zugesetzt. Der pH-Wert wurde auf pH 5,5 eingestellt. Das Medium wurde bei 121 °C für 20 Min. autoklaviert.

Phytophthora infestans wurde auf Erbsen-Agar bei einer Temperatur von 20°C kultiviert. Zur Zubereitung des Mediums wurden 200 g gefrorene Erbsen (Tiefkühlkost) in 1000 ml Leitungswasser für 45 Min. gekocht. Das Filtrat wurde nach dem Kochen mit Leitungswasser auf 1000 ml aufgefüllt und mit 6 g Glucose-Monohydrat sowie 20 g Agar-Agar gemischt. Der pH-Wert wurde auf pH 7 eingestellt. Das Medium wurde bei 121 °C für 20 Min. autoklaviert.

Dual-Kultur-Test

In einem ersten Screening wurde die antimykotische Wirkung der bakteriellen Antagonisten im Dual-Kultur-Test mit *Pythium ultimum* and *Phytophthora infestans* überprüft. Die zu testenden Bakterien wurden strichförmig in die Petrischalen-Mitte aufgeimpft. Als Nährmedium kam im Falle von *Pythium ultimum* TSA zum Einsatz; die Wirkung gegen *Phytophthora infestans* wurde auf MA überprüft.

An beiden Seiten des Impfstrichs wurde jeweils eine ausgestanzte, pilzbewachsene Agar-Scheibe (Durchmesser 4 mm) platziert. Die Agar-Scheibe wurde umgedreht auf den Nährboden gelegt und hatte vom Impfstrich einen Abstand von 2 cm. Als

Kontrollplatten dienten Petrischalen, die ausschließlich mit zwei pilzbewachsenen Agarscheiben belegt wurden. Die inokulierten Platten wurden bei 20 °C im Dunkeln inkubiert. Im Falle von *P. ultimum* wurde nach 2 und 7 Tagen ausgewertet; bei *P. infestans* erfolgte die Auswertung jeweils später, am 7. und 12. Tag. Diese Versuche wurden viermal wiederholt. Bakterien-Isolate, die sich durch eine starke Hemmwirkung auszeichneten, wurden für die weiteren Versuche mit dem Zielorganismus *P. viticola* ausgewählt.

Anzucht der Topfreben im Gewächshaus

Im Frühjahr des aktuellen Jahres wurden einjährige Rebruten der Sorten cv. Müller Thurgau und cv. Riesling geschnitten und als Zwei-Augen-Stecklinge zugeschnitten. Anschließend wurden die Stecklinge für 24 Stunden in 0,5 %iger Chinosol-Lösung desinfiziert, in Folienbeutel luftdicht verpackt und bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

Für die Anzucht der Versuchspflanzen wurden die eingelagerten Stecklinge zunächst für 4 Stunden gewässert. Anschließend wurden die Hölzer an beiden Enden um ca. 1 cm eingekürzt und das untere der beiden Nodien geblendet. Die so vorbereiteten Stecklinge wurden schräg in ein Substratgemisch (50 % Perlite, 50 % Einheitserde P) gesteckt, wobei das nicht geblendete Nodium direkt auf dem Substrat auflag, um eine Austrocknung zu verhindern. Nach ca. 8 bis 10 Wochen wurden die Stecklinge in Einheitserde ED 73 getopft und wöchentlich mit Flory 3 mega (0,1 %) (18+12+18+2) (N+P+K+Mg) gedüngt.

Zielorganismus *Plasmopara viticola*

Alle Versuche wurden mit einem aus der Mycothek des Fachgebietes Phytomedizin der Forschungsanstalt Geisenheim stammenden Isolat von *P. viticola* durchgeführt. Der obligat biotrophe Organismus wurde an Topfreben vermehrt und in Form eines Sporangienrasens auf abgetrennten Rebblättern bei –20 °C gelagert. Zur Sporangienenernte wurden die Blätter mit kaltem, sterilem Wasser abgespült und mittels Zählkammer auf eine Dichte von 1,0E+07 bzw. 1,0E+05 Sporangien pro Milliliter eingestellt.

Herstellung von Antagonisten-Suspensionen spezifischer Dichte

Basierend auf den Ergebnissen der Tests *in vitro* (Dual-Kultur-Test gegen *Pythium ultimum* and *Phytophthora infestans*) wurden sechs Isolate ausgewählt und für die

nachfolgenden Untersuchungen verwendet: B2, I-112, I-70, IV-298a, III-78a, 824 and I-16/1. Alle Isolate wurden in TSB (Tryptic Soy Broth; Rezeptur wie vom Hersteller angegeben) angezogen, indem eine Impföse Bakterien-schleim einer jungen Plattenkultur unter sterilen Bedingungen in die autoklavierte, abgekühlte Kulturlösung eingebracht wurde. Die beimpften 50 ml Erlenmeyerkolben wurden bei einer Temperatur von 30 °C für 24 h in einem Schüttelinkubator inkubiert (100 rpm). Nach der Inkubation wurde die Bakterien-suspension 1:1 mit sterilem dest. Wasser verdünnt und auf eine optische Dichte von $OD_{660} = 1.6$ eingestellt.

Blattscheiben-Test mit *Plasmopara viticola*

Zur Prüfung der antifungischen Aktivität ausgewählter bakterieller Isolate wurden Blattscheiben-Tests durchgeführt. Dazu wurden aus Rebblättern mittels Korkbohrer Blattscheiben ausgestanzt und je sechs Stück mit der Blattunterseite nach oben auf eine mit Wasser-Agar gefüllte Petrischale ausgelegt. Anschließend wurden die Blattscheiben mit einer frischen Kulturlösung bzw. mit Fermentationsschlamm ($1,0E+07$ CFU/ml bzw. $OD_{660} = 1.6$) mit Hilfe des Airbrush®-Systems besprüht. Die Petrischalen der Kontrolle wurden mit verdünnter, unbeimpfter Kulturlösung bzw. mit Wasser besprüht.

Die Petrischalen wurden bis zum Abtrocknen offen gelassen. Nach 48 h erfolgte die Inokulation mit einer frisch hergestellten Sporangien-Lösung von *P. viticola*. Nach 5 bis 7 Tagen Inkubationszeit (22-24 °C) wurden die Deckel der Petrischalen mit Wasser angefeuchtet und die Schalen über Nacht abgedunkelt, um sog. Ausbruchbedingungen zu schaffen. Am nächsten Tag erfolgte die Bewertung des Befalls (Prozent der von Sporangienrasen bedeckten Fläche auf den einzelnen Blattscheiben).

Überprüfung der biologischen Wirksamkeit der Antagonisten an Topfreben unter Gewächshausbedingungen

Die Behandlung der Topfreben (cv. Riesling; cv. Müller-Thurgau; optimal geeignet ist das 6- bis 8-Blatt-Stadium) wurde in Anlehnung an die Blattscheiben-Tests durchgeführt. Im ersten Schritt wurde die Antagonisten-Suspension auf die Blattunterseite appliziert. Dies erfolgte mittels Airbrush®-System. Nach 24-stündiger Trocknung wurde im zweiten Schritt die Sporangien-suspension von *P. viticola* aufgebracht. Über die Topfreben wurden anschließend große PE-Tüten gestülpt, um

möglichst lange eine hohe Luftfeuchte und tropfbar flüssiges Wasser zu gewährleisten. Nach 48 h wurden die PE-Tüten entfernt und die Pflanzen wurden 6 Tage im Gewächshaus bei 20 °C und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16:8 kultiviert. Am siebenten Tag wurde das Eintüten der gesamten Topfreibe wiederholt, um Ausbruchbedingungen zu schaffen.

Identifizierung der ausgewählten Antagonisten

In der Geisenheimer Arbeitsgruppe erfolgte die Identifizierung der bakteriellen Antagonisten mit dem MicroLog®-System. Dieses Identifizierungsverfahren wird seit über zehn Jahren in Geisenheim für die systematische Einordnung von Bakterien und Hefen eingesetzt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde in der Arbeitsgruppe in Göttingen ergänzend eine Identifizierung der Antagonisten mit einem anderen Identifizierungssystem durchgeführt. Im Falle von Vertretern der Gattung *Pseudomonas* (I-112, II-16/1, IV 298a) wurde das Identifizierungssystem API 20 NE (Fa. Api BioMérieux®) eingesetzt. Für alle *Bacillus*-Isolate (B2 and 857) wurde das System API 50 CHB/E verwendet (Fa. Api BioMérieux®). Hierfür wurde stets eine junge Bakterienkultur der jeweiligen Stämme verwendet (max. 24 h alt). Alle Untersuchungen zur Identifizierung der Stämme wurden dreimal wiederholt. Ergänzend wurden Primärtests durchgeführt (z.B. Katalase-Test, Oxidase-Test) sowie mikroskopische Untersuchungen zur Kolonie- und Zellmorphologie.

Alle Antagonisten, für die ein Einsatz im Freiland geplant war, wurden zur weiteren Absicherung der Identifizierungsergebnisse (MicroLog® und Api®) durch die DSMZ (Braunschweig) bestimmt.

