

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
18. Oktober 2012 (18.10.2012)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/139146 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

A01N 43/16 (2006.01) A01P 1/00 (2006.01)
A01N 65/36 (2009.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT2012/000100

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. April 2012 (12.04.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 526/2011 13. April 2011 (13.04.2011) AT

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **TECHNISCHE UNIVERSITÄT WIEN**
[AT/AT]; Karlsplatz 13, A-1040 Wien (AT).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **STICH, Karl** [AT/AT];
Gemeindeweg 4-6, A-2201 Gerasdorf (AT). **FISCHER,**

Thilo [DE/DE]; Dorfstraße 34, 85737 Ismaning (DE).
GOSCH, Christian [AT/AT]; Kopreinigg 25, A-8544 St.
Ulrich im Greith (AT). **HALBWIRTH, Heidrun**
[AT/AT]; Koppstrasse 73/5/4, A-1160 Wien (AT).

(74) Anwalt: **SONN & PARTNER** Patentanwälte;
Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD OF CONTROLLING BACTERIAL INFECTIONS IN A PLANT USING FLAVONOIDS

(54) Bezeichnung : VERFAHREN ZUR BEKÄMPFUNG VON BAKTERIELLEN INFEKTIONEN BEI EINER PFLANZE
UNTER VERWENDUNG VON FLAVONOIDEN

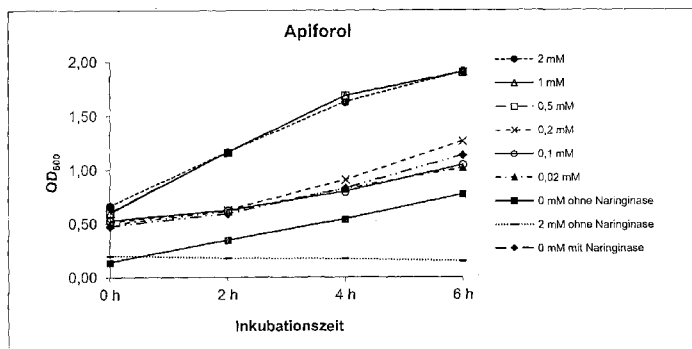
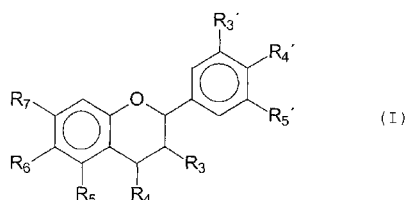


Fig. 1

Inkubationszeit = Incubation time
ohne Naringinase = without naringinase
mit Naringinase = with naringinase

(57) Abstract: The present invention relates to a method
of controlling bacterial infections in a plant, comprising
the step of bringing the plant or parts thereof into
contact with a flavonoid compound of the general
formula (I), where R3 and R6 are hydrogen, FM is a
hydroxyl, methoxy, malonyl, oxo or succinoyl group,
R5 is hydroxy, methoxy, malonyl or succinoyl group,
R7 is a glycosyl residue, R3', R4' and R5' in each case
independently of one another are a hydrogen, hydroxyl
or methoxy group.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung
betrifft ein Verfahren zur Bekämpfung von bakteriellen
Infektionen bei einer Pflanze umfassend den Schritt des
Inkontaktbringens der Pflanze oder Teilen davon mit
einer Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I)
wobei R3 und R6 Wasserstoff, R4 eine Hydroxy-,
Methoxy-, Malonyl-, Oxo- oder Succinoyl-Gruppe, R5
eine Hydroxy-, Methoxy-, Malonyl- oder Succinoyl-
Gruppe, R7 ein Glykosylrest, R3', R4' und R5' jeweils
unabhängig voneinander eine Wasserstoff-, Hydroxy-
oder Methoxy-Gruppe sind.



(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

VERFAHREN ZUR BEKÄMPFUNG VON BAKTERIELLEN INFEKTIONEN BEI EINER PFLANZE UNTER VERWENDUNG VON FLAVONOIDEN

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen bei Pflanzen.

In vielen Ländern wird der Kernobstanbau existentiell durch die von dem Bakterium *Erwinia amylovora* verursachte Feuerbrand-erkrankung bedroht. Als langfristige Perspektive sind die vielfältigen züchterischen Bemühungen um Feuerbrand-resistentere Sorten von Apfel und Birne zu betrachten. Dagegen wird in kürzerer Perspektive an der Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen den bakteriellen Erreger gearbeitet.

Gegenwärtig wird Feuerbrand in erster Linie durch die Anwendung des Antibiotikums Streptomycin bekämpft, bei dem es sich um eine hierfür hochwirksame Substanz handelt. Es wurden jedoch bereits Resistenzen gegen das Antibiotikum beobachtet. Darüber hinaus führten ökologische und toxikologische Betrachtungen zu einer strengen Regulierung der Streptomycin-Anwendung gegen Feuerbrand. Bedenken bestehen auch hinsichtlich der Entwicklung Antibiotika-resistenter humanpathogener Bakterien durch breiten Antibiotika-Einsatz. Streptomycin wurde z.B. wiederholt in Honig aus Anwendungsgebieten nachgewiesen (und dieser dann kostenintensiv vernichtet).

Kupfer-basierte Präparate sind ebenfalls aktiv, werden aber zunehmend eingeschränkt, um Kupfer-Akkumulation im Boden zu verhindern.

Gemