

(19) BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

# PATENTSCHRIFT

(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 283 553 A5**



Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz  
der DDR vom 27.10.1983  
in Übereinstimmung mit den entsprechenden  
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 01 N 63/04

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

---

(21)	DD A 01 N / 321 909 2	(22)	17.11.88	(44)	17.10.90
(31)	6046/87	(32)	17.11.87	(33)	DK

---

(71) siehe (73)  
(72) Ruby, Ione N., DK  
(73) NOVO INDUSTRI A/S, Dänemark, DK  
(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

---

**(54) Fungizid wirkendes Prinzip**

---

(55) fungizides Prinzip; Pilz; Stamm Cercospora; Bekämpfung; Pflanzen; Tiere

(57) Die Erfindung betrifft ein fungizid wirkendes Prinzip, das durch Kultivierung eines Pilzes vom Stamme Cercospora erhaltlich ist. Das Prinzip kann zur Bekämpfung von Pilzen in Pflanzen und Tieren, einschließlich Säugetieren, verwendet werden.

ISSN 0433-6461

8 Seiten

**Patentansprüche:**

1. Fungizide Zusammensetzung aus einer wirksamen Menge eines fungizid wirkenden Prinzips, **dadurch gekennzeichnet**, daß es durch Kultivierung eines Pilzes vom Stamm *Cercospora* und eventuell in Verbindung mit einem agrochemisch und/oder physiologisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel erhältlich ist.
2. Fungizide Zusammensetzung gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß das fungizid wirkende Prinzip mit einem oder mehreren anderen aktiven Materialien kombiniert ist.
3. Fungizide Zusammensetzung gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die genannten anderen aktiven Materialien aus Bioziden, Pestiziden, Herbiziden, Insektiziden, Nematoziden, Acariziden und Fungiziden ausgewählt werden.
4. Fungizide Zusammensetzung gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die genannten anderen aktiven Materialien aus Pflanzennährstoffen, Pflanzenwuchsstoffen und Düngemitteln ausgewählt werden.
5. Fungizide Zusammensetzung gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die genannten anderen aktiven Materialien aus Antibiotika und Sulfonamiden ausgewählt werden.
6. Fungizide Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Fungizid wirkende Prinzip aus einer effektiven Zahl lebensfähiger Einheiten (Sporen und/oder Myzel) eines Pilzes des Stammes *Cercospora* besteht, und daß diese in einem verträglichen Medium suspendiert sind.
7. Fungizides Prinzip oder fungizide Zusammensetzung gemäß Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der genannte Pilz *Cercospora fusimaculans* ist, oder eine Mutante oder ein gentechnologisches Umwandlungsprodukt davon, das die gleiche charakteristische Fähigkeit zur Produktion des genannten aktiven Prinzips hat.
8. Fungizides Prinzip oder fungizide Zusammensetzung gemäß Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß der genannte Pilz die Art *Cercospora fusimaculans* Atk ist, deponiert beim Centraalbureau voor Schimmelcultures am 22. Oktober 1987 und bezeichnet als Neuzugang Nr. CBS 616.87, oder eine Mutante oder ein gentechnologisches Umwandlungsprodukt davon, das die gleiche charakteristische Fähigkeit zur Produktion des genannten aktiven Prinzips hat.
9. Verfahren zur Bekämpfung von Pilzen in Pflanzen, **dadurch gekennzeichnet**, daß
  - a.) eine effektive Menge eines fungizid wirkenden Prinzips, erhältlich durch Kultivierung eines Pilzes vom Stamme *Cercospora*, auf die zu behandelnde Region aufgebracht wird, oder
  - b.) eine effektive Menge einer fungiziden Zusammensetzung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 auf die zu behandelnde Region aufgebracht wird.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9 b, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zu bekämpfenden Pilze zu den Arten *Botrytis*, *Rhizomucor*, *Fusarium*, *Pyricularia*, *Penicillium* und/oder *Rhizopus* gehören.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß der genannte Pilz *Botrytis* ist.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß das genannte *Botrytis* *Botrytis cinerea* ist.
13. Verfahren zur Herstellung eines fungizid wirkenden Prinzips, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Pilz, der zum Stamm *Cercospora* gehört, in Gegenwart von assimilierbaren Stickstoff-, Kohlenstoff- und Sauerstoffquellen zusammen mit lebenswichtigen Nährstoffen kultiviert wird und das genannte wirksame Prinzip abgetrennt wird.
14. Verfahren gemäß Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß das genannte wirksame Prinzip aus der Kulturbrühe gewonnen wird.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß das genannte wirksame Prinzip dadurch gewonnen wird, daß die genannte Kulturbrühe einer Adsorptionschromatographie und anschließenden Vakuumeinengung unterworfen wird.
16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß der genannte Pilz *Cercospora fusimaculans* ist, oder eine Mutante oder gentechnologische Umwandlungsform davon, die die gleiche charakteristische Fähigkeit zur Produktion des genannten wirksamen Prinzips haben.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß der genannte Pilz *Cercospora fusimaculans* Atk, deponiert beim Centraalbureau voor Schimmelcultures am 22. Oktober 1987 und bezeichnet als Neuzugang Nr. CBS 616.87, oder eine Mutante oder eine gentechnologische Umwandlungsform davon ist, die die gleiche charakteristische Fähigkeit zur Produktion des genannten wirksamen Prinzips haben.

### Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein biochemisch wirksames Prinzip, erhältlich aus Pilzkulturen des Stammes *Cercospora*, auf fungizide Zusammensetzungen aus einer fungizid wirkenden Menge des genannten Prinzips, agrotechnisch oder physiologisch verträglichen Verdünnungs- und/oder Trägermitteln und wahlweise weiteren aktiven Substanzen, und auf die Verwendung des genannten Prinzips und fungizider Zusammensetzungen zur Bekämpfung von Pilzen in Pflanzen oder Tieren, einschließlich Säugetieren sowie als Konservierungsmittel in Nahrungsmitteln, Farben und Holz.

### Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Pilze wurden bisher in Pflanzen durch Aufbringen anorganischer oder organischer Fungizide auf das zu behandelnde Gebiet bekämpft.

Solche Fungizide sind teuer und energieverbrauchend bei ihrer Herstellung, und häufig sind sie bei der Bekämpfung der Pilze nicht sehr wirksam. Dies liegt oft an den klimatischen oder Umweltbedingungen, die in dem Gebiet vorherrschen, oder an der Anwendungszeit. Auch führt die Verwendung eines Fungizids über einen längeren Zeitraum zur Ausbildung einer Resistenz der Pilze gegenüber dem Fungizid.

Die meisten der bekannten Fungizide, die Fremdkörper für die Ökosysteme, in denen sie verwendet werden, darstellen, neigen zur Akkumulation und zeigen eventuell unerwünschte Nebenwirkungen.

### Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, biologische Fungizide zu entwickeln, die leicht in der Natur abgebaut werden können und deren Herstellung nicht so große Energiemengen erfordert wie die chemische Synthese der meisten bekannten Fungizide.

### Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise gefunden, daß Pilze aus dem Stamm *Cercospora* in dieser Hinsicht interessante Eigenschaften zeigen.

Der Stamm *Cercospora* ist weltweit als Verursacher von Blattfleckenkrankheiten einer großen Zahl von Wirtspflanzen der verschiedensten Arten bekannt. Einige Arten von *Cercospora* sind dafür bekannt, die verschiedensten Stoffwechselprodukte zu erzeugen, zum Beispiel

*C. beticola* produziert Fulvinsäure (Sakaki, T., Ichihara, A., Sakamura, S. Isolierung von Fulvinsäure aus *Cercospora beticola*. *Agric. biol. Chem.* 45 [5], [1981], 1275–1276) und ein gelbes Phytotoxin (S. S. Martin, M. P. Steinkamp. Die gelben Phytotoxine von *Cercospora beticola*. *Proc. Int. Bot. Congr.* 13, [1981], 296).

*C. kikuchii* produziert Cercosporin (S. Matsueda, K. Takagaki, M. Shimoyama und A. Shiota. Untersuchungen über Pilzprodukte. V. Antimicrobielle Aspekte von Chinon-Derivaten. *Yakugaku Zasshi* 100[9], [1980], 900–902) und Ergosterol-5,8-peroxid (S. Matsueda, M. Shimoyama, T. Imaizumi, Y. Taushima. Untersuchungen über Pilzprodukte. IV. Biologische Effekte von Ergosterol-5,8-peroxid. *Yakugaku Zasshi* (102[4], [1982], 347–351), Matsueda et al. fanden, daß Cercosporin das Wachstum von *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* und *Candida japonica* inhibiert. Cercosporin wurde in Form roter Kristalle isoliert (Pfizer Handbook of Microbial Metabolites, McGraw-Hill Book Co. Inc. N. Y. Toronto London) von Shimpei Kuyama und Teiichi Tamura. *J. Am. Chem. Soc.* 79, (1957), 5725–5726.

*C. arachidicola* produziert einen Anthrachinon-ähnlichen Metaboliten (A. Stoessl, J. B. Stothers, Minor anthraquinonoid metabolites of *Cercospora arachidicola*. *Can. J. Chem.* 63[6] [1985], 1258–1262).

*C. cruenta* produziert Stoffwechselprodukte, die mit Abszissäure verwandt sind (Takayuki Oritani, Kyohei Yamashita, Isolierung und Struktur von 4'-Hydroxy- $\gamma$ -ionyliden-essigsäure aus *Cercospora cruenta*, einem Pilz, der (+)-Abszissäure produziert. *Agric. Biol. Chem.* 51[1], [1987], 275–278) wie Mutastein (Japanisches Patent Nr. 48920, veröffentlicht 861027).

*C. rosicola* produziert Abszissäure (Japanisches Patent Nr. 192674, registriert 8211102).

*C. fusimaculans* ist aus einer Reihe von Gräsern isoliert worden (M. B. Ellis. *More dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institut, Kew, Surrey, England [1976]), und es wurde berichtet, daß dadurch die Blattkrankheit von *Sorghum* spp. bewirkt wird (G. C. Wall, L. K. Mughogho, R. A. Frederiksen, G. N. Odvody. Foliar disease of sorghum spp. caused by *Cercospora fusimaculans*. *Plant Dis* 71[8], [1987], 759–760), wie auch die von *Bajra Pennisetum typhoides* (K. S. Patel. *A. Cercospora fusimaculans leaf spot disease of Bajra Pennisetum typhoides in Gujarat*. *Curr. Sci. [Bangalore]* 42[1], 34). Bisher gibt es keine Aufzeichnungen darüber, daß *C. fusimaculans* ein fungizid wirkendes Prinzip produziert.

Wie bereits erwähnt, wurde überraschenderweise gefunden, daß Pilze aus dem Stamm *Cercospora* interessante fungizide Eigenschaften haben. Infolgedessen bezieht sich diese Erfindung auf ein biochemisch aktives Prinzip, erhältlich aus Pilzkulturen des Stammes *Cercospora*, mit einer einzigartigen fungiziden Wirkung.