Selektion von Formulierungshilfsstoffen

Eines der Hauptziele des Projektes bestand in der Auswahl von Formulierungshilfsstoffen, die in der Lage sind, die Fermentationsausbeute zu steigern, eine bessere Applikationsqualität zu ermöglichen, aber auch den Belangen UV-Schutz sowie zur Steigerung der Regenfestigkeit des Spritzbelages Rechnung zu tragen. Wichtig war die Forderung, dass das Pilzwachstum durch diese Substanz(en) nicht gefördert werden sollte. Bei der Auswahl war außerdem darauf zu achten, dass die Adjuvantien bzgl. ihrer Herkunft, Zusammensetzung und/oder Wirkung mit den Richtlinien für den ökologischen Anbau in Einklang stehen.

a.) Einsatz von Lignin

Zunächst wurde die Eignung von Lignin (Fa. Aldrich) als Zusatz zur Antagonistensuspension überprüft. Hierfür wurde eine 10 %ige Stammlösung mit demin. Wasser angesetzt. Von dieser Stammlösung wurden jeweils 0.5, 1, 1.5 und 2 ml zu 20 ml TSB Medium zugefügt. Diese Mengen entsprechen 0.05, 0.1, 0.15 und 0.2 g Lignin pro 20 ml Medium. Die Mischungen wurden anschließend für 20 min bei einer Temperatur von 121 °C autoklaviert. Für den Test wurde ein *Pseudomonas*-Stamm (I-112) und ein *Bacillus*-Stamm (857) ausgewählt. Eine in TSB-Medium angezogene frische Vorkultur wurde auf eine optische Dichte von $OD_{660} = 1.5$ eingestellt und jeweils 5 µl der Suspension wurde dem ligninhaltigen Testmedium zugesetzt. Als Kontrolle diente TSB ohne Ligninanteil. Die Kulturflaschen wurden im Schüttelinkubator für 72 h bei 28 °C und 100 rpm inkubiert. Jede Behandlung wurde in vier Parallelen angelegt; der Versuch wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Bakteriendichte ermittelt (Anzahl koloniebildender Einheiten pro Milliliter). Der Effekt des Lignins wurde auch gegenüber den Testpilzen untersucht. Hierfür fand die Technik des Agarschalen-Diffusionstests Anwendung.

b.) Einsatz von Gemüseölen

Aus der breiten Palette von Gemüseölen wurden einige für die Tests ausgewählt. Als Testorganismen kamen die Antagonisten-Stämme I-112 und 857 zum Einsatz. Die Wirkung folgender Öle wurde überprüft: „Codacide“ und „E 41272“ (Microcide Ltd, England); „Addit“ und „experimental oil“ (Koppert GmbH, Niederlande).

Die Testmethodik wurde wie oben beschrieben angewandt. Für die Herstellung der Formulierung wurde das Öl, die Bakterienzellen und dest. Wasser im Verhältnis 1:1:8 gemischt. Zur besseren Vermischung wurde zunächst die Bakteriensuspension mit dem Öl kräftig gemischt und dann das Wasser langsam zuzugeben. Nach Herstellung von Verdünnungsreihen wurde auch hier einerseits die Wirkung auf das Wachstum der Antagonisten untersucht. Andererseits wurde überprüft, ob durch Ölzusatz die antagonistische Wirkung gegenüber *P. ultimum in vitro* gesteigert werden kann. Beide Versuche wurden viermal wiederholt.

c.) Testung einiger Spurenelemente in vitro

Die Wirkungen einiger ausgewählter Spurenelemente auf das Wachstum und die antagonistische Aktivität der Antagonisten wurde untersucht (I-112, II-16/1, IV-298a, B2, EB4 and 857).

Die Spurenelemente sind im folgenden aufgeführt: H_3BO_5 (0.2mM), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2mM), MnSO_4 (0.05mM). Diese Substanzen wurden in dest. Wasser gelöst und für 20 min bei einer Temperatur von 121 °C autoklaviert. Die Antagonisten wurden in TSB Medium kultiviert und auf eine optische Dichte von $\text{OD}_{660} = 1.5$ eingestellt. Von dieser Bakteriensuspension wurden 100 μl entnommen und mit 900 μl der Spurenelemente-Stammlösung gemischt. Die Kontroll-Platten wurden ohne Zusatz von Spurenelementen hergestellt. Von einer Verdünnungsreihe (bis 10^{-3}) wurden jeweils 10- μl der Suspension entnommen und auf der Oberfläche einer TSA-Platte verteilt. Nach der Inkubationszeit für 48 h bei 24 °C erfolgte die Auszählung der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml oder CFU/ml). Von jedem Versuchsglied wurden vier Parallelplatten angelegt; der Versuch wurde zweimal wiederholt.

d.) Untersuchungen über die Wirkung von "Sorbitol" und "Trehalose" in vitro

Für die Untersuchungen zur Wirkung von Sorbitol und Trehalose wurden die Stämme I-112, B2 und EB4 ausgewählt. Es wurden die Standardmedien der FZB Biotechnik (Berlin) eingesetzt. Diesen Medien wurde Sorbitol bzw. Trehalose zugesetzt (Sorbitol: 198.2g/l = 0.98 aktives Wasserpotential (a_w); Trehalose: 0, 0.03, 0.14, 0.81 and 0.96 Mol/Liter). Nach Kultivierung der Antagonisten wurde die Kulturlösungen im Dual-Kultur-Test eingesetzt, um zu prüfen, ob die biologische Wirksamkeit gegenüber *P. ultimum* gesteigert werden konnte oder abgenommen hatte.

Herstellung der bakteriellen Biomasse für die Freilandversuche

Fermentation

Die Fermentation der Isolate und die Aufarbeitung bis zum Fermentationsschlamm wurde von der Firma FZB Biotechnik GmbH in Berlin durchgeführt.

a.) EB4 und B2 (*Bacillus amyloliquefaciens*, DSMZ)

1,5 L des Nährmediums NB19 (FZB) wurden mit 15 ml einer Vorkultur (GNB, 35 °C, 220 rpm, 8 h) beimpft. Die Kultivierung (35 °C, 900 rpm, 20-40 h) erfolgte im Fermenter (BIOSTAT).

b.) I-112 (*Pseudomonas* sp., DSMZ)

1 L des Mediums GNB (SIFIN) wurde mit zwei Impfösen beimpft. Die Kultivierung (30 °C, 175 rpm, 20-40 h) erfolgte im Schüttelkolben.

Formulierung bakterieller Antagonisten

Für einen Einsatz von Bakterien in der weinbaulichen Praxis müssen diese in formulierter Form vorliegen. Die Formulierungshilfsstoffe erfüllen dabei wichtige Funktionen, wie z.B. die Erhöhung der Wirkungssicherheit und der Anwenderfreundlichkeit des biologischen Produktes. Außerdem schützen sie die Organismen vor widrigen Umwelteinflüssen und erleichtern deren Etablierung auf der Pflanzenoberfläche.

Test der Formulierungshilfsstoffe auf phytotoxische und antifungische Eigenschaften

Um mögliche phytotoxische Eigenschaften der ausgewählten Formulierungshilfsstoffe ausschließen zu können, wurden im Gewächshaus Versuche an Topfreben durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte in einem getrennten Versuchsansatz eine Bewertung der antifungischen Eigenschaften der Stoffe gegenüber *P. viticola*.

Die ausgewählten Formulierungshilfsstoffe Trehalose, Xanthan Gum und PHYTO-VITAL® wurden zunächst einzeln - in den im Freiland applizierten Konzentrationen - frisch angesetzt. Darüber hinaus wurde eine Variante mit allen drei Stoffen hergestellt, die der eigentlichen Formulierung entsprach. Anschließend folgte die Applikation an jeweils drei Topfreben der Sorte cv. Riesling mit dem Airbrush-System. Die Inokulation mit *P. viticola* erfolgte 48 h später nach Vorschrift. Bei den Varianten zur Bewertung der phytotoxischen Eigenschaften wurde nicht inokuliert.

Herstellung der Formulierungen

Für die Formulierung sowohl der gram positiven Isolate B2 und EB4 als auch des gram negativen Isolates I-112, wurde eine Flüssigformulierung ausgewählt. Für die Applikationen im Freiland wurde eine Zellzahl von 1,00E+07 CFU/ml angestrebt. Die einzusetzende Menge an Bakterien wurde dabei in 1 L 0,14 M Trehalose-Lösung eingemischt. Anschließend erfolgte eine schrittweise Zugabe von 0,02 % Xanthan gum (bezogen auf die applizierte Gesamtwassermenge). Dieses Gemisch wurde jeweils frisch hergestellt und bis zur Applikation im Freiland im Kühlschrank gelagert. Direkt vor der Ausbringung wurde zur vorbereiteten Formulierung das UV-Schutzmittel PHYTO-VITAL® in einer Aufwandmenge von 6 L/ha zugegeben.

Lagerungsversuche

Die formulierten Antagonisten wurden im Kühlschrank (4 °C) gelagert. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden Proben entnommen und nach Erstellung einer Verdünnungsreihe ausplattiert.

Freilandversuche

Die bakteriellen Formulierungen wurden in der Vegetationsperiode 2003 an drei verschiedenen Standorten im Freiland getestet. Zwei der Versuche wurden in Versuchsweinbergen der Forschungsanstalt Geisenheim und ein Versuch an der LVWO Weinsberg durchgeführt. Die Versuchsflächen wurden in Form von randomisierten Blockanlagen mit vier Wiederholungen angelegt. Die Versuchsanlagen waren mit cv. Riesling bestockt. Die einzelnen Wiederholungen der Versuchsglieder wurden mittels Parzellenspritzgerät in regelmäßigen Intervallen behandelt.

Die nachfolgenden beiden Tabellen geben eine Übersicht über die Versuchsglieder. Am Standort Weinsberg stimmte Art und Umfang der Versuchsglieder mit dem des Geisenheimer Standorts Mäuerchen überein. Die Versuchsfläche in Weinsberg war mit cv. Trollinger bestockt.

Tab. 1: Darstellung der Versuchsglieder am Standort Mäuerchen in Geisenheim.

Versuchsglieder Standort Mäuerchen

1	Kontrolle
2	Integriert
3	Öko-Standard (mit Kupfer)
9	Öko-Standard + B2 (ohne Kupfer)
10	Öko-Standard + I-112 (ohne Kupfer)
11	Öko-Standard + B2 (50%)+I-112 (50%) (ohne Kupfer)

Tab. 2: Darstellung der Versuchsglieder am Standort Kellersgrube in Geisenheim.

Versuchsglieder Standort Kellersgrube

1	Kontrolle
2	Integriert
3	Öko-Standard (mit Kupfer)
4	EB4 (ohne Kupfer)
5	I-112 (ohne Kupfer)
6	B2 (ohne Kupfer)
7	EB4 (50%)+I-112 (50%) (ohne Kupfer)
8	EB4 (50%)+B2 (50%) (ohne Kupfer)
9	B2 (50%)+I-112 (50%) (ohne Kupfer)

Applikation der bakteriellen Antagonisten

Für die Applikation der bakteriellen Antagonisten wurde eine Zellzahl von 1,00E+07 CFU/ml angestrebt. Zu Beginn jeder Spritzung wurden aus der Spritzbrühe Proben entnommen und nach Erstellung einer Verdünnungsreihe die Zellzahl bestimmt.

