

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 50042/2022

(22) Anmeldetag: 28.01.2022

(43) Veröffentlicht am: 15.08.2023

(51) Int. Cl.: **A01N 63/30** (2020.01)

(56) Entgegenhaltungen:

Oula Dorah A. et al. The effectiveness of local strains of *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Strigae* to control *Striga hermonthica* on local maize in western Kenya. Food Sci Nutr. 2020;8:4352–4360. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1732>
Nzioki Henry S. et al. *Striga* Biocontrol on a Toothpick: A Readily Deployable and Inexpensive Method for Smallholder Farmers. Front. Plant Sci., 08 August 2016 Sec. Plant Breeding. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01121>
Jamil Muhammad et al. Current progress in *Striga* management. Plant Physiology, Volume 185, Issue 4, April 2021, Pages 1339–1352, <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab040> Published: 05 February 2021
US 5270039 A
CN 113862156 A

(71) Patentanmelder:

LÜTH Peter Dr.
23970 Wismar (DE)
Toothpick Company Ltd
50100 Kakamega (KE)

(74) Vertreter:

Cunow Gerda Dipl.-Ing. Dr.techn.
1180 Wien (AT)

(54) **BIOLOGISCHES SAATGUTBEHANDLUNGSMITTEL**

(57) Die Erfindung beschreibt ein neuartiges biologisches Saatgutbehandlungsmittel, das als Wirkstoff den Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, Stamm DSM 33471 enthält und zur Bekämpfung des parasitären Unkrautes *Striga hermonthica* an einkeimblättrigen Kulturpflanzen eingesetzt wird sowie die Verwendung desselben.

Zusammenfassung

Die Erfindung beschreibt ein neuartiges biologisches Saatgutbehandlungsmittel, das als Wirkstoff den Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, Stamm DSM 33471 enthält und zur Bekämpfung des parasitären Unkrautes *Striga hermonthica* an einkeimblättrigen Kulturpflanzen eingesetzt wird sowie die Verwendung desselben.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen enthaltend wenigstens einen Wirkstoff gewählt aus einem Pilzstamm aus der Gruppe der Fusarien sowie gegebenenfalls eine Trägersubstanz und/oder weitere Hilfsstoffe.

Parasitäre Unkräuter der Gattung *Striga* führen weltweit zu hohen Ertrags- und Qualitätsverlusten. Insbesondere in der Subsaharazone führt der Befall von Mais (*Zea mays*) und Hirse (z.B. *Sorghum* spp.) mit *Striga hermonthica* jährlich zu Ertragsausfällen von ca. acht Millionen Tonnen (Gressel J., Hanafi A., Head G., Marasas W., Obilana A.B., Ochanda J., Soussi T., Tzotzos G., 2004: Major heretofore intractable biotic constraints to African food security that may be amenable to novel biotechnological solutions. Crop Protection, Vol. 23: 661-689.). Diese Verluste wurden 2003 geschätzt. Seitdem dürfte die durch *S. hermonthica* verursachte Ertragseinbuße noch deutlich gestiegen sein, was zu einer massiven negativen Beeinflussung des Lebens von etwa 300 Millionen Menschen durch die parasitäre Pflanze führt (Pennisi E., 2010: Armed and dangerous. Science, Vol. 327: 804-805).

Trotz erheblicher Bemühungen durch den chemischen Pflanzenschutz und die Pflanzenzüchtung sowie durch kulturtechnische Maßnahmen ist es bisher nicht gelungen, die weitere Ausbreitung des Unkrautes in dieser Region zu verhindern. Getroffene Maßnahmen sind beispielsweise der Anbau von Sorten mit geringerer Anfälligkeit für sie parasitären Unkräuter, der Einsatz des Herbizides Imazapyr an Imazapyr-resistentem Mais (IR-Mais) oder das Pull-Push-Anbauverfahren, bei dem die Leguminose *Desmodium intortum* zwischen die Maisreihen ausgesät wird.

Aus diesem Grund gab es Bestrebungen einen Welkekrankheitserreger von *Striga*, insbesondere *Striga hermonthica*, den Pilz *Fusarium oxysporum*, für die Bekämpfung des Unkrautes zu verwenden (Ndambi B., Cadisch G., Elzein A., Heller, A., 2011: Colonization and control of *Striga hermonthica* by *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, a mycoherbicide component: An anatomical study. Biological Control, Vol. 58: 149-159). Leider konnten auch mit dem Welkekrankheitserreger bisher keine Erfolge erzielt werden. Eine neuste Entwicklung auf diesem Gebiet, die den Pilz *Fusarium oxysporum* einsetzt, erscheint aber vielversprechend (Nzioki H., Oyosi F., Morris C.E., Kaya E., Pilgeram A.L., Baker C., Sands D.C., 2016: Striga Biocontrol on a Toothpick: A Readily Deployable and Inexpensive Method for Smallholder Farmers. Frontier in Plant Science, Vol. 7: Artikel 1121). Trotz einiger Erfolge besteht der wesentliche Nachteil des Verfahrens im hohen manuellen Aufwand der Anwendung. Bislang wird das mit dem Pilz bewachsene Substrat per Hand in die Pflanzlöcher eingebracht, unmittelbar bevor diese mit dem Saatkorn belegt und mit Erde verschlossen werden. Bei Mais mit einer Pflanzenzahl von ca. 60.000 Pflanzen pro Hektar (Zahlen aus Kenia) mag eine solche Technologie noch anwendbar sein, nicht aber bei Hirse oder Reis, wo noch eine bedeutend höhere Pflanzenzahl pro Hektar angebaut wird. Als Lösung für dieses Problem wurde vorgeschlagen, den Pilz an das Saat-