Damit übereinstimmend bezieht sich die Erfindung in einem zweiten Aspekt auf eine fungizide Zusammensetzung aus einer wirksamen Menge eines fungizid wirkenden Prinzips, erhältlich aus Pilzkulturen des Stammes *Cercospora*, und aus einem agrochemisch und/oder physiologisch verträglichen Träger oder Verdüner.

In einem weiteren Aspekt bezieht sich die Erfindung auf eine fungizide Zusammensetzung aus einer Suspension einer wirksamen Anzahl von Sporen oder Myzel eines Pilzes vom Stamme *Cercospora* in einem verträglichen Medium.

In einem noch weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf eine Methode zur Bekämpfung von Pilzen in Pflanzen und Tieren, einschließlich Säugetieren, bei der eine wirksame Menge eines fungizid wirkenden Prinzips, erhältlich aus einer Pilzkultur des Stammes *Cercospora*, auf eine zu behandelnde Region aufgebracht wird. In diesem Aspekt der Erfindung ist auch die Bekämpfung und Kontrolle von Pilzen in Nahrungsmitteln, Holz, Farbe und ähnlichem, einschließlich Wachstumsmedien für Mikroorganismen, enthalten.

In einem fünften Aspekt bezieht sich diese Erfindung auf die Verwendung eines fungizid wirkenden Prinzips, erhältlich aus Pilzkulturen des Stammes *Cercospora*, zur Kontrolle von Pilzen in Pflanzen oder Tieren, einschließlich Säugetieren. Ein sechster Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines fungizid wirkenden Prinzips durch Kultivieren eines Pilzes vom Stamme *Cercospora* und Gewinnung des genannten wirksamen Prinzips.

Eine Zucht des Stammes *Cercospora*, *Cercospora fusimaculans* Atk wurde beim Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), P.O. Box 273, NL-3740 AB BAARN, Holland für Zwecke des Patentverfahrens am unten angegebenen Datum hinterlegt. CBS garantiert als internationaler Depositor, autorisiert durch den Budapester Vertrag, die Permanenz des deponierten Materials in Übereinstimmung mit Punkt 9 des genannten Vertrages.

Datum der Deponierung: 22. Oktober 1987  
Deponierungsreferenz: *Cercospora fusimaculans* Atk  
CBS-Bezeichnung: CBS 616,87

Wie gezeigt bezieht sich diese Erfindung in ihrem ersten Aspekt auf ein fungizid wirkendes Prinzip, erhältlich aus Pilzkulturen des Stammes *Cercospora*.

In ihrem zweiten Aspekt bezieht sich die Erfindung auf eine fungizid wirkende Zusammensetzung aus einer wirksamen Menge eines fungizid wirkenden Prinzips erhältlich aus Pilzkulturen des Stammes *Cercospora* und einem agrochemisch und/oder physiologisch verträglichen Träger oder Verdünner.

In Abhängigkeit von den Umständen wie Pflanzen, in der die Pilze bekämpft werden sollen, Umweltbedingungen oder anderen Faktoren kann die Zusammensetzung der Erfindung zusätzlich zu dem genannten, fungizid wirkenden Prinzip auch andere Wirkstoffe wie andere Biozide, Pestizide, Herbizide, Insektizide, Nematozide, Akarizide oder Pflanzennährstoffe oder Düngemittel enthalten.

Zur Bekämpfung von Pilzen in Tieren würde die Zusammensetzung der Erfindung gewöhnlich das genannte wirksame Prinzip selbst und einen physiologisch verträglichen Träger oder Verdünner umfassen, sie kann aber auch mit anderen Wirkstoffen wie zum Beispiel einem Antibiotikum kombiniert werden.

In einem speziellen Aspekt der Erfindung wird eine Zusammensetzung aus einer Suspension einer wirksamen Anzahl von Sporen oder Myzel eines Pilzes des Stammes *Cercospora* in einem verträglichen Medium zubereitet.

Die genannte Zusammensetzung wird am besten hergestellt durch Verwendung eines flüssigen Kulturmediums zur Herstellung des Pilzes, dieses Medium wird anschließend auf eine geeignete Anzahl lebensfähiger Einheiten (Sporen und/oder Myzel) pro ml, gewöhnlich im Bereich von  $10^2$ - $10^{10}$ , vorzugsweise von etwa  $10^4$  bis etwa  $10^6$ , verdünnt.

Anschließend wird die genannte Suspension auf die zu behandelnde Fläche aufgebracht. Die auf dem genannten Gebiet aufgebrachte Menge kann in Abhängigkeit von den oben erwähnten Umständen variieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das genannte fungizid wirkende Prinzip durch Kultivierung eines Pilzes des Stammes *Cercospora fusimaculans* erhalten, und in einer besonders bevorzugten Form ist der genannte Stamm *Cercospora fusimaculans* Atk, der am 22. Oktober 1987 beim Centraalbureau voor Schimmelcultures deponiert und als Zugang Nr. 616.87 eingetragen wurde.