Versuche zur Etablierung bakterieller Antagonisten im Freiland

Zur Bewertung möglicher witterungsbedingter Einflüsse auf die Fähigkeit der Etablierung der ausgebrachten Isolate wurden jeweils einen Tag vor und einen Tag nach erfolgter Applikation Reisolierungen vorgenommen. Dabei wurden zwei Rebblätter in je vier Wiederholungen für jedes Versuchsglied aus dem Weinberg entnommen. Die Blätter wurden in 50 ml physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen und anschließend 30 min mit Hilfe eines Überkopfschüttlers abgewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde verdünnt und Aliquote der Verdünnungsstufen mittels Spiralgerät auf TSA ausgebracht. Nach Inkubation (48 h, 24 °C) der Platten erfolgte die Auswertung der Koloniedichte (CFU/ml).

Bonitur des Peronospora-Befalls an Blättern und Trauben

Zur Erfassung der Befallssituation wurde der prozentuale Anteil der Läsionen (hier: Sporangienrasen) auf der Blattunterseite bzw. an den Trauben erfasst. Im Falle der Blattscheiben sowie der ganzen Blätter diente eine visuelle Boniturhilfe der besseren Standardisierbarkeit bei der Abschätzung.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung und Diskussion der wichtigsten Ergebnisse

Versuche zur antifungischen Aktivität ad planta

Die bakteriellen Isolate, die gegen die Modellpilze *Pythium ultimum* und *Phytophthora infestans in vitro* eine gute antifungische Wirkung zeigten, wurden für weiterführende Tests *ad planta* ausgewählt. Mit Hilfe des Blattscheiben- und Topfrenbentests, konnte die antifungische Aktivität gegen den obligat biotrophen Zielorganismus *P. viticola* geprüft werden.

Blattscheibentest

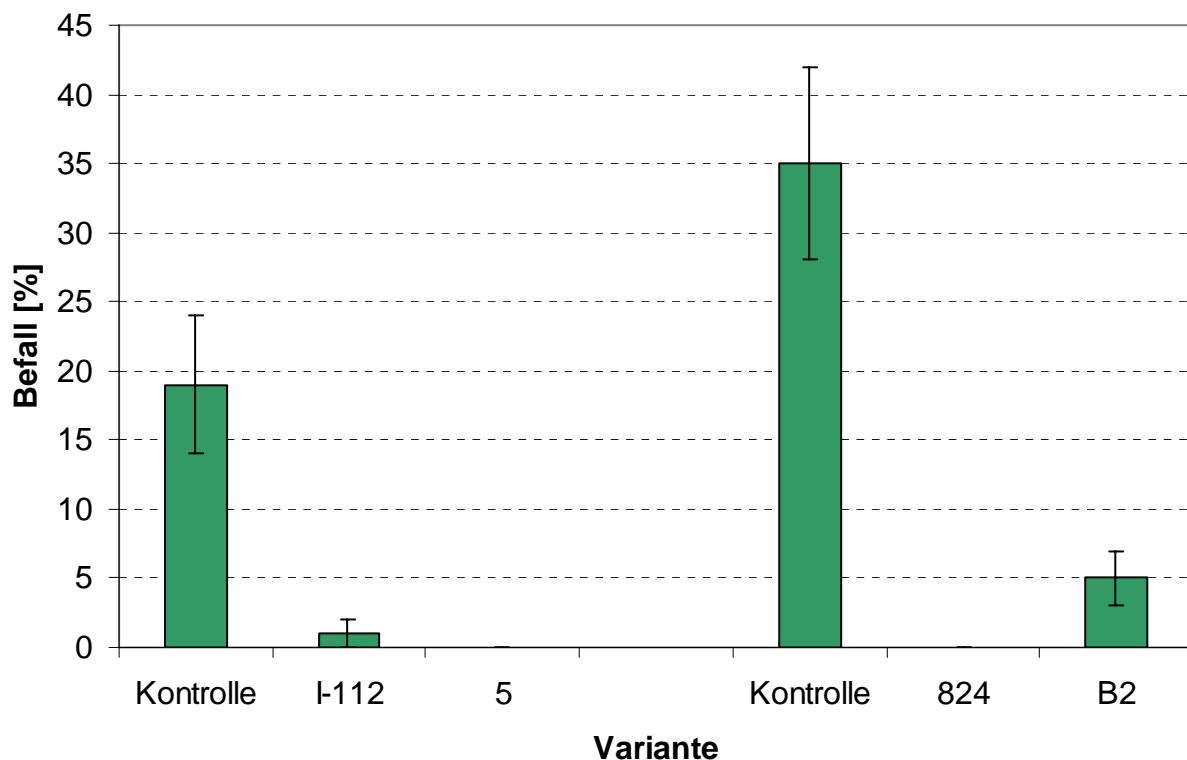


Abb. 1: Blattscheibentest, Prozentualer Befall mit *Plasmopara viticola* nach Applikation der Isolate *Pseudomonas* sp. I-112, *Pseudomonas fluoreszens* 5, *Bacillus* sp. 824 und *Bacillus amyloliquefaciens* B2. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

Abbildung 1 zeigt die Reduktion des Befalls mit *P. viticola* nach Applikation der Isolate I-112, 5, 824 und B2. Trotz geringer Infektionsraten der Kontrollen von 19 % bzw. 35 %, konnte eine signifikante Reduktion des Befalls nach Applikation der aufgeführten Isolate beobachtet werden.

Gewächshausversuche an Topfreben

Aufgrund der geringen Infektionsraten und versuchstechnischer Probleme des Blattscheibentests in den Wintermonaten, wurden weiterführende Tests an Topfreben durchgeführt. Der Test an ganzen Pflanzen entspricht eher den natürlichen Bedingungen und wurde deshalb schon frühzeitig im Rahmen des Screenings eingesetzt.

In der Abbildung 2 ist die Wirkung der applizierten Isolate auf den Befall mit *P. viticola* dargestellt. Alle getesteten Isolate zeigten eine antifungische Aktivität gegenüber dem Zielpathogen. Im Gewächshaus konnten Infektionsraten der Kontrollen zwischen 60 % und 75 % erreicht werden.

Ein wichtiger Ansatzpunkt zur Erhöhung der Wirksamkeit eines biologischen Präparates liegt in der Fermentation des Organismus. Kultivierungsparameter beeinflussen nicht nur die Überlebensfähigkeit des später formulierten Antagonisten sondern auch dessen Eigenschaften. So ist bekannt, dass bestimmte Zusätze zum Kultivierungsmedium das Spektrum bzw. die Menge an gebildeten Antibiotika beeinflussen können.

Ausgewählte bakterielle Antagonisten wurden mit freundlicher Unterstützung der FZB Biotechnik GmbH in Berlin in geeigneten Medien kultiviert und durch Zentrifugation bis zum Fermentationsschlamm aufgearbeitet. Um mögliche Einflüsse des Kultivierungsmediums auf die antifungische Aktivität der Isolate ausschließen zu können, wurden die Fermentationsschlämme ebenfalls an Topfreben getestet. Dabei wurde in den Gewächshausversuchen eine Zellzahl von $1,00E+07$ CFU/ml angestrebt. Trotz geringerer Infektionsraten der Kontrollen, zeigten alle getesteten Isolate eine antifungische Aktivität gegenüber dem Zielpathogen (Abb. 3).

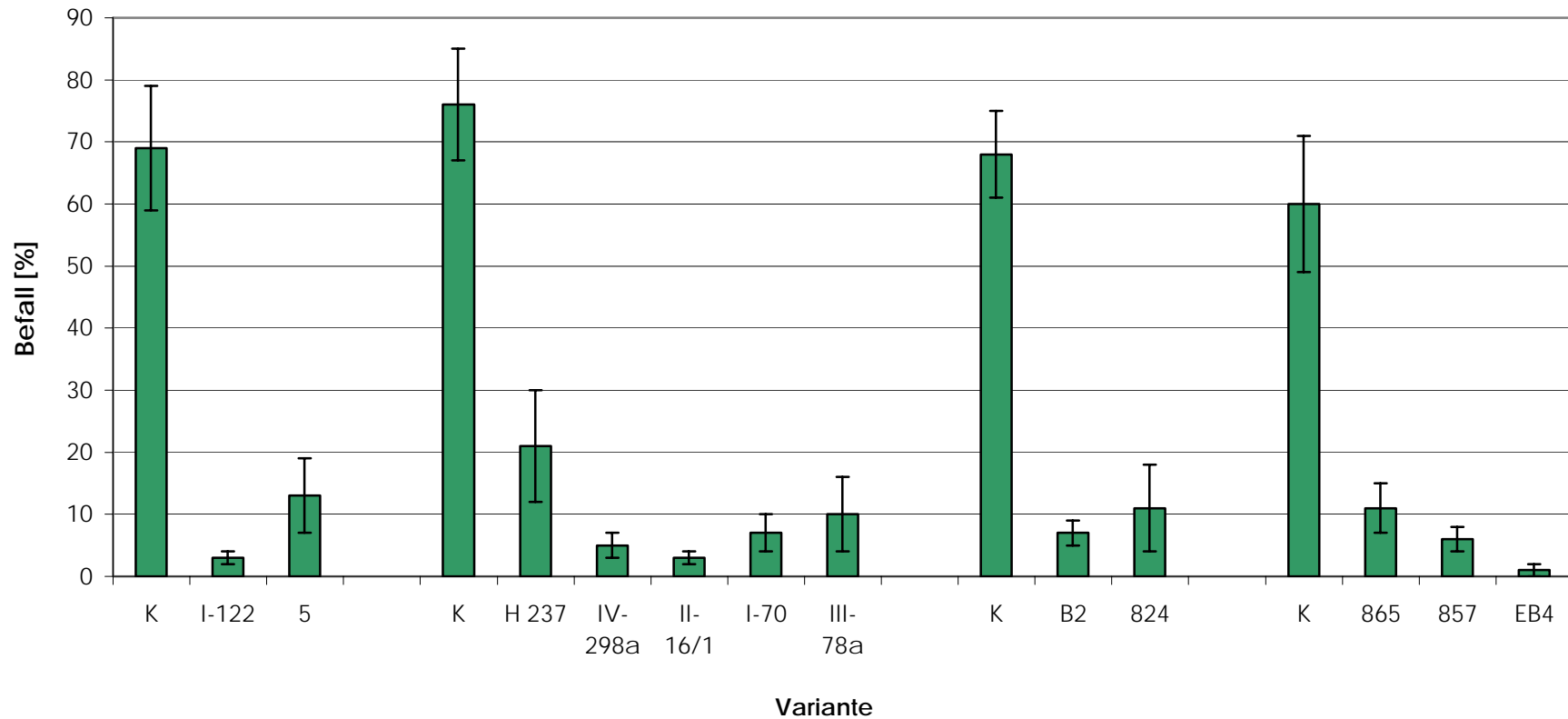


Abb. 2: Gewächshausversuche an Topfreben, Prozentualer Befall mit *Plasmopara viticola* nach Applikation der Original-Flüssigkultur (TSB) der Isolate I-112, 5, H237, IV-298a, II-16/1, I-70, III-78a, B2, 824, 865, 857 und EB4. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