gut anzubinden. Auch hier wurden bereits Versuche vorgenommen (Elzein A., Kroschel J., Leth L.; 2006: Seed treatment technology: An attractive delivery system for controlling root parasitic weed *Striga* with mycoherbicide. Biocontrol Science and Technology, Vol. 16: 3-26.) die bislang aber nicht zu einem kommerziellen Produkt führten. Die Ursache für den bislang geringen Erfolg lag einerseits in der Verwendung von Pilzstämmen, die eine zu geringe Pathogenität gegenüber dem Unkraut aufwiesen und andererseits in einer zu geringen erreichbaren Lagerstabilität des verwendeten Pilzes im Saatgutbehandlungsmittel.

Die vorliegende Erfindung zielt nun darauf ab, ein Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen bereitzustellen, das sowohl eine hohe Wirksamkeit gegen Unkräuter der Gattung *Striga*, insbesondere *Striga hermonthica*, aufweist und andererseits bei Umgebungsbedingungen langzeitlagerstabil ist.

Zur Lösung dieser Aufgabe ist das erfindungsgemäße Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen im Wesentlichen dadurch gekennzeichnet, dass als ein Wirkstoff der Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 enthalten ist. Überraschenderweise konnten im Rahmen spezieller Untersuchungen in Kenia zur Gattung *Fusarium* gehörige Pilzstämmen isoliert werden, die eine sehr hohe Pathogenität gegenüber *Striga hermonthica* aufwiesen. Ebenso überraschend gelang es bei diesen Stämmen zusätzlich zur hohen Pathogenität die Fähigkeit zu einer gesteigerten Aminosäure-Produktion (Methionin) zu selektieren. Bestimmte Aminosäuren haben eine spezifische herbizide Wirkung auf Pflanzen (Fernández-Aparicio M., Bernard A., Falchetto L., Marget P., Chauvel B., Steinberg C., Morris C.E., Gibot-Leclerc S., Boari A., Vurro M., Bohan D.A., Sands D.C., Reboud X., 2017: Investigation of Amino Acids as Herbicides for Control of *Orobanche minor* Parasitism in Red Clover. *Front Plant Sci.* Vol. 8: Artikel 842). Mittels beider Eigenschaften, der hohen Pathogenität und der Produktion von Methionin, sind die *Fusarium*-Stämme ausgezeichnet zur biologischen Bekämpfung von *Striga hermonthica* geeignet. Unter den selektierten *Fusarium*-Stämmen ist in nicht erwarteter Weise eine spezielle Mutante, nämlich *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 darüber hinaus gegenüber dem Fungizid Captan WP50 (Wirkstoff Captan) resistent. Nicht nur die Resistenz gegen Captan WP50 sondern auch die Befähigung von *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 große Mengen an Sporen in einem Substrat zu bilden, erlauben seinen Einsatz in einem Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen.

Eine besonders effiziente Behandlung von Saatgut gelingt, wenn, wie dies einer Weiterbildung der Erfindung entspricht, das Saatgutbehandlungsmittel so weitergebildet ist, dass in dem Mittel 1×10^5 bis 1×10^{10} Kolonie bildende Einheiten von Pilzstämmen aus der Gruppe der *Fusarien* pro Gramm und dass wenigstens 1×10^5 und höchstens 1×10^{10} , vorzugsweise 1×10^6 bis 1×10^9 Kolonie bildende Einheiten des Pilzes *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 pro Gramm enthalten sind. 3. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Kolonie bildende Einheiten wenigstens

eine Gruppe gewählt aus *Konidien, Chlamydosporen oder Myzelresten von Fusarium oxysporum f. sp. strigae, DSM 33471* enthalten ist. Derartige Wirkstoffkonzentrationen ermöglichen nicht nur eine effiziente Bekämpfung des Welkekranheitserregers von Striga, insbesondere *Striga hermonthica*, sondern es gelingt mit derartigen Wirkstoffkonzentrationen, insbesondere der bevorzugten Anzahl von Kolonie bildenden Einheiten überraschenderweise eine Langzeit lagerstabile Zusammensetzung bereitzustellen. Die Lagerung eines derartigen Behandlungsmittels wird vorzugsweise in einem Kühlschrank bei Temperaturen zwischen 4 und 15 °C vorgenommen, jedoch ist das Behandlungsmittel auch bei Umgebungstemperatur von 25 bis 35 °C über mehrere Monate ohne nennenswerten Aktivitätsverlust lagerbar. Das erfindungsgemäße Sporenpulver kann über ein Jahr im Kühlschrank gelagert werden, ohne dass sich die in ihm vorhandene Zahl Kolonie bildender Einheiten deutlich verringert und seine ausgezeichnete Wirkung verloren geht.