Eine fungizide Zusammensetzung gemäß der Erfindung mit dem fungizid wirkenden Prinzip als Wirkstoff kann für landwirtschaftliche und gärtnerische Anwendungen zusammengestellt werden durch Mischen des wirksamen Prinzips mit geeigneten inerten und verträglichen Trägern oder Verdünnungsmitteln, um eine Zusammenstellung zu erhalten, wie sie allgemein in agrikulturellen Zusammensetzungen, wie benetzbare Pulver, emulgierbares Konzentrat, granuliert Formulierung, wasserlösliches Pulver, Alginat, Xanthan-Gummi und/oder Aerosol, verwendet werden. Als feste Träger können Bentonit, Diatomeenerde, Apatit, Gips, Talk, Pyrophyllit, Vermiculit, gemahlene Muschelschalen und Ton erwähnt werden. Zum Zwecke der Herstellung einer homogenen und stabilen Formulierung kann auch ein oberflächenaktives Mittel zugesetzt werden.

Verdüner oder Träger in den Zusammensetzungen der Erfindung können wie erwähnt Feststoff oder Flüssigkeit sein, wahlweise in Verbindung mit einem oberflächenaktiven Stoff, zum Beispiel einem Dispersionsmittel, Emulgator oder Netzmittel. Geeignete oberflächenaktive Mittel umfassen anionische Verbindungen wie Carboxylate, zum Beispiel ein Metall-carboxylat einer langkettigen Fettsäure; ein N-Acyl-sarcosinat; Mono- oder Diester von Phosphorsäure mit Fettalkohol-ethoxylaten oder Salze solcher Ester; Fettalkoholsulfate wie Natrium-dodecylsulfat, Natriumoctadecylsulfat oder Natrium-cetylsulfat; ethoxylierte Fettalkoholsulfate; ethoxylierte Alkylphenolsulfate; Ligninsulfonate; Petroleumsulfonate; Alkylarylsulfonate wie Alkylbenzensulfonate oder niedrige Alkyl-naphthalensulfonate, zum Beispiel Butylnaphthalensulfonat; Salze sulfonierter Naphthalen-Formaldehyd-Kondensate; oder komplexere Sulfonate wie Amidosulfonate, zum Beispiel das sulfonierete Kondensationsprodukt von Oleinsäure und N-Methyl-aurin oder Sulfobernsteinsäuredialkylestern, zum Beispiel Natriooxysulfo-bernsteinsäuredioctylester, Nichtionische Agentien umfassen Kondensationsprodukte von Fettsäureestern, Fettalkoholen, Fettsäureamiden oder Fettalkyl- oder -alkenyl-substituierten Phenolen mit Ethylenoxid, Fettestern mehrwertiger Alkoholether, zum Beispiel Sorbitan-fettsäureestern, Kondensationsprodukte solcher Ester mit Ethylenoxid, zum Beispiel Polyoxyethylensorbitan-fettsäureestern, Blockcopolymeren von Ethylenoxid und Propylenoxid, Acetylen glykolen wie 2,4,7,9-Tetraethyldec-5-in-4,7-diol, oder ethoxylierten Acetylen glykolen. Beispiele kationischer oberflächenaktiver Substanzen umfassen zum Beispiel aliphatische Mono-, Di- oder Polyamine als Acetat, Naphthenat oder Oleat; ein sauerstoff-haltiges Amin wie Aminoxid oder polyoxyethylenalkylamine; ein amid-verknüpftes Amin, dargestellt durch Kondensation einer Carbonsäure mit einem Di- oder Polyamin, oder ein quartäres Ammoniumsalz.

Die Zusammensetzungen der Erfindung können jede bekannte Form von Agrochemikalien haben, zum Beispiel Lösung, Dispersion, wäßrige Emulsion, Stäubepulver, Saatbehandlungsmittel, dispergierbares Pulver, emulgierbares Konzentrat oder Granuli. Mehr noch, sie können in einer für die direkte Aufbringung geeigneten Form oder als Konzentrat oder Primärzusammensetzung vorliegen, die die Verdünnung mit einer geeigneten Menge Wasser oder einem anderen Verdünnungsmittel vor der Anwendung erfordern. Ein emulgierbares Konzentrat umfaßt den Wirkstoff, gelöst in einem mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel, das in Gegenwart eines Emulgators eine Emulsion mit Wasser bildet.

Ein Stäubepulver umfaßt den Wirkstoff, innig vermischt und vermahlen mit einem festen, staubförmigen Verdünnungsmittel, zum Beispiel Kaolin.

Ein granulierter Feststoff umfaßt den Wirkstoff, zusammen mit ähnlichen Verdünnungsmitteln, die bei Stäubepulvern verwendet werden, aber das Gemisch wird durch bekannte Verfahren granuliert. Alternativ kann er auch den Wirkstoff auf einem vorgranulierten Verdünnungsmittel, zum Beispiel Bleicherde, Attapulgit oder Kalksteingries, absorbiert oder adsorbiert enthalten.

Benetzbare Pulver, Granuli oder Körner enthalten den Wirkstoff gewöhnlich im Gemisch mit einem inerten Verdünnungspulver wie Kaolin und mit einem Überzug.

Ein anderes geeignetes Konzentrat ist ein fließfähiges Suspensionskonzentrat, das durch Vermahlen des Wirkstoffes mit Wasser oder einer anderen Flüssigkeit, einem Netz- und Aufschlammittel gebildet wird. Zur Verwendung bei der Pilzbekämpfung in Tieren, einschließlich Säugetieren, kann das Mittel durch Mischen des genannten wirksamen Prinzips mit geeigneten inerten und verträglichen Trägern, die auf diesem Gebiet zur Verwendung in topischen Formulierungen bekannt sind, hergestellt werden. Die Konzentration des aktiven Prinzips, das hier beschrieben wird, in den Zusammensetzungen der Erfindung kann innerhalb weiter Grenzen schwanken, abhängig von der Art der Zusammenstellung und dem Anwendungsbereich.