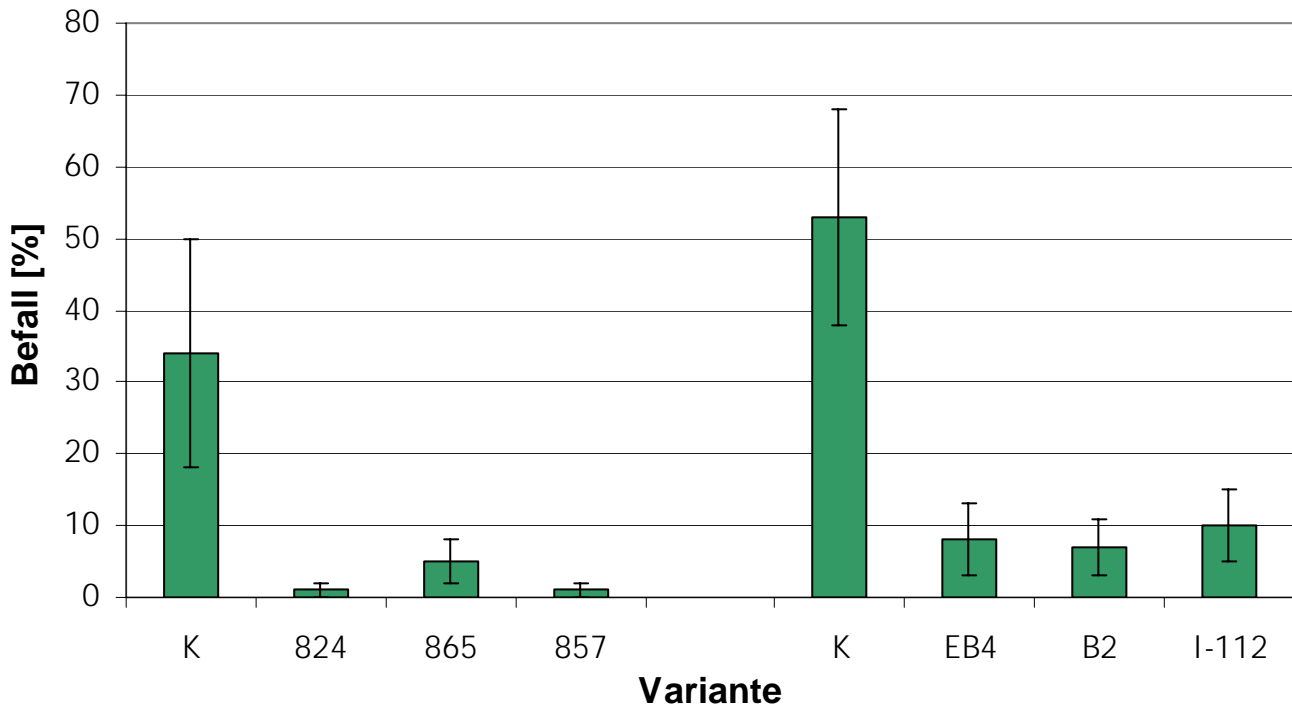


Abb. 3: Gewächshausversuche an Topfreben, Prozentualer Befall mit *P. viticola* nach Applikation der Fermentationsschlämme (CFU/ml 1,00E+07) der Isolate 824, 865, 857, EB4, B2 und I-112. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

Test der Formulierungsstoffe auf antifungische und phytotoxische Eigenschaften

Um mögliche antifungische oder phytotoxische Eigenschaften der ausgewählten Formulierungsstoffe ausschließen zu können, wurden Gewächshausversuche an Topfreben durchgeführt. Dabei wurden die Substanzen Trehalose, Xanthan gum und PHYTO-VITAL®, sowie eine Mischung aller drei Stoffe - in den im Freiland zu applizierenden Konzentrationen - getestet.

Bei keiner der applizierten Formulierungsstoffe wurden phytotoxische Eigenschaften beobachtet. Das UV-Schutzmittel PHYTO-VITAL® und die Mischung dieses Stoffes mit Trehalose und Xanthan Gum zeigte dagegen eine antifungische Aktivität gegenüber *Plasmopara viticola* (Abb. 4 und 5). Nach Applikation von PHYTO-VITAL® wurde eine Befallsreduktion von durchschnittlich 50 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Bei Applikation der Mischung aller drei Stoffe kam es zu einer Reduktion von etwa 40 %.

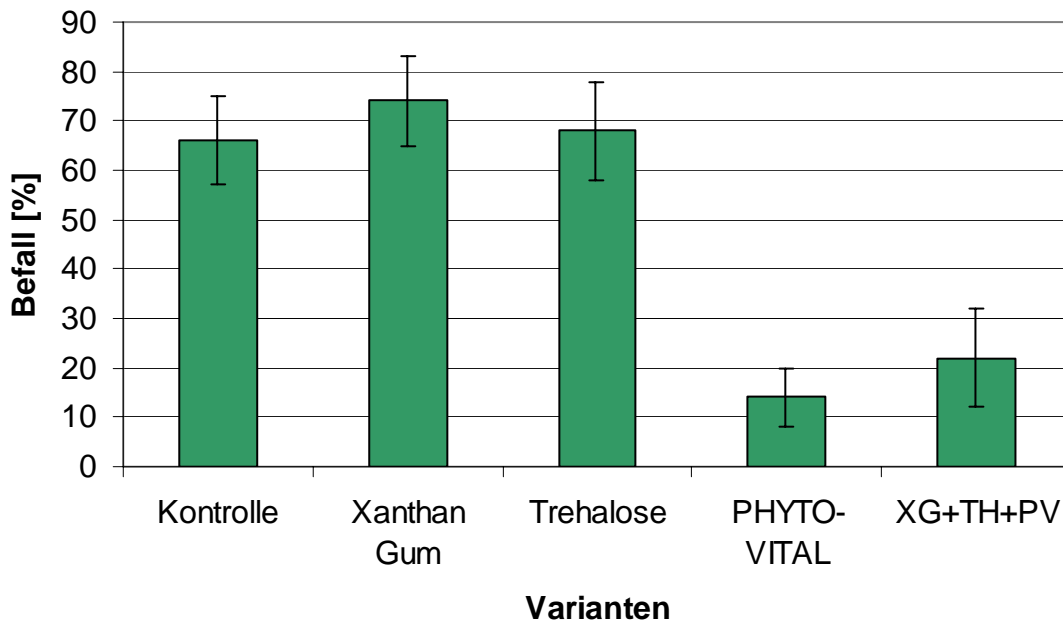


Abb. 4: Gewächshausversuch 1, prozentualer Befall mit Peronospora nach Applikation der Formulierungshilfsstoffe Xanthan Gum, Trehalose, PHYTO-VITAL und der Mischung aller drei Stoffe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

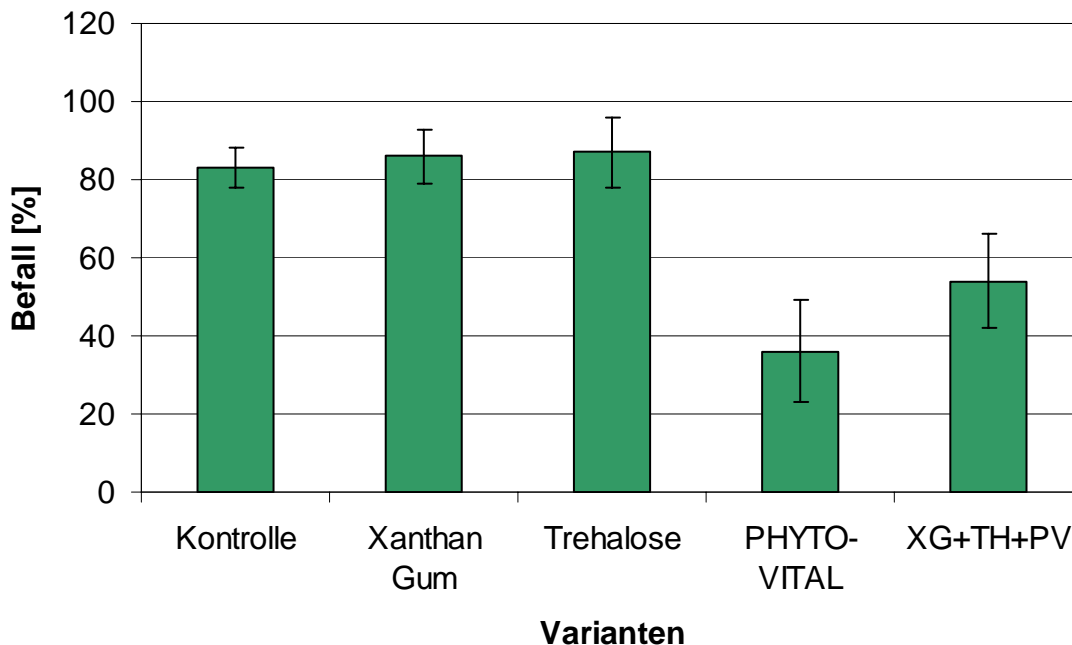


Abb. 5: Gewächshausversuch 2, prozentualer Befall mit Peronospora nach Applikation der Formulierungshilfsstoffe Xanthan Gum, Trehalose, PHYTO-VITAL und der Mischung aller drei Stoffe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

Lagerungsversuche

In den durchgeführten Freilandversuchen, wurden die Formulierungen jeweils frisch angesetzt. Für den geplanten Einsatz in der weinbaulichen Praxis sollte dagegen eine lagerfähige Formulierung vorliegen, die eine einfache und ungefährliche Anwendbarkeit garantiert.