Gemäß einer Weiterbildung der Erfindung sind als Kolonie bildende Einheiten wenigstens eine Gruppe gewählt aus *Konidien, Chlamydosporen oder Myzelresten von Fusarium oxysporum f. sp. strigae, DSM 33471* enthalten. Durch die Verwendung von Chlamydosporen in einem Saatgutbehandlungsmittel wird der Nachteil einer zu geringen Lagerstabilität des Präparates am Saatgut überwunden. So ist es möglich, das Saatgut, abhängig von der Pflanzenart, mit einer überraschend geringen Menge einer Pilzsporenformulierung pro Kilogramm zu behandeln. Aus der Literatur bekannte Versuche zur Behandlung von Saatgut mit Pilzmaterial erforderten regelmäßig wesentlich höhere Aufwandmengen. So verwendeten z.B. Ciotola et al. (2000) 20 g eines Sporenpulvers für die Behandlung von nur 1000 Saatkörnern von Sorghum-Hirse (Ciotola M., DiTommaso A., Watson A.K., 2000: Chlamydospore Production, Inoculation Methods and Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* M12-4A, a Biocontrol for *Striga hermonthica*. Biocontrol Science and Technology, Vol. 10: 129-145.).

Durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Pilzstammes ist es überdies überraschender Weise gelungen, ein Saatgutbehandlungsmittel herzustellen, das eine sehr gute Wirkung, mit einer Captan-Resistenz, einer hohen Lagerstabilität und einer sehr geringen Aufwandmenge verbindet. Um trotz der möglichen geringen Einsatzmengen ein gut dosierbares Saatgutbehandlungsmittel zur Verfügung zu haben, ist das erfindungsgemäße Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen, im Wesentlichen so weitergebildet, dass weiterhin als Träger wenigstens ein fester pulverförmiger Träger gewählt aus der Gruppe der Zeolithe, Vermiculite, Diatomeen-Erden, Kaoline, Bentonite, Torfe, Kleien, vorzugsweise, Haferkleie, Weizenkleie, Mehle von Bambusstauden, Holzmehle, insbesondere Laubholzmehl, vorzugsweise Buchenholzmehl oder Eukalyptusmehl eingesetzt wird. Unter den Trägermaterialien sind hierbei die organischen Trägermaterialien bevorzugt, da sie nicht nur für eine gleichmäßige Verteilung des Wirkstoffes in dem Saatgutbehandlungsmittel dienen, sondern gleichzeitig dazu dienen können, das Auskeimen des Pilzes nach der Aussaat zu unterstützen, damit dieser so vollstän-

dig wie möglich die in der Umgebung der Saatkörner vorhandenen Keimlinge von *Striga hermonthica* befallen kann. Um einen besonders gute Haftfähigkeit des Saatgutbehandlungsmaterials an der Oberfläche des Saatguts und somit eine unmittelbare Wirkung der Zusammensetzung erreichen zu können ist die Erfindung dahingehend weitergebildet, dass der Träger eine mittlere Korngröße von kleiner 500 µm, vorzugsweise kleiner als 250 µm aufweist.

Insbesondere bei Einsatz von organischen Trägermaterialien in dem Saatgutbehandlungsmaterial, ist die Erfindung so weitergebildet, dass als Träger ein Holzmehl, insbesondere Buchenholzmehl mit einer Korngrößenverteilung zwischen 200 µm und 20 µm eingesetzt ist. Eine Korngrößenverteilung zwischen 200 µm und 20 µm des Trägers ermöglicht nicht nur den Erhalt einer homogenen Mischung aus Träger und Wirkstoff, sondern vor allem eine feine Verteilung des Pilzes *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 am Saatkorn, wo er nach Aussaat mit seinen Pilzhyphen auskeimt und sich mittels dieser Hyphen in die Umgebung des behandelnden Saatkorns im Boden ausbreitet. Die in der Umgebung des Saatkornes vorhandenen keimenden Samen und Keimlinge von *Striga hermonthica* werden befallen oder durch die Wirkung der Aminosäure abgetötet und sind somit nicht mehr in der Lage, die Wurzeln der aus dem Saatkorn auskeimenden anfälligen Pflanze zu befallen. Schließlich kann das Behandlungsmittel weitere Hilfsstoffe gewählt aus: Bindemitteln, Farbstoffen, Pflanzenschutzmitteln, Stoffen zur Pflanzenstärkung, Stoffen zur Wachstumsförderung oder Beschichtungsmitteln enthalten.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand von 7 Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Isolation von *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae* von welkenden Striga-Pflanzen