In Verbindung hiermit sei erwähnt, daß später erwähnte Versuche gezeigt haben, daß das aktive Prinzip in der Lage ist, Pilze wirksam einzuschränken, in Konzentrationen von 0,5 µg/ml bis 5 µg/ml, die Säugetiere angreifen, und es kann folglich erwartet werden, daß das wirksame Prinzip in Konzentrationen von etwa 0,01 µ/ml bis 10 µ/ml zur Verwendung bei der Pilzbekämpfung in Tieren angewendet werden kann.

In ihrem dritten Aspekt bezieht sich die Erfindung auf eine Methode zur Bekämpfung von Pilzen in Pflanzen und Tieren, einschließlich Säugetieren, worin eine effektive Menge eines fungizid wirksamen Prinzips, erhältlich aus Pilzkulturen des Stammes *Cercospora*, auf die zu behandelnde Region aufgebracht wird.

In Verbindung mit diesem Aspekt können für landwirtschaftliche und gärtnerische Anwendungen die Zusammensetzungen der Erfindung, die auf die zu behandelnde Region aufgebracht werden sollen, direkt auf den Boden als Vor-Auflauf-Behandlung oder auf die Blätter oder Früchte der Pflanzen als Nach-Auflauf-Behandlung aufgebracht werden. In Abhängigkeit von der Pflanze und den Umständen kann die Behandlung zurückgestellt werden, bis an den Pflanzen, in denen die Pilze bekämpft werden sollen, Samen oder Früchte erscheinen.

Das wirksame Präparat, oder die Zusammensetzungen der Erfindung können zum Beispiel durch Spraysen oder Stäuben direkt auf die Pflanze aufgebracht werden, entweder zur Zeit des Erscheinens der Pilze auf der Pflanze oder vor dem Erscheinen des Pilzes als vorbeugende Schutzmaßnahme. In beiden Fällen ist die bevorzugte Aufbringungsart das Besprühen der Blätter. Es ist von genereller Bedeutung, schon in den frühen Stadien des Pflanzenwachstums eine gute Bekämpfung der Pilze zu erreichen, da dies die Zeit ist, während der die Pflanze am meisten geschädigt werden kann. Der Spray oder der Staub kann bequemerweise, wenn es unbedingt nötig ist, ein Herbizid zur Bekämpfung vor oder nach dem Auflaufen enthalten.

Manchmal ist es praktisch, die Wurzeln einer Pflanze vor oder während des Pflanzens, zum Beispiel durch Eintauchen der Wurzeln in eine geeignete flüssige oder feste Zusammenstellung, zu behandeln. Wenn das wirksame Präparat der Erfindung direkt auf die Pflanze aufgebracht wird, ist eine geeignete Aufbringungsrate von 0,001–100 kg pro Hektar einzuhalten, vorzugsweise von 0,05–5 kg pro Hektar.

In dem Verfahren der Erfindung kann das wirksame Präparat allein oder in Kombination mit einem konventionellen Biozid auch auf die Samen oder die Pflanzstelle aufgebracht werden. So kann das Präparat direkt auf den Boden aufgebracht werden, vor, während oder nach dem Drillen, so daß durch die Anwesenheit des Wirkstoffes im Boden das Wachstum der Pilze, die die Samen befallen, eingeschränkt werden kann.

Wenn der Boden direkt behandelt wird, kann das wirksame Präparat allein oder im Gemisch mit dem konventionellen Biozid in irgendeiner Weise aufgebracht werden, die es gestattet, es innig mit dem Boden zu vermischen, zum Beispiel durch Spraysen, Breitstreuen eines körnigen Feststoffes oder durch Aufbringen des Wirkstoffes gleichzeitig mit dem Drillen durch Eingeben gemeinsam mit dem Samen in die Drillmaschine. Eine geeignete Aufbringungsrate liegt innerhalb eines Bereichs von 0,01–20 kg pro Hektar, vorzugsweise von 0,05–10 kg pro Hektar.

Für medizinische und Veterinärzwecke kann die Zusammensetzung der Erfindung auf die zu behandelnde Region aufgebracht werden, wenn die Diagnose durch einen Arzt oder Tierarzt bestätigt worden ist.

Die Zusammensetzungen können in Mengen angewendet werden, die etwa 100 kg fungizid wirkenden Prinzips pro Hektar entsprechen.

Obwohl die vorliegende Erfindung im Detail in Verbindung mit der Bekämpfung von Pilzen in Tieren und Pflanzen beschrieben worden ist, kann auch erwartet werden, daß das fungizid wirkende Prinzip auch zum Holzschutz verwendet wird, indem es zu Holzschutz- und/oder Holzimprägniermitteln zugesetzt wird. Das aktive Prinzip der Erfindung kann erfolgreich auch als Fungizid und Konservierungsmittel in Farben – beides zur Verhinderung eines Wachstums in Farben während der Speicherung sowie eines Wachstums auf dem gestrichenen Objekt wie der Plastroberfläche eines gestrichenen Hauses, verwendet werden.

Weiterhin kann das fungizid wirkende Prinzip der Erfindung wegen seiner geringen Toxizität zur Konservierung von Nahrungsmitteln wie Jams, Marmelade und ähnlichem benutzt werden, wo das Prinzip im Anschluß an den Kochprozeß zugesetzt werden kann.

Das fungizid wirkende Prinzip der Erfindung kann auch als fungizider Zusatz zu Wachstumsmedien verschiedener Mikroorganismen wie *E. coli*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *S. aureus* verwendet werden.