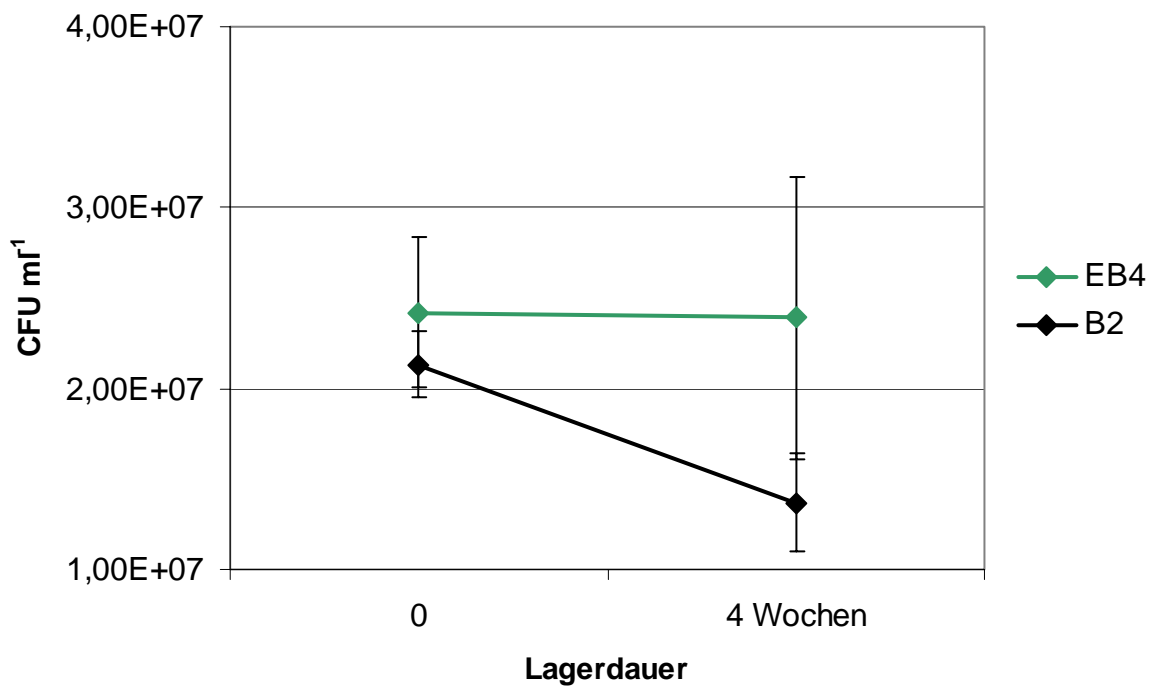


Abb. 6: Lagerstabilität (T = + 4°C) der Isolate *Bacillus amyloliquefaciens* EB4 und B2 formuliert als Flüssigformulierung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

Abbildung 6 stellt die Stabilität der *Bacillus*-Isolate EB4 und B2 in der Flüssigformulierung (PHYTO-VITAL®, Trehalose und Xanthan Gum, in den im Freiland applizierten Konzentrationen) bei gekühlter Lagerung (+4 °C) dar. Das *Pseudomonas*-Isolat I-112 war in dieser Flüssigformulierung nicht lagerfähig.

Freilandversuche

Bonitur des Peronospora-Befalls an Blättern und Trauben

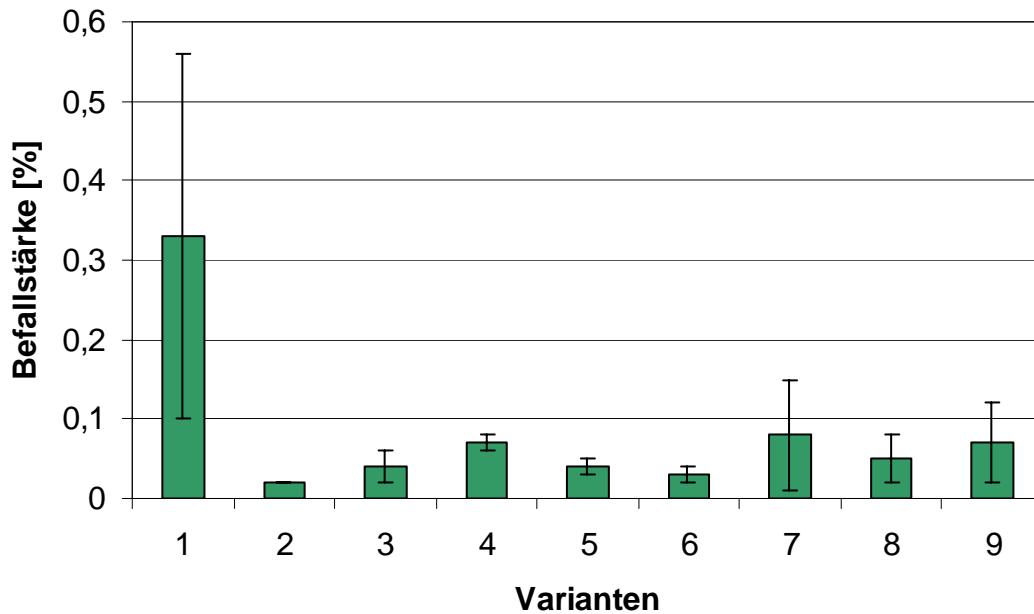


Abb. 7: Freilandversuch Standort Kellersgrube, Befallsstärke an Blättern nach Applikation der Varianten 1 bis 9. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

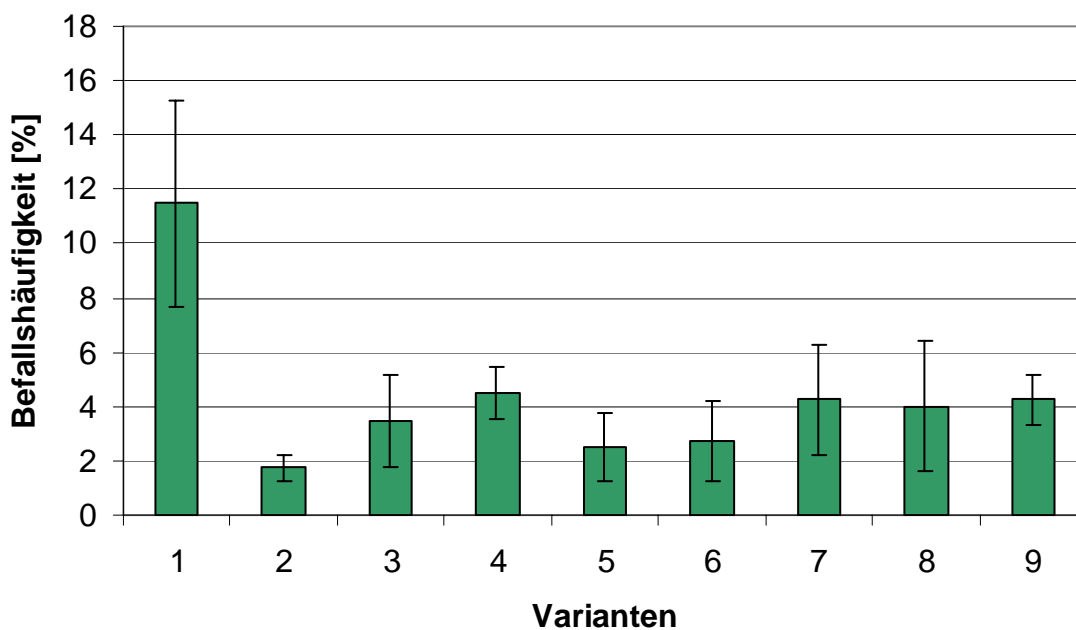


Abb. 8: Freilandversuch Standort Kellersgrube, Befallshäufigkeit an Blättern nach Applikation der Varianten 1 bis 9. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

Aufgrund der extrem trockenen Witterungsbedingungen während der Vegetationsperiode im Sommer 2003, konnte kein Peronospora-Befall an Trauben in der Kontrolle bonitiert werden. Auch der Befall an den Blättern war insgesamt sehr gering, was die Aussagekraft der Versuche stark einschränkte. So konnte zwar in allen applizierten Varianten eine mit den integriert gespritzten Versuchsgliedern bzw. mit dem Öko-Standard vergleichbare Befallsreduktionen beobachtet werden, allerdings auf einem insgesamt sehr niedrigen, nicht repräsentativen Befallsniveau (Abb. 7 und 8). Das Versuchsglied Kontrolle am Standort Kellersgrube wies eine Befallsstärke von nur 0.3 % auf. Der Versuch am Standort Mäuerchen sowie beim Kooperationspartner in Weinsberg war aufgrund eines noch niedrigeren Peronospora-Befalls nicht auswertbar.

Überprüfung der Dichte an bakteriellen Antagonisten in der Applikationslösung

In den durchgeführten Freilandversuchen, wurde eine Zellzahl von $1,00E+07$ CFU/ml der applizierten Antagonisten angestrebt. Zur Kontrolle der tatsächlich applizierten Dichte an Bakterien, wurde vor jeder Spritzung eine Probe aus der Spritzbrühe entnommen, eine Verdünnungsreihe erstellt und in Wiederholungen ausplattiert. Sowohl am Standort Mäuerchen (Abb. 9) als auch in der Kellersgrube (Abb. 10) wurde die angestrebte Zellzahl appliziert. Eine Ausnahme bildet dagegen an beiden Standorten das *Pseudomonas*-Isolat I-112, welches durchschnittlich in einer Dichte von nur $1,00E+04$ CFU/ml appliziert wurde. Die höheren Zellzahlen in den Mischungen des Isolates I-112 mit den *Bacillus*-Isolaten wurden - im Hinblick auf die Koloniemorphologie - durch die gram positiven Isolate hervorgerufen.