Es wurden welkende Striga-Pflanzen von Mais und Hirsefeldern entnommen und in Papiertüten gelagert. Aus dem Stängelbereich der Pflanzen wurden ca. 4 cm lange Segmente geschnitten und 5 min in einer 1,2%igen Natriumhypochlorid-Lösung oberflächlich sterilisiert. Danach wurden die Segmente gründlich in sterilem Leitungswasser gespült und ihre Enden mit einem sterilen Skalpell abgeschnitten. Die so behandelten Segmente wurden sodann auf ein semiselektives Nash & Snyder Agarmedium (Nash S.M., Snyder W.C., 1962: Quantitative estimation by plate counts of propagules of the bean rot *Fusarium* in field soil. *Phytopathology* 52, 567 – 572) aufgelegt und bei 25 °C inkubiert, bis Pilzmyzel aus den Enden der Stängelsegmente auswuchs. Sodann wurden mit dem Ziel, die Kulturen zu reinigen, kleine Agar-Blöcke aus dem Randbereich der auswachsenden Kolonien ausgeschnitten und auf ein frisches Nash & Snyder Medium überführt. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt. Aus dem Randbereich der dann auswachsenden Kolonien wurden erneut kleine Agarstücke ausgeschnitten und auf Wasseragar überführt. Nach 2 Wochen wurden die Agarplatten mit sterilem Leitungswasser überschichtet und die entstandenen Konidien mit Hilfe eines Drigalski-Spatels abgerieben und so in eine Suspension überführt. Daraus wurden einzelne Konidien entweder auf ein Nelkenblatt-Agarmedium (CLA) oder auf ein Kartoffel-Dextrose Agarmedium überführt. Kolonien von *Fusa-*

Fusarium oxysporum wurden bei dem Nelkenblatt-Agarmedium anhand der Konidienmorphologie und bei dem Kartoffel-Dextrose-Agarmedium anhand der typischen Verfärbung der Pilzkolonie identifiziert. Die auf dem Nelkenblatt-Agarmedium gebildeten *Fusarium-oxysporum*-Kolonien bildeten die für diese Art charakteristischen Makro- und Mikrokonidien sowie Chlamydosporen. Die *Fusarium-oxysporum*-Kolonien auf dem Kartoffel-Dextrose-Agarmedium zeichneten sich durch eine typische Lila Verfärbung des Myzels und des Agarmediums aus.

Es konnten mit diesem Versuch insgesamt 48 Einzelsporenisolate von *F. oxysporum* gewonnen werden.

Beispiel 2

Selektion eines *Fusarium-oxysporum*-Stammes mit einer erhöhten Methionin-Produktion

Zur Selektion von *Fusarium-oxysporum*-Stämmen mit einer erhöhten Aminosäureproduktion können Aminosäure-Analoga verwendet werden (Sands C.D., Pilgram A.L., 2009: Methods for selecting hypervirulent biocontrol agents of weed: why and how. Wiley Interscience, <https://onlinelibrary.wiley.com/action/doSearch?AllField=10.1002%2Fps.1739>).

Ein Czapek-Dox Agar (Difco, St Louis, MO) wurde mit Ammoniumsulfat ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), Uracil (20 mg L^{-1}), Thiamin (4 mg L^{-1}) und 100 mg L^{-1} von pulverisierten Multivitamin-tabletten ergänzt. Das Agarmedium wurde in 90 mm Petrischalen gegossen. Nach Abkühlung wurden $100 \mu\text{l}$ einer *Fusarium-oxysporum*-Konidien-suspension (ca. $1 \times 10^8 \text{ cfu pro Platte}$) mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf der Oberfläche des Agarmediums ausplattiert. Nach Abtrocknung der Agaroberfläche wurde aus der Mitte des Mediums mit Hilfe eines sterilen Korkbohrers ein Agarzylinder (Durchmesser 6 mm) ausgestochen, so dass ein zylindrisches Loch entstand. In dieses wurden $0,1 \text{ ml}$ einer sterilen Selenomethionin-Lösung gefüllt. Die Konzentration der Lösung betrug 1000 ppm . Selenomethionin ist ein Analogon der Aminosäure Methionin. Die Platten wurden dann 4 Stunden unter dem Laminarstrom einer Sicherheitswerkbank inkubiert. Danach wurden erneut $0,1 \text{ ml}$ der Selenomethionin-Lösung in die zylindrische Vertiefung gefüllt, bevor die Platten bei 28°C in einem Brutschrank inkubiert wurden. Um die zylindrische Vertiefung herum entstand eine Hemmzone, in der, wenn überhaupt, nur sehr vereinzelt Pilzwachstum zu verzeichnen war. Lediglich einzelne Kolonien konnten detektiert werden. Es wurde angenommen, dass es sich bei diesen um Mutanten mit einer erhöhten Methionin-Produktion handelt. Insgesamt wurden 18 solcher Kolonien auf insgesamt 50 Petrischalen in unterschiedlichen Abständen von der zylindrischen Vertiefung in der Mitte der Petrischale gefunden. Je dichter die jeweilige Kolonie an der zylindrischen Vertiefung wuchs, desto höher sollte die Methionin-Produktion der Mutante sein. Die so erzeugten Kolonien wurden entnommen und auf Kartoffel-Dextrose-Agar weiter kultiviert. Der Nachweis einer verstärkten Methionin-Produktion erfolgte mit Hilfe eines speziellen Bakterienstammes (*Leuconostoc mesenteroides*, ATCC 4043) der für Methionin auxotroph ist. Der Bakterienstamm kann sich daher auf einem Methionin-freien Agarmedium nicht entwickeln. Ein Bakterienwachstum war nur in Anwesenheit einiger der selektierten *Fusarium*-

oxysporum-Isolate nachweisbar, von denen daher angenommen werden musste, dass sie Methionin in das Agarmedium ausscheiden. Dies konnte bei 13 der 18 neu gewonnenen Isolate beobachtet werden. Damit wurde der Beweis erbracht, dass es sich bei den selektierten Isolaten tatsächlich um Mutanten handelt, die verstärkt Methionin in das Agarmedium ausscheiden.

Mit den selektierten *Fusarium-oxysporum*-Isolaten wurden weitere 4 Selektionszyklen durchgeführt, wobei die Konzentration der Selenomethionin-Lösung jeweils verdoppelt wurde.

Am Ende des Selektionsprozesses wurden 3 neue *Fusarium-oxysporum*-Stämme ausgewählt, bei denen eine besonders hohe Methionin-Produktion nachgewiesen werden konnte.

Beispiel 3

Selektion eines Isolates mit einer erhöhten Captan-Resistenz

Fünf Captan-haltige Kartoffel-Dextrose-Agarmedien wurde durch die Zugabe von 0,04; 0,1; 0,25; 0,6 und 1,5 g/l Captan 50WP zubereitet. Zunächst wurde das Medium mit der geringsten Captan-Konzentration verwendet. Jeweils 25 ml davon wurde in 90 mm Petrischalen gegossen. Nach Abkühlung wurden mit Hilfe eines Drigalski-Spatels 100 µl einer *Fusarium-oxysporum*-Konidiensuspension (ca. 1×10^6 cfu pro Platte) der zuvor selektierten (siehe Beispiel 2) Methionin-produzierenden *Fusarium-oxysporum*-Stämme auf der Oberfläche des Agarmediums ausplattiert. Es wurden 10 Petrischalen je Stamm verwendet.

Nach 7 Tagen wurden vereinzelt Pilzkolonien auf der Oberfläche des Agarmediums sichtbar, von denen angenommen werden musste, dass Sie bei der verwendeten Captan-Konzentration entwicklungsfähig sind, also bereits einen gewissen Grad der Resistenz gegenüber dem Fungizid erreicht haben. Diese wurden mit Hilfe eines sterilen Skalpell abgenommen und auf einem identischen Medium in anderen Petrischalen weiter kultiviert. Die selektierten Isolate wurden dann unter Verwendung der gleichen Methode auf das Medien mit der nächsthöheren Captan-Konzentration überführt. Erneut konnten Kolonien gefunden werden, die auf dem Captan-haltigen Medium wuchsen. Die daraus gewonnenen Pilzisolat wurden weiterkultiviert und erneut dem Selektionsprozess unterzogen. Dies wurde bis zur Erreichung einer Captan-Konzentration von 0,75 mg/l Agarmedium oder 1,5 mg/l Captan 50WP fortgeführt (das Produkt Captan 50WP enthält 50 % des Wirkstoffes Captan). Von diesem Medium konnte noch ein Isolat gewonnen werden, das die interne Bezeichnung DSSN 6 erhielt. Dieses wurde bei der DSMZ Braunschweig unter der Stammbezeichnung DSM 33471 hinterlegt.

Beispiel 4

Mikrokonidien-Suspension als Voraussetzung für die Herstellung eines *Fusarium-oxysporum*-Sporenpulvers

200 ml Kartoffel-Dextrose-Brühe wurden in einen 1l Erlenmeyerkolben gegeben. Dieser wurde mit einem Wattestopfen und Aluminiumfolie verschlossen und sodann autoklaviert. Die abgekühlte Brühe wurde mit 8 mit dem Stamm DSM 33471 bewachsenen Agar-Stückchen (ca.

6 x 6 mm) aus dem Randbereich einer auf einem PDA-Nährboden wachsenden Pilzkolonie beimpft.

Die Kultur wurde sodann bei 90 U/min 7 Tage bei 26 °C geschüttelt. Als Ergebnis der Schüttelkultur wurden ca. $3,2 \times 10^7$ Mikrokonidien pro Milliliter ausgezählt.

Beispiel 5

Herstellung eines Produktmusters

Ein Kristallisierschale wurde mit 20 g Holzmehl aus Buche mit einer Körnung von ca. 40 – 120 µm, wie z.B. das Produkt „Lignocel® HB 120“ der Firma J. Rettemaier & Söhne GmbH & Co. KG, sowie 40 ml eines wässrigen Erdbodenextraktes gefüllt. Die beiden Substanzen wurden gut miteinander verrührt. Die mit einer Aluminiumfolie geschlossene Kristallisierschale wurde sodann in einem Autoklaven bei 121 °C 15 min sterilisiert.

Die zuvor hergestellte Mikrokonidiensuspension (Beispiel 4) war zwischenzeitlich ca. 24 h im Kühlschrank aufbewahrt worden. Während dieser Zeit setzen sich die Mikrokonidien am Boden ab. Der Überstand (ca. 100 ml) wurde abgegossen, sodass die Konidienkonzentration sich auf ca. 6×10^7 Konidien pro Milliliter erhöhte. Von dieser Suspension wurden 20 ml in die mit dem Holzmehl und dem wässrigen Erdbodenextrakt gefüllte Kristallisierschale getan und mit Hilfe eines sterilen langstieligen Löffels gut mit dem Holzmehl-Bodenextrakt-Gemisch verrührt. Es entstand ein lockeres handfeuchtes Gemisch. Dieses wurde in der geschlossenen Kristallisierschale in einen Brutschrank gestellt und 14 Tage bei 25 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde das Substrat im Laminarstrom einer Sterilwerkbank bei ca. 23 °C sieben Tage in der nun geöffneten Kristallisierschale getrocknet. Während des Trocknungsprozesses wurde das Substrat täglich mit einem sterilen langstieligen Löffel gründlich gemischt, um die Trocknung möglichst gleichmäßig zu gestalten. Nach der Trocknung war ein feines homogenes Pulver entstanden.