Das fungizid wirkende Prinzip der Erfindung kann extrazellulär sowohl in Oberflächen- als auch in Submerssubstraten, die verschiedene Kohlenhydrat- und Stickstoffquellen enthalten, hergestellt werden. Wenn es im Rohzustand, wie es in den Schüttelflaschen hergestellt wird, angewendet wird, hat es keinen sichtbaren Effekt auf das Wachstum von *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Torulopsis ernobii*, *Rhodotorula ruda*, *Rhodotorula gracilis*, *Hansenula holstii*, *Candida albicans*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus awamori* und *Staphylococcus aureus*.

Es wurde ein inhibierender Effekt auf das Wachstum der Pilze folgender Stämme gefunden:

*Botrytis*, *Rhizomucor*, *Pyricularia*, *Fusarium*, *Penicillium* und speziell *Botrytis cinerea*, *Rhizomucor miehei*, *Pyricularia oryzae*, *Penicillium digitatum*, *Cercospora traversiana*, *Cercospora sorghii*, *Cercospora sesami*, *Cercospora scirpicola*, *Cercospora beticola*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora haji*, *Sclerotinia fructicola*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium decemcellulase*, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium poae*, *Fusarium fugikurai*, *Fusarium longipes*, *Rhizopus oligosporus*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermaphyton*, *Pichia* sp., *Torulopsis spherica*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Candida albicans*, *Trichoderma viride*, *Drechslera australiensis*, *Gibberella fugikuri*, *Phoma herbarum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Penicillium notatum*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium implicatum*, *Penicillium lividum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus cervinus*, *Aspergillus cremens* und viele andere.

Oben wurde gezeigt, daß Matsueda et al. 1980 gefunden haben, daß Cercosporin, eine aus *C. kikuchii* isolierte Verbindung, einen Inhibitoreffekt auf bestimmte Mikroorganismen hat. Aus dem vorhergehenden Abschnitt ergibt sich klar, daß das wirksame Prinzip der Erfindung sich von Cercosporin unterscheidet. Auch ein rotes, von CBS 616.87 produziertes Pigment, das Cercosporin enthalten könnte, konnte leicht, ohne die Wirksamkeit des genannten Prinzips zu beeinflussen, vom wirksamen Prinzip der Erfindung getrennt werden. Das genannte Pigment zeigt keinerlei Inhibition des Wachstums von *Botrytis cinerea*.

Das Prinzip ist über einen weiten Bereich von pH-Werten und Temperaturen wirksam, aber es wird unwirksam, wenn es für etwa eine Minute gekocht wird. Dagegen zeigt sich kein Aktivitätsverlust, wenn die Kulturbrühe 3 Monate lang in einem Kühlschrank aufbewahrt wird.

Es gibt keine Anzeichen von mutagener Aktivität, wenn es in Gegenwart oder Abwesenheit des S-9-Stoffwechselaktivierungssystems getestet wurde (Ames-Test). Die Kulturbrühe, die das Fungizid und lebensfähige Sporen enthält, zeigt keinen Einfluß auf Mäuse, wenn es intraperitoneal in einer Menge von 20 ml pro kg Körpergewicht verabreicht wurde. Das enthält  $3 \times 10^8$  lebensfähige Einheiten.

Die Pilze, die das aktive Prinzip der Erfindung produzieren, wurden als zum Stamm *Cercospora* gehörend identifiziert. Die Kolonien entstehen meist auf der Blattunterseite. Conidiophores faciculate, blaß oliv-braun mit kleinen Flecken. Conidien oft kettenartig, glasartig, fast immer 3–4 konzentrische Kreise, 15–70  $\times$  2–2,5  $\mu$ m.

CBS 616.87 wurde isoliert aus den Blättern von *Panicum maximum*, gesammelt im Dezember 1986 in St. Andrews, Jamaica. Es wurde als *Cercospora fusimaculans* identifiziert. Gleichzeitig wurde eine Anzahl von *Cercospora*-Arten aus *P. maximum*-Blättern isoliert, die ein fungizid wirkendes Prinzip produzieren, und im August 1988 wurde aus den Blättern von *P. maximum*, gesammelt in St. Catherine, Jamaica, eine *Cercospora*-Art isoliert, die eine ähnliche Aktivität produziert. Diese Arten können aus den Blättern vieler verschiedener Gräser (Ellis supra) isoliert werden.

Weiter ist gefunden worden, daß *Cercospora setariae* Atkinson, deponiert im Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, England, und bezeichnet als CMI 161118 und CBS 494.71, die Produktion des fungizid wirkenden Prinzips zeigt.

#### Ausführungsbeispiel

Die den Wirkstoff produzierenden Arten kann man auf Agar wachsen lassen, das folgende Bestandteile in Gramm/Liter enthält: Hefe-Extrakt 4,0, Kalium-dihydrogenphosphat 1,0, Magnesiumsulfat-heptahydrat, 0,1, Glucose 15 und Bacto® Agar 20. Dieses Substrat wird im Autoklaven für 20 oder 40 Minuten auf 121 °C erhitzt und wird danach als YPG-Agar bezeichnet. Die Agar-Schalen enthalten 12 ml YPG-Agar, und nach Impfung werden sie für 7 Tage oder länger bei 20–25 °C im Brutschrank aufbewahrt.