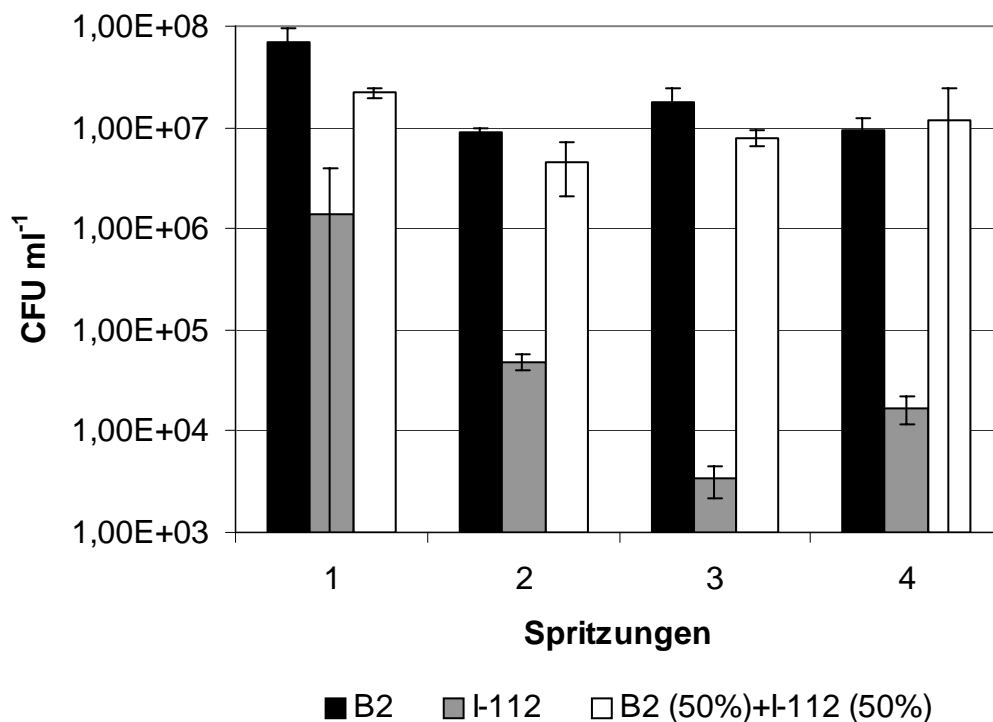


Abb. 9: Freilandversuch Standort Mäuerchen, Tatsächlich applizierte Zellzahl der Isolate B2, I-112 und einer Mischung aus beiden Isolaten. Entnahme der Probe aus der Spritzbrühe kurz vor der jeweiligen Spritzung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

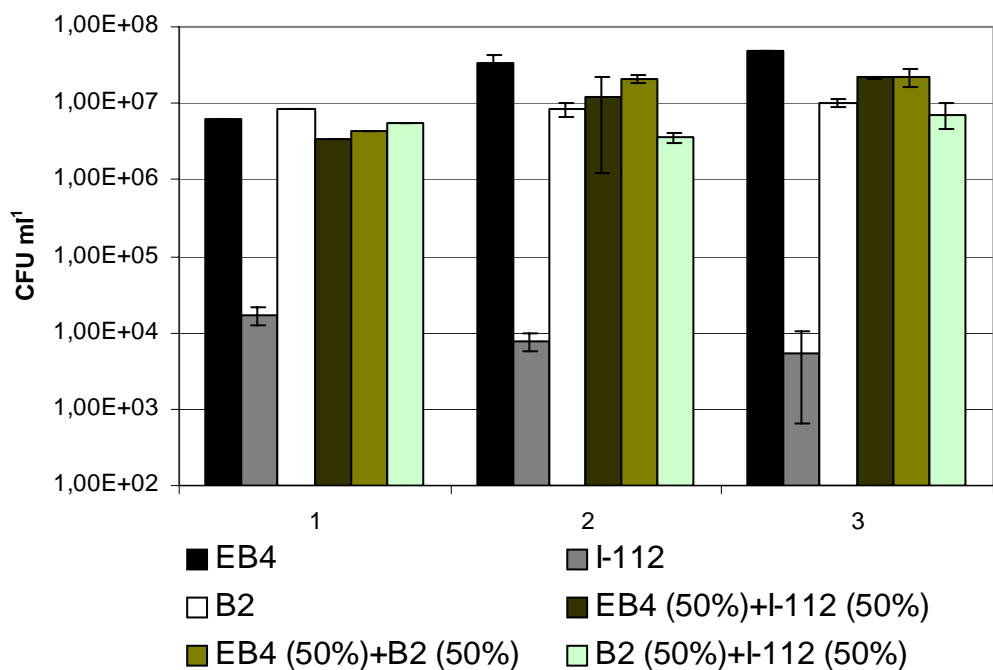


Abb.10: Freilandversuch Standort Kellersgrube, Tatsächlich applizierte Zellzahl der Isolate EB4, I-112, B2 und der entsprechenden Mischungen der Isolate. Entnahme der Probe aus der Spritzbrühe kurz vor der jeweiligen Spritzung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

Versuche zur Etablierung bakterieller Antagonisten im Freiland

Um Aussagen zur Etablierung der Isolate auf der Rebblattoberfläche machen zu können, wurden einen Tag vor und nach jeder erfolgten Spritzung am Standort Mäuerchen Blattproben genommen und Reisolierungen durchgeführt. In den Abbildungen 11 bis 14 sind die Zellzahlen der von der Blattoberfläche reisolierten Bakterien während der vier durchgeführten Spritzungen dargestellt. Die 1. Reisolierung entspricht dabei der Probennahme vor der jeweiligen Spritzung und die 2. Reisolierung entspricht der Probennahme nach erfolgter Spritzung. In den Versuchsgliedern 9, 10 und 11 wurde eine um ca. eine Zehnerpotenz erhöhte Zellzahl gegenüber der integrierten Variante 2 und des Öko-Standards 3 beobachtet. Dabei waren die Zellzahlen des Versuchsgliedes 10 geringer als die der Varianten 9 und 11. Die Werte der 1. Reisolierungen entsprachen denen der 2. Reisolierungen. Nach der 4. Spritzung stellte sich die Zellzahl der applizierten Antagonisten auf Werte zwischen $1,00E+04$ und $1,00E+05$ CFU/ml ein.

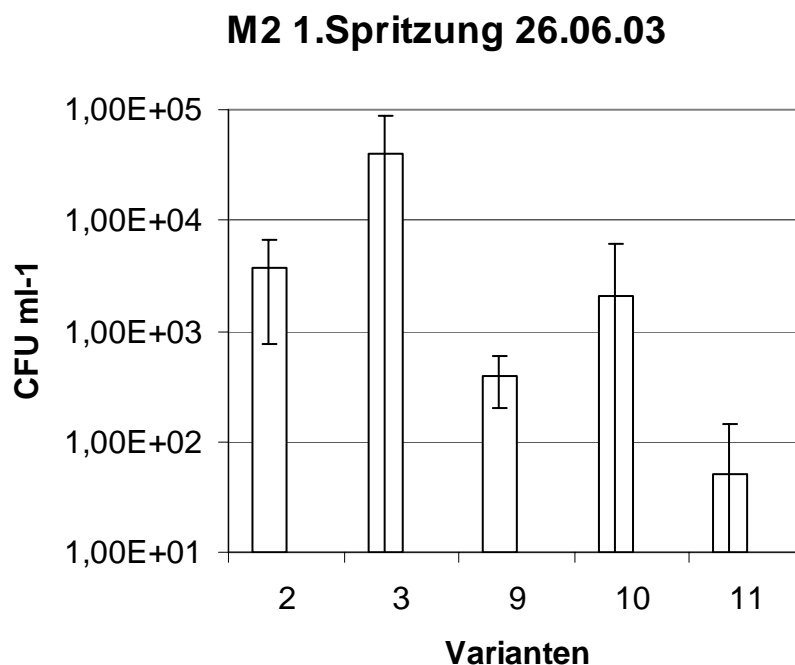


Abb.11: Freilandversuch Standort Mäuerchen, 1. Spritzung, 1. Reisolierung. Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

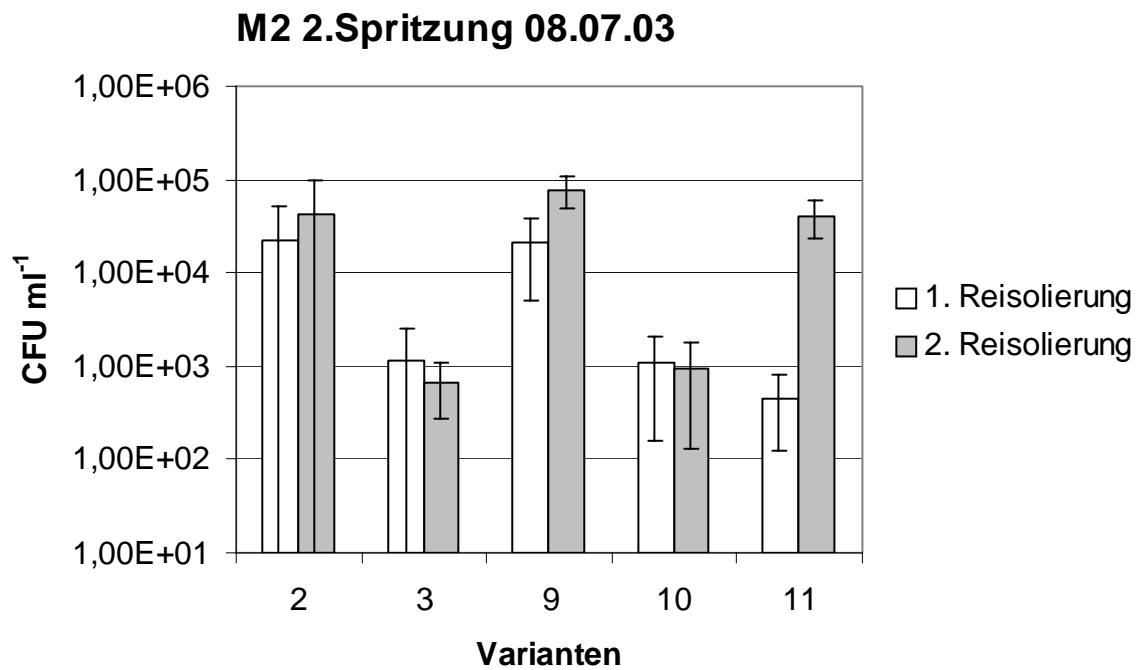


Abb.12: Freilandversuch Standort Mäuerchen, 2. Spritzung, Reisolierung Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