Die Bestimmung der Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (cfu) pro Gramm erfolgte unmittelbar nach der Trocknung. Dazu wurden je 100 mg des entstandenen Pulvers in 1000 ml sterilem Leitungswasser in einem Becherglas suspendiert und zwei Minuten mit Hilfe eines Ultra Turrax der Firma IKA®-Werke GmbH & Co. KG homogenisiert. Noch während des Homogenisierungsprozesses wurden mit Hilfe einer Varipipette der Firma Eppendorf SE 100 µl der entstandenen Suspension aus dem Becherglas entnommen und auf einem PDA-Nährboden ausgestrichen. Nach 24 Stunden war ein deutliches Myzelwachstum auf der Oberfläche des Nährbodens zu erkennen, so dass die Pilzkolonien bzw. keimenden cfu unter dem Mikroskop ausgezählt werden konnten. Nach Auszählung und Umrechnung ergab sich eine Zahl von $5,2 \times 10^7$ cfu pro Gramm Substrat.

Mikroskopische Untersuchungen des Pulvers ergaben, dass große Mengen an Konidien und Chlamydosporen im Produkt vorhanden waren.

In gleicher Weise wie oben beschrieben wurden Produktmuster hergestellt, in denen das Trägermaterial Lignocel® HB 120" der Firma J. Rettemaier & Söhne GmbH & Co. KG durch aus Bambusstauden gewonnene Mehle oder gemahlene Haferkleie ersetzt wurde. Die in dem so hergestellten Pulver enthaltenen ausgezählten Pilzkolonien sowie die Mengen an Konidien und Chlamydosporen unterschieden sich nicht nennenswert von den bei Einsatz des Mehls aus Buchholz ermittelten Zahlen.

Beispiel 6

Lagerstabilität

Ein, wie im Beispiele 5 beschrieben, hergestelltes Produkt wurde zu Portionen von je 10 g in Aluminium beschichtete Plastiktüten verschweißt und im Anschluss daran entweder im Brutschrank bei 25 °C, im Kühlschrank bei 5 °C oder im Gefrierschrank bei -10 °C gelagert. Die Anzahl der noch keimungsfähigen Einheiten pro Gramm Produkt wurde nach 3, 6, 9 und 12 Monaten bestimmt. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Lagerstabilität eines Pilzsporenpulvers, hergestellt unter Verwendung des Pilzstammes DSM 33471, bei einer Ausgangskeimfähigkeit von $5,2 \times 10^7$ cfu/g und Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Lagertemperatur	Anzahl cfu nach Lagerung von			
	3 Monaten	6 Monaten	9 Monaten	12 Monaten
-10 °C	$5,1 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$
+5 °C	$4,9 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$4,1 \times 10^7$
+25 °C	$3,9 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$

Es konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass das Produkt bei Lagerung im Kühlschrank (+5 °C) und bei Lagerung im Gefrierschrank (-10 °C) eine sehr gute Lagerstabilität in Bezug auf die Keimfähigkeit der formulierten pilzlichen cfu besitzt.

Beispiel 7

Wirkung des Pilzstammes auf *Striga hermonthica*

Das unter Verwendung des erfindungsgemäßen Pilzstammes hergestellte Produkt wurde mit Hilfe einer Zuckerlösung an Maissaatgut angebunden. Es wurde je Kilogramm Maissaatgut ein Gramm Sporenpulver (Beispiel 5) verwendet. Das Pulver hatte eine Keimfähigkeit von $5,2 \times 10^7$ cfu pro Gramm. Es wurden insgesamt 17 Versuche in 4 verschiedenen Bezirken in Kenia durchgeführt. Die Versuche, die von an den Versuchsstandorten ansässigen Landwirten durchgeführt wurden, bestanden aus je einer behandelten und einer unbehandelten Parzelle von je 100 m². Die Versuchsstandorte können wie folgt spezifiziert werden:

- Bungoma (6 Landwirte)

- Kakamega (5 Landwirte)
- Siaya (4 Landwirte)
- Vihiga (2 Landwirte)

Dabei handelte es sich in allen Fällen um hochgradig mit *Striga hermonthica* verseuchte Flächen. Die Versuchspartzen wurden in der langen Regenzeit 2021 im März angelegt und im September abgeerntet. Im Juni wurde die Zahl der voll entwickelten Striga-Pflanzen pro Parzelle ermittelt. Dabei wurden nur die Pflanzen berücksichtigt, die bereits Samenkapseln gebildet hatten. Die Ergebnisse der Auszählung sind in Tabelle 2 dargestellt. Die Saatgutbehandlung führte zu einer deutlichen Reduzierung des Striga-Befalls.