#### Fungizid-Herstellung:

Ein Substrat für Schüttelflaschen wurde mit folgenden Ingredientien pro Liter hergestellt: 4,0 g Hefe-Extrakt, 1,0 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,1 g Magnesiumsulfat-heptahydrat, 15 g Glucose und 0,1 g Pluronic® L61 und entmineralisiertes Wasser. Die Sterilisation erfolgte 20 Minuten lang bei 121 °C. Ein 500-ml-Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml Substrat wurde mit  $10^6$  Sporen aus einer YPG-Agar-Schale, vorher mit *Cercospora fusimaculans* CBS 616.87 geimpft. Die Kolben wurden 3–7 Tage lang mit 230 U/min bei 25 °C geschüttelt, danach wurde die Fermentationslösung zentrifugiert. Die überstehende Lösung, die das Fungizid enthält, wurde dadurch vom Myzel getrennt. Das Myzel wurde verworfen, und die überstehende Lösung wurde hinsichtlich der fungiziden Aktivität analysiert.

Das Fungizid kann auch in Oberflächenkulturen produziert werden.

#### Analyse

$10^6$  Sporen von *Botrytis cinerea* wurden zu 50 ml der folgenden Salze zugesetzt:

Ammoniumhydrogenphosphat	66 mg
Kalium-dihydrogenphosphat	68 mg
Dikalium-hydrogenphosphat	87 mg
Calciumchlorid-dihydrat	7,5 mg
Magnesiumchlorid-hexahydrat	10 mg

aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 1 Liter und 20 Minuten lang bei 121 °C sterilisiert.

Das ganze wurde mit 50 ml YPG-Agar bei einer Temperatur gemischt, die die *Botrytis*-Sporen zum Leben erweckt, am besten geeignet ist der Temperaturbereich von etwa 30–45 °C, bei dem das Agar flüssig ist und die Sporen keinerlei Schaden erleiden. 12 ml dieses Gemisches wurden in 9-cm-Petrischalen gegossen, dann ließ man erstarren. In das Agar wurden 1–5 Löcher gemacht mit 4 mm Durchmesser, und in jedes Loch wurden 15  $\mu$ l Kulturbrühe gegeben.

Die Petrischalen wurden für 2 Tage bei 20–25°C im Brutschrank aufbewahrt. Die Anwesenheit eines Fungizids verrät sich durch eine klare, nicht bewachsene Zone rund um das Loch – wobei die Zone um so größer ist, je stärker das Fungizid. Das stärkste produziert eine klare Zone von 25mm Durchmesser.

#### Extraktion des aktiven Prinzips

Das aktive Prinzip der Erfindung konnte extrahiert werden durch Aberlite XAD-4-Adsorption, nachdem das Adsorbens gründlich mit Aceton, Ethanol und destilliertem Wasser gewaschen worden ist. Dem Aufbringen der Probe auf das Adsorbens folgten mehrere Waschungen mit destilliertem Wasser. Die Elution wurde mit Ethanol und Aceton vorgenommen, und das aktive Prinzip wurde im Vakuum bei Raumtemperatur konzentriert.

#### Anwendungsbeispiele

##### Schutz von Weinbeeren gegen *Botrytis cinerea*

Käuflich erworbene grüne Weinbeeren wurden vereinzelt, gewaschen und getrocknet. Die Stiele wurden an den Früchten belassen. Zwei Löcher, 1 mm tief, wurden mit der Spitze einer Spritze mit  $10^6$  pro ml *Botrytis*-Sporen in die Früchte gemacht. Die Weinbeeren wurden dann für 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Atmosphäre aufbewahrt. Sie wurden dann mit der Kulturbrühe übergossen und etwa 1 Woche unter den Feuchtbedingungen belassen. In einem anderen Fall wurden die Früchte in die Kulturbrühe eingetaucht, und 24 Stunden später wurden sie mit einer Spritze mit *Botrytis*-Sporen angestochen. Auch hier folgt ein etwa 1wöchige Inkubationszeit in einer feuchten Atmosphäre. Die Ergebnisse dieses Versuches sind unten in Tabelle 1 angegeben.

**Tabelle 1**

Art der Behandlung		% Schutz		
1. Tag	2. Tag	Vers. 1	Vers. 2	Vers. 3*
<i>Botrytis cinerea</i>	Wasser	0	0	0
–	Kulturbrühe	66	83	33
Wasser	<i>Botrytis cinerea</i>	0	0	0
Kulturbrühe	–	66	33	66

\* In diesem Versuch wurde eine Art von *Botrytis cinerea* benutzt, die resistent gegen 100 ppm Iprodion (Rhône Poulenc) waren.

Wie man in Tabelle 1 sehen kann, wurden die Weinbeeren, die mit der Kulturbrühe von CBS 616.87 behandelt worden waren, sehr wirksam gegen *Botrytis cinerea* im Vergleich zu den mit Wasser behandelten geschützt. Ein noch höherer Schutzgrad kann erwartet werden, wenn die Sporen nicht in die Weinbeeren injiziert werden. Der Schutz zeigte sich auch zweifelsfrei, wenn *Botrytis cinerea* gegen die bekannten chemischen Fungizide resistent war.

#### Feldversuche zum Schutz gegen *Botrytis cinerea*

##### I: Tomate

Das Fungizid wurde hinsichtlich seiner Fähigkeit getestet, Tomatenpflanzen in Gewächshäusern gegen *Botrytis cinerea* zu schützen. Sowohl die Versuche als auch die Blindversuche bestanden aus 3 Parzellen, jede mit 8 Pflanzen von 75–90 cm Höhe. Auf den Blättern der 8 Pflanzen wurden 100 Beschädigungen angebracht, und sie wurden unmittelbar mit einer 1%igen gefriergetrockneten Probe der Kulturbrühe bis zum Abtropfen besprayed. Die Kontrollversuche wurden mit Wasser besprüht. Vier Stunden später wurde jede Pflanze mit  $4 \times 10^6$  Sporen von *Botrytis cinerea* besprüht. Das Gewächshaus wurde bei einer Temperatur von 18–20°C gehalten und die relative Feuchtigkeit bei etwa 90%, alles für 2 Wochen, danach wurde die Zahl der infizierten Blätter gezählt.