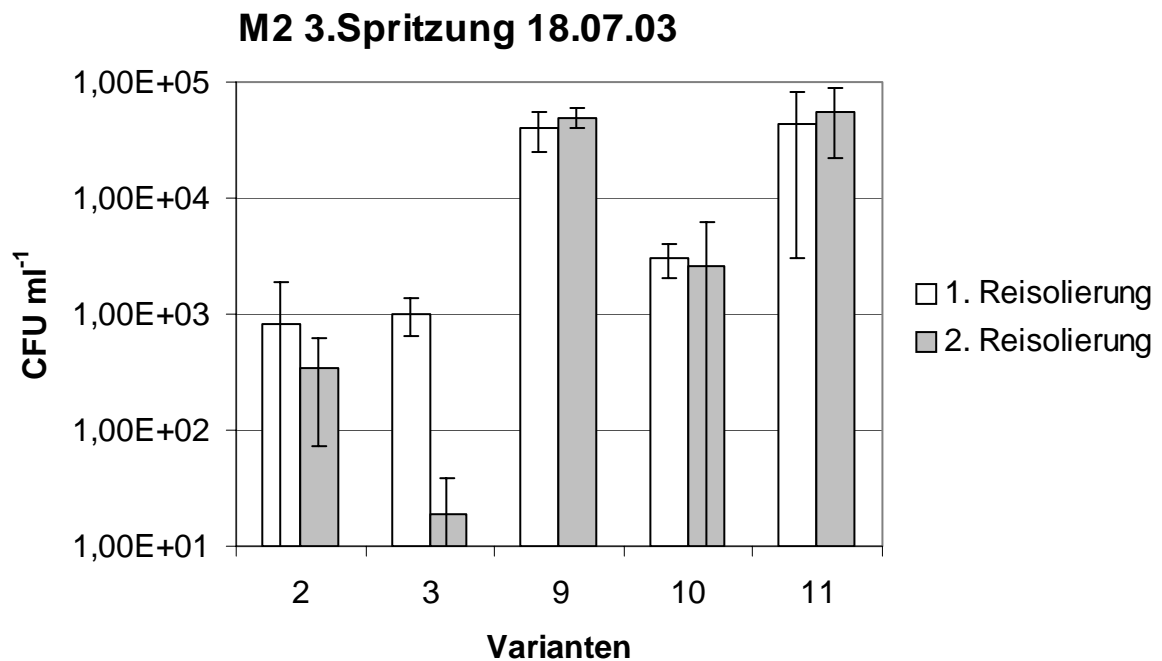


Abb.13: Freilandversuch Standort Mäuerchen, 3. Spritzung, Reisolierung Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

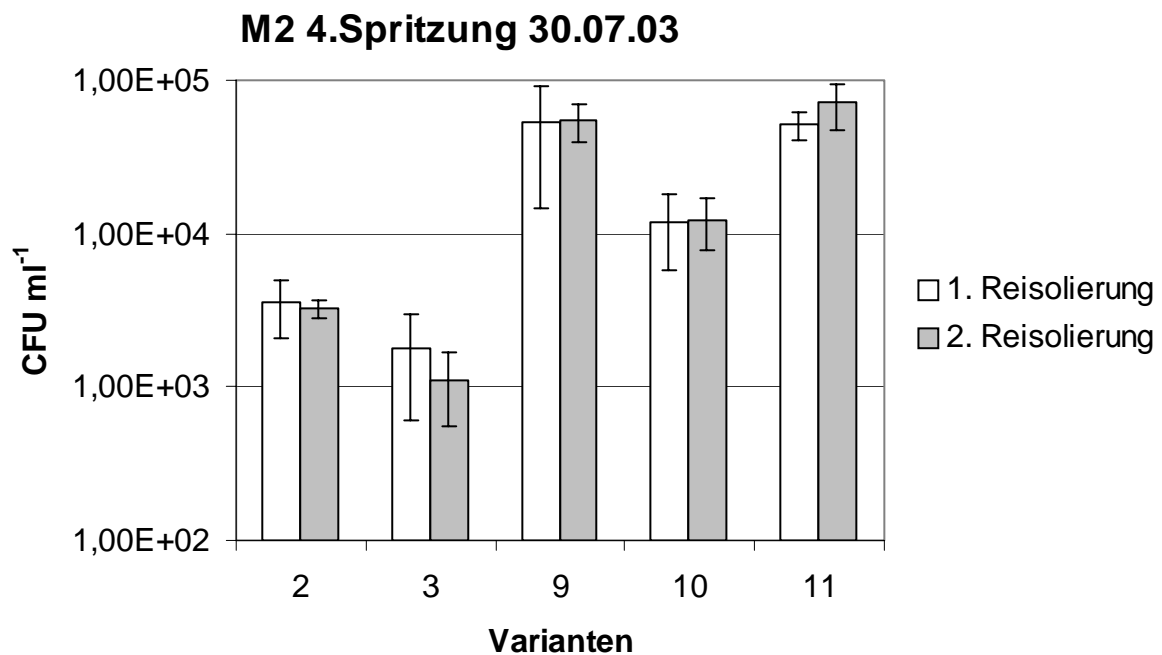


Abb.14: Freilandversuch Standort Mäuerchen, 4. Spritzung, Reisolierung Die Fehlerbalken repräsentieren die Konfidenzintervalle ($P \leq 0,05$).

Mikrovinifikation, Most- und Weinanalytik, Sensorik

Die Versuche zur Mikrovinifikation sowie die Most- und Weinanalyse sind noch nicht abgeschlossen. Die Ergebnisse werden nach Füllung der Jungweine und deren sensorischer Prüfung im Frühjahr 2004 nachgereicht.

3.2 Nutzen und Verwertbarkeit für den ökologischen Landbau; Möglichkeiten der Umsetzung oder Anwendung der Ergebnisse, insbesondere Ableitung von Vorschlägen für Maßnahmen, die durch BMVEL weiter verwendet werden können

Im Rahmen des Forschungsvorhabens konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten bakteriellen Antagonisten geeignet sind, den Blattbefall durch *P. viticola* im Blattscheiben-Test und unter Gewächshausbedingungen deutlich zu reduzieren. Aufgrund der extrem geringen Befallssituation im Freiland im Jahr 2003 konnten keine Aussagen zur biologischen Wirksamkeit der selektierten Antagonisten unter Freilandbedingungen gemacht werden. In den meisten deutschen Weinbaugebieten hat der Schadpilz nur wenige Sekundärzyklen durchlaufen, da starke Hitze und extreme Trockenheit den Pilzes massiv unterdrückt haben.

Dabei wurden besondere Anstrengungen unternommen, um die Applikation und die biologische Wirksamkeit im Freiland zu optimieren. Dies galt vor allen für folgende Aspekte:

- Verbesserung der Applikationsqualität (gleichmäßiger Spritzbelag)
- Regenfestigkeit
- UV-Schutz
- Schutz vor Austrocknung

Um diese Ziele zu erreichen, wurde der Zusatz unterschiedlicher Formulierungshilfsstoffe geprüft. Daraufhin wurden drei Substanzen selektiert und den frisch fermentierten Bakterien vor der Applikation zugesetzt.

Um die Ergebnisse der Gewächshaus-Tests im Freiland zu bestätigen, sind also weitere Versuche im Weinberg unter günstigeren Infektionsbedingungen erforderlich. Der Fakt „optimale Infektionsbedingungen“ wird aus dem Grunde betont, weil der Kooperationspartner in Weinsberg trotz künstlicher Inokulation und Einsatz einer Beregnungsanlage in 2003 keinen Befallsanstieg in der Versuchsanlage erzielen konnte.

Unabhängig von dieser besonderen Situation in der Vegetationsperiode 2003 besteht seitens des BMVEL die Möglichkeit, einen Einsatz der im Rahmen dieses Projektes selektierten Antagonisten bei anderen Pathosystemen (verwandten Pilzen von *P. viticola*) zu prüfen. Hier bietet sich in erster Linie *Phytophthora infestans* (Erreger der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel) an, zumal dieser Schadpilz im Rahmen des Vor-Screenings Anwendung fand (Dual-Kultur-Test). Eine Reduzierung/Eliminierung

des Einsatzes von Kupfer steht auch im Falle der Bekämpfung von *Venturia inaequalis* (Erreger des Apfelschorfs) im ökologischen Apfelanbau an. Auch hier ist die Verwendung bakterieller Antagonisten denkbar.

Um die Datenbasis hinsichtlich des Freiland Einsatzes möglichst rasch zu vergrößern, sollten in den vor uns liegenden Vegetationsperioden ökologisch wirtschaftende Pilotbetriebe einbezogen werden. Auf diese Weise könnten mehr Versuchsglieder an unterschiedlichen Standorten mit jeweils individuellen Befallssituationen gegenübergestellt werden. Ein solches Projekt bietet sich auch vor dem Hintergrund knapper Kassen an, da der Anteil der kostenintensiven Grundlagenforschung deutlich reduziert werden würde.