Die Kornerträge pro Parzelle wurden im August ermittelt. Es wurden die in Tabelle 3 dargestellten Erträge erzielt.

Tabelle 2: Einfluss der Behandlung von Maissaatgut mit einem Pilzpulver, enthaltend die cfu des Pilzstammes *Fusarium oxysporum* DSM 33471, auf die Anzahl der Pflanzen des parasitären Unkrautes *Striga hermonthica*

Standort	Wiederholungen	x̄ Anzahl Striga-Pflanzen pro Parzelle	
		Unbehandelte Kontrolle	Saatgut mit DSM 33471 behandelt
Bungoma	6	195,5 a*	44,8 b
Kakamega	5	184,0 a	67,6 b
Siaya	4	160,6 a	28,8 b
Vihiga	2	220,8 a	107,8 a

*) Unterschiede im Bekämpfungserfolg zwischen den jeweils unbehandelten und behandelten Parzellen eines Standortes sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch signifikant, wenn die Zahlen der jeweils ermittelten Pflanzen durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

Tabelle 3: Einfluss einer Saatgutbehandlung mit einem Pilzpulver, enthaltend die cfu des Pilzstammes *Fusarium oxysporum* DSM 33471, auf den Maiserträge bei starker Verseuchung der Versuchspartzen mit *Striga hermonthica*

Standort	Wiederholungen	x̄ Maisertrag pro Parzelle in kg	
		Unbehandelte Kontrolle	Saatgut mit DSM 33471 behandelt
Bungoma	6	13,4 a*	19,1 b
Kakamega	5	11,0 a	18,2 b

Siaya	4	11,3 a	21,4 b
Vihiga	2	11,6 a	14,8 a

*) Ertragsunterschiede zwischen den jeweils unbehandelten und behandelten Parzellen eines Standortes sind bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch signifikant, wenn die jeweiligen Ertragswerte durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind.

Durch die Behandlung des Maissaatgutes mit dem Pilz *Fusarium oxysporum* DSM 33471 konnte an allen Standorten ein deutlich erhöhter Maisertrag pro Parzelle erzielt werden. Der Unterschied war an 3 von 4 Standorten statistisch signifikant.

Patentansprüche

1. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen enthaltend wenigstens einen Wirkstoff gewählt aus einem Pilzstamm aus der Gruppe der Fusarien sowie gegebenenfalls eine Trägersubstanz und/oder weitere Hilfsstoffe, dadurch gekennzeichnet, dass als ein Wirkstoff der Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 enthalten ist.

2. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Mittel 1×10^5 bis 1×10^{10} Kolonie bildende Einheiten von Pilzstämmen aus der Gruppe der *Fusarien* pro Gramm und dass wenigstens 1×10^5 und höchstens 1×10^{10} , vorzugsweise 1×10^6 bis 1×10^9 Kolonie bildende Einheiten des Pilzes *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 pro Gramm enthalten sind.

3. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Kolonie bildende Einheiten wenigstens eine Gruppe gewählt aus *Konidien*, *Chlamydosporen* oder *Myzelresten* von *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 enthalten ist.

4. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Träger wenigstens ein fester pulverförmiger Träger gewählt aus der Gruppe der Zeolithe, Vermiculite, Diatomeen-Erden, Kaoline, Bentonite, Torfe, Kleien, vorzugsweise, Haferkleie, Weizenkleie, Mehle von Bambusstauden, Holzmehle, insbesondere Laubholzmehl, vorzugsweise Buchenholzmehl oder Eukalyptusmehl eingesetzt wird.

5. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger eine mittlere Korngröße von kleiner 500 µm, vorzugsweise kleiner als 250 µm aufweist.

6. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Träger ein Holzmehl, insbesondere Buchenholzmehl mit einer Korngrößenverteilung zwischen 200 µm und 20 µm eingesetzt ist.

7. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die weiteren Hilfsstoffe gewählt sind aus: Bindemitteln, Farbstoffen, Pflanzenschutzmitteln, Stoffe zur Pflanzenstärkung, Stoffe zur Wachstumsförderung oder Beschichtungsmitteln.

8. Verwendung eines Behandlungsmittels für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass 0,1 – 1 kg/t des Behandlungsmittels an das Saatgut von insbesondere *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Panicum spp.*, *Pennisetum glaucum*, *Saccharum officina-*

rum, Sorghum bicolor, Triticum aestivum und Zea mays mittels herkömmlicher Saatgutbehandlungstechniken oder in einem Schüttelbehälter gebunden bzw. angelagert wird.

Wien, 27. Jänner 2022

Toothpick Company Ltd
Dr. Peter Lüth
durch
CUNOW Patentanwalts KG

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß IPC:

A01N 63/30 (2020.01)

Klassifikation des Anmeldungsgegenstands gemäß CPC:

A01N 63/30 (2022.01)

Recherchierter Prüfstoff (Klassifikation):

A01N

Konsultierte Online-Datenbank:

WPIAP, EPODOC, Fulltext

Dieser Recherchenbericht wurde zu den am 28.01.2022 eingereichten Ansprüchen 1-7, 9 erstellt.