Die Kontrollpflanzen hatten insgesamt 126 Infektionen, während die mit dem *Cercospora*-Fungizid behandelten Pflanzen 44 hatten.

##### II: Erbsen

20%iges Eluat (siehe Extraktion des wirksamen Prinzips) wurde auf Erbsen (Art Bodil) im Feld gesprüht, um zu sehen, wie die Pflanzen gegen natürliche *Botrytis*-Infektion geschützt werden können. Vier Parzellen, jede 30 m<sup>2</sup> groß, wurden für den Versuch benutzt und weitere vier zur Kontrolle. Die folgenden Verbindungen wurden dem Eluat zugesetzt:

0,2% Bevaloid 211, ein Dispersionsmittel,

1% Alcopol, ein oberflächenaktiver Stoff und

1:1 600 Chevron Spray sticker, Ortho-Produkt 2786.

Das erste Besprühen erfolgte zu Beginn der Blüte und das zweite 10 Tage später. Wenn die Schoten voll ausgereift und die Pflanzen trocken geworden waren, wurden je 10 Pflanzen aus jeder Parzelle willkürlich ausgewählt und im Laboratorium auf *Botrytis*-Infektion an Schoten und Stielen untersucht. Die nachstehenden Ergebnisse zeigen die durchschnittliche Infektion pro Parzelle.

Behandlung	% Infektion	
	Schoten	Stiele
Kontrolle	11	63
<i>Cercospora</i> -Fungizid	6	35

#### **Kombination mit Herbiziden**

Petrishalen wurden wie unter „Analyse“ beschrieben vorbereitet und verwendet, um den Einfluß von Herbiziden auf das *Cercospora*-Fungizid zu untersuchen. Es wurde gefunden, daß das Fungizid nicht beeinflußt wurde, wenn es mit Chlorsulfuron 0,05–0,5 mg/ml, Atrazin (1–10 mg/ml) und Simazin (0,1–1 mg/ml) kombiniert wurde. Seine Wirksamkeit wurde leicht erhöht (10–20%), wenn 0,1–10 mg/ml Lasso zugegeben wurden. Die vier Herbizide hatten keine Wirkung auf *Botrytis*, wenn sie einzeln verwendet wurden.

Das Fungizid kann in allen Fällen verwendet werden, wo *Botrytis cinerea* resistent ist gegen die Chemikalien, die heute verwendet werden. Es kann bei Obst und Gemüse verwendet werden, zum Beispiel Weinbeeren, Erdbeeren, Tomaten, Citrus-Früchten und für den Schutz nach der Ernte, zum Beispiel bei Karotten. Es kann auch vorbeugend oder behandelnd bei Pflanzen verwendet werden, die normal von *Botrytis* befallen sind.

#### **Einfluß des Fungizids auf Dermatophyten**

Das von CBS 616.87 produzierte Fungizid wurde an *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* und *Microsporum canis* getestet. Diese sind gerade klinisch isoliert worden und konnten bei 25°C auf Agar kultiviert werden, das folgende Bestandteile in Gramm pro Liter enthielt:

Bacto Yeast Morphology agar 35,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,429,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,92, 5 n NaOH 1 ml · pH 7,1. Dieses Substrat wurde 20 Minuten lang bei 121°C sterilisiert. Myzel der drei Pilze wurde mit sterilen Glaskugeln zerkleinert, und 1 Tropfen wurde in das Zentrum von Petrishalen gegeben, die das gleiche Agar enthielten wie oben, zu dem jedoch *Cercospora*-Fungizid gegeben wurde. Das Fungizid wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/ml bis 5 µg/ml des unter „Extraktion des aktiven Prinzips“ beschriebenen Eluats zugegeben. Griseofulvin wurde zum Vergleich benutzt. Kontrollversuche wurden mit demselben Agar durchgeführt, jedoch ohne Fungizid. Fünf Wiederholungen von jedem Versuch wurden durchgeführt.

Alle Schalen wurden für 5 Tage bei 25°C inkubiert, danach wurden sie hinsichtlich des Pilzwachstums untersucht.

#### **Ergebnisse**

Das *Cercospora*-Fungizid verhindert vollständig das Wachstum der drei Pilze bei allen untersuchten Konzentrationen. Das bedeutet, die MIC beträgt 0,5 µl. Die minimale Inhibitor-Konzentration, MIC, für Griseofulvin beträgt für *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* und *T. mentagrophytes* 1,5 µ/ml, 3 µ/ml bzw. 10 µ/ml.

#### **Holzschutz**

*Poria placenta* und *Gloeophyllum trabeum*, zwei holzbewohnende Pilze, wurden vier Tage lang auf Malzagar bei 25°C kultiviert. Rundfilter von 8 mm Durchmesser wurden mit 25 µl Eluat mit dem fungiziden Prinzip der Erfindung befeuchtet und 20 mm von der Front der aktiv wachsenden Kolonien auf das Agar gebracht. Es gab drei Wiederholungen. Die weitere Inkubation zeigte, daß das Wachstum der zwei Pilze durch das Fungizid stark inhibiert wurde.