4. Zusammenfassung

Im vorliegenden Projekt wurde der Einsatz bakterieller Antagonisten als Kupferersatz zur Bekämpfung von *Plasmopara viticola*, dem Erreger des Falschen Mehltaus der Weinrebe, im ökologischen Weinbau optimiert. Mit Hilfe des Dual-Kultur-Tests wurden sechs bakterielle Antagonisten aus einer vorhandenen Antagonisten-Stammsammlung selektiert (Testpilze: *Pythium ultimum*; *Phytophthora infestans*). Im Blattscheiben-Test konnte mit den ausgewählten Isolaten eine Befallsreduzierung auf unter 5 % Befallsstärke erzielt werden. Der Befall in der unbehandelten Kontrolle schwankte je nach Ansatz zwischen 19 % und 35 %. An Topfreben unter Gewächshausbedingungen zeigte sich ebenfalls eine gute biologische Wirksamkeit gegen *P. viticola*. Die Kontrollpflanzen wiesen Befallswerte zwischen 60 % und 77 % Befallsstärke auf, während die Blätter der Prüfglieder weniger als 5 % Befallsstärke zeigten. Zur Eliminierung des Kupferanteils wurden für Versuche im Freiland drei hochwirksame Isolate ausgewählt und in die Bekämpfungsstrategie „Öko-Standard“ integriert. Die Isolate gehörten den Gattungen *Pseudomonas* spp. und *Bacillus* spp. an. Um die Wirksamkeit im Freiland zu steigern, wurden Formulierungshilfsstoffe ausgewählt, die den Bakterien kurz vor der Applikation zugesetzt wurden. Dabei fanden die Substanzen Xanthan gum, Trehalose und PHYTO-VITAL® Anwendung. Die Substanz PHYTO-VITAL® zeigte an Topfreben eine biologische Wirkung gegen *P. viticola*. Aufgrund des extremen Sommers im Jahr 2003 war die Befallssituation im Weinberg so gering, dass keine aussagekräftigen Ergebnisse zum Einsatz unter Freilandbedingungen gemacht werden konnten. Studien zur Etablierung der

Antagonisten auf dem Rebblatt haben gezeigt, dass die Blätter der bakterienbehandelten Versuchsglieder Bakteriendichten aufwiesen, die um etwa eine Zehnerpotenz höher lagen als die mit Kupfer behandelten Blätter. Um mögliche Gärbeeinflussungen zu erfassen, wurden Mikrovinifikationen durchgeführt. Bisher zeigten sich keine Abweichungen vom kupferhaltigen Versuchsglied „Öko-Standard“. Dieser Versuchsteil wird erst im Frühjahr 2004 mit der sensorischen Prüfung und der Weinanalyse abgeschlossen werden.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Das Hauptziel des Forschungsvorhabens wurde im Projektangebot folgendermaßen formuliert:

„Aus diesem Grunde ist das Gesamtziel des Vorhabens die praxisgerechte Einarbeitung der Applikation bakterieller Antagonisten gegen den Erreger des Falschen Mehltaus der Rebe in ein vorhandenes Bekämpfungskonzept des ökologischen Weinbaus („Öko-Standard“), welches alle anderen Schaderreger der Rebe berücksichtigt.“

Dieses Ziel wurde erreicht, auch wenn aufgrund der Witterungsbedingungen im Jahr 2003 die Bewertung der Maßnahmen nicht erfolgen konnte. Auf der Basis der selektierten Antagonisten und in Verbindung mit Formulierungshilfsstoffen konnte der geplante Kupferersatz im Bekämpfungskonzept „Öko-Standard“ realisiert werden. Der Begriff „praxisrelevant“ wurden im Projektangebot bewusst gewählt, da in der Vergangenheit umständlich anzusetzende Applikationslösungen Anwendung fanden oder diese nur mit spezieller Düsenausstattung ausgebracht werden konnten. Somit ist die Überleitung zu weiteren, im Projektangebot formulierten Zielen gegeben:

„Die im Rahmen dieses Projektes selektierten antagonistisch wirksamen Bakterien sollen zunächst kostengünstig großtechnisch produziert werden. Im zweiten Schritt erfolgt die Anbringung einer Formulierung. In beiden Fällen soll die Lagerfähigkeit über mindestens eine Vegetationsperiode berücksichtigt werden. Da in diesem Bereich bei keinem der Partner der beteiligten Forschungseinrichtungen umfassende Kenntnisse vorliegen, soll dieser Projektteil von einem erfahrenen Unterauftragnehmer kompetent abgedeckt werden.“

Hervorzuheben ist, dass keine applikationstechnischen Probleme aufgetreten sind. Dennoch wäre wünschenswert, die Formulierung direkt bei der Fermentation zu integrieren oder zumindest alle Formulierungshilfsstoffe in Form einer Gesamtlösung (oder in Granulatform) zuzusetzen. Die beschriebene Vorgehensweise des separaten Zusatzes kurz vor der Applikation ist zwar auch unter Praxisbedingungen

gut möglich, eine Vereinfachung wäre trotzdem mit Blick auf die hektische Rebschutzpraxis zu empfehlen. Bezüglich der längerfristigen Lagerfähigkeit der Bakterien sind Defizite zu verzeichnen, insbesondere im Falle der Gattung *Pseudomonas* sp.

Die Durchsicht der einzelnen Arbeitspakete und definierten Meilensteine zeigte, dass es im Bereich des Technologie- und Wissenstransfers große Defizite gab. Diese sind allerdings vor dem Hintergrund der fehlenden Daten aus den Freilanduntersuchungen zu erklären. Aufgrund der geringen Datenbasis zum Einsatz bakterieller Antagonisten als Kupferersatz im Freiland wurde der Technologie- und Wissenstransfer sehr verhalten umgesetzt.

Ein weiteres Ziel bzw. Bestandteil des Projektes ist die Freilandprüfung auf ökologisch bewirtschafteten Weinbergen der beteiligten Forschungseinrichtungen. Im Falle des Kooperationspartners LVWO Weinsberg erfolgte während der Projektlaufzeit die Umstellung des Standortes „Burg Wildeck“ von der ökologischen zur integrierten Bewirtschaftungsweise. In zukünftigen Projekten sollte sichergestellt werden, dass die Versuchsfläche während der gesamten Projektlaufzeit ökologisch bewirtschaftet wird.

Zu einer erfolgreichen Praxiseinführung gehört auch die Registrierung oder Zulassung der Substanz bzw. des Organismus, die/der als Kupferersatz fungieren soll. In diesem Bereich herrscht noch viel Unklarheit. Die wissenschaftlichen Arbeitsgruppen aber auch die kleinen und mittleren Betriebe, die sich mit der Erforschung oder Produktion mikrobiologischer Pflanzenschutzmittel befassen, erhoffen sich im Rahmen des „Dritten Fachgespräches zum biologischen Pflanzenschutz“ (Thema: Kommerzialisierung mikrobiologischer Pflanzenschutzmittel) ökonomisch interessante Perspektiven und keine Sackgassen. Die mit diesem Schlussbericht vorgelegten Studien zur Etablierung der bakteriellen Antagonisten auf der Reb-Phylloplane könnten für die mögliche Kommerzialisierung von großer Bedeutung sein.

6. Relevante Literatur

- Baker, R.E. and Dunn, P.E. (eds.) (1990): New directions in biological control. Alan R. Liss., Inc. New York.
- Berkelmann-Löhnertz (2002): Copper replacement in organic viticulture – state of the art in legislation and research. 10th International Conference on Cultivation Techniques and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing and Viticulture, Weinsberg (Germany), 4. und 7. February 2002, 123-126
- Blaeser, P.(1999): Isolierung und Charakterisierung von Pflanzeninhaltsstoffen mit fungizider Wirkung. Shaker Verlag; Reihe: Berichte aus der Agrarwissenschaft. 156 Seiten; ISBN: 3-8265-6792-7
- Deloire, A.; Kraeva, E.; Dai, G.H.; Renault, A.S.; Rochard, J.; Chatelain, C.; Carbonneau, A. & Andary, C. (1998): Les mécanismes de défense de la vigne. Des utilisations possibles pour lutter contre les pathogènes. *Phytoma*, 510, 46-51.
- Gärtel, W. (1957): Untersuchungen über den Kupfergehalt von Weinberg- und Rebschulböden. *Weinberg und Keller* 13, 463 - 471.
- Kast, W.K. (2001): Rebschutz im ökologischen Weinbau - wo geht´s hin? Untersuchungen zu Alternativen für den Einsatz kupferhaltiger Mittel. 37. Weinbau-Tagung in der Forschungsanstalt Geisenheim, Berichte der Weinbau-Tagung Band 5, 23 – 26.
- Schmitt, A.; Latten, J. & Scherer, M. (1995): Pflanzenextrakte zur Krankheitsprophylaxe im Weinbau. In: Hampl, et al. (eds.): Forschung im ökologischen Weinbau - Boden- und Pflanzenpflege, Weinqualität und BWL. Stiftung Ökologie und Landbau, SÖL-Sonderausgabe 64, 65 – 68.
- Speiser, B., Häseli, A., Berner, A. und Niggli, U. (1993): Wirkung, ökotoxikologische Eigenschaften und Verhalten in Pflanzen des Fungizides Kaliumphosphit – Beurteilung im Hinblick auf einen Einsatz im ökologischen Landbau. In: U. Zenger (ed.): Forschung im ökologischen Landbau. SÖL-Sonderausgabe 42, Stiftung Ökologie und Landbau, Bad Dürkheim, 423 – 428.
- Tilcher, R. (1996): Untersuchungen zur Biologischen Bekämpfung des Falschen Mehltaus der Weinrebe (*Plasmopara viticola* (Berk & Curt.) Berl. und de Toni) durch bakterielle Antagonisten. Diss. Universität Göttingen. Geisenheimer Berichte Band 23.
- Cohen, Y. (2001): The BABA story of induced resistance. *Phytoparasitica* 29: 375 - 378.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, JP. (1997): Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopath* 35: 235 – 270.
- Wei, Z-M., Laby, R.J., Zumoff, CH., Bauer, DW., He, SY., Collmer, A., Beer, SV. (1992): Harpin, Elicitor of Hypersensitive Response Produced by the Plant Pathogen *Erwinia amylovora* *Science* 257: 85 – 88.
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F. (1993): Active oxygen species in the induction of plant systematic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262, 1883.
- Basler, P., Wolff, M., und Gehr, Eva (2000): Angepasste Rebsorten für den ökologischen Weinbau. *Ökologie & Landbau* 28 (2), 45-47.
- Tilcher, R., Wolf, G.A. and Brendel, G. (1994): Effects of microbial antagonists on leaf infestation, sporangia, germination and zoospore behavior of *Plasmopara viticola* (Berk.&Curtis) Berl. & de toni *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, 59: 919 – 929.
- Kast, W.K. and Heller, W. (1999): Burg Wildeck, ein staatlicher Öko-Weinbaubetrieb in Württemberg – Erfahrungen im Jahr 1999. Infodienst der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau, Weinsberg, www.lvwo.bwl.de.
- Patzwahl, W. and Kopf, A. (1998): Ohne Kupfer erfolgreich gegen den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) der Rebe? *Ökologie und Landbau* 105, p.45.
- Seddon, B. and Schmitt, A. (1999): Integrated biological control of fungal plant pathogens using natural products. In: *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*; 12th International Symposium May 24th – 29th 1998; Intercept, Andover, UK; Lyr, Russell and Sisler (Eds.), p. 423 – 428.

Geisenheim, 24. November 2003

.....
Prof. Dr. Beate Berkelmann-Löhnertz