Kategorie ^{*)}	Bezeichnung der Veröffentlichung: Ländercode, Veröffentlichungsnummer, Dokumentart (Anmelder), Veröffentlichungsdatum, Textstelle oder Figur soweit erforderlich	Betreffend Anspruch
A	Oula Dorah A. et al. The effectiveness of local strains of Fusarium oxysporium f. Sp. Strigae to control Striga hermonthica on local maize in western Kenya. Food Sci Nutr. 2020;8:4352-4360. https://doi.org/10.1002/fsn3.1732 das ganze Dokument	1-7, 9
A	Nzioki Henry S. et al. Striga Biocontrol on a Toothpick: A Readily Deployable and Inexpensive Method for Smallholder Farmers. Front. Plant Sci., 08 August 2016 Sec. Plant Breeding. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01121 insb. Seite 3, linke Spalte, Zeile 12 - rechte Spalte, Zeile 26	1-7, 9
A	Jamil Muhammad et al. Current progress in Striga management. Plant Physiology, Volume 185, Issue 4, April 2021, Pages 1339-1352, https://doi.org/10.1093/plphys/kiab040 Published: 05 February 2021 insb. Seite 1344, linke Spalte mitte - Seite 1345, linke Spalte Zeile 8	1-7, 9
A	US 5270039 A (YOO SUNG-JOON [JP], KOBAYASHI KIROKU [JP], OGOSHI AKIRA [JP], SUGIMOTO HIROYUKI [JP], KAJIMURA YOSHIO [JP]) 14. Dezember 1993 (14.12.1993) Spalte 1, Zeilen 38-47; Ansprüche	1-7, 9
A	CN 113862156 A (INST PLANT PROT CAAS) 31. Dezember 2021 (31.12.2021) Seite 3; Ansprüche 1-5	1-7, 9

Datum der Beendigung der Recherche:

25.11.2022

Seite 1 von 1

Prüfer(in):

MOSSER Reinhold

^{*)} Kategorien der angeführten Dokumente:

- X** Veröffentlichung **von besonderer Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann allein aufgrund dieser Druckschrift nicht als neu bzw. auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden.
- Y** Veröffentlichung **von Bedeutung**: der Anmeldungsgegenstand kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren weiteren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese **Verbindung für einen Fachmann naheliegend** ist.

- A** Veröffentlichung, die den allgemeinen **Stand der Technik** definiert.
- P** Dokument, das von **Bedeutung** ist (Kategorien **X** oder **Y**), jedoch **nach dem Prioritätstag** der Anmeldung veröffentlicht wurde.
- E** Dokument, das **von besonderer Bedeutung** ist (Kategorie **X**), aus dem ein „**älteres Recht**“ hervorgehen könnte (früheres Anmeldedatum, jedoch nachveröffentlicht, Schutz ist in Österreich möglich, würde Neuheit in Frage stellen).
- &** Veröffentlichung, die Mitglied der selben **Patentfamilie** ist.

Patentansprüche

1. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen enthaltend einen Wirkstoff gewählt aus einem Pilzstamm aus der Gruppe der Fusarien sowie gegebenenfalls eine Trägersubstanz und/oder weitere Hilfsstoffe, dadurch gekennzeichnet, dass als Wirkstoff der Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 enthalten ist.

2. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in dem Mittel wenigstens 1×10^5 und höchstens 1×10^{10} , vorzugsweise 1×10^6 bis 1×10^9 Kolonie bildende Einheiten des Pilzes *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 pro Gramm enthalten sind.

3. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Kolonie bildende Einheiten wenigstens eine Gruppe gewählt aus Konidien, Chlamydosporen oder Myzelresten von *Fusarium oxysporum* f. sp. *strigae*, DSM 33471 enthalten ist.

4. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Träger wenigstens ein fester pulverförmiger Träger gewählt aus der Gruppe der Zeolithe, Vermiculite, Diatomeen-Erden, Kaoline, Bentonite, Torfe, Kleien, vorzugsweise, Haferkleie, Weizenkleie, Mehle von Bambusstauden, Holzmehle, insbesondere Laubholzmehl, vorzugsweise Buchenholzmehl oder Eukalyptusmehl eingesetzt ist.

5. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger eine mittlere Korngröße von kleiner 500 μm , vorzugsweise kleiner als 250 μm aufweist.

6. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Träger ein Holzmehl, insbesondere Buchenholzmehl mit einer Korngrößenverteilung zwischen 200 μm und 20 μm eingesetzt ist.

7. Behandlungsmittel für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere Hilfsstoffe gewählt sind aus: Bindemitteln, Farbstoffen oder Beschichtungsmitteln.

8. Verwendung eines Behandlungsmittels für Saatgut einkeimblättriger Kulturpflanzen gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass 0,1 – 1 kg/t des Behandlungsmittels an das Saatgut von insbesondere *Eleusine coracana*, *Eragrostis tef*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*, *Panicum* spp., *Pennisetum glaucum*, *Saccharum officinarum*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum* und *Zea mays* in einem Schüttelbehälter gebunden bzw. angelagert wird.

Wien, 23. Jänner 2023

Toothpick Company Ltd
Dr. Peter Luth
durch
CUNOW Patentanwalts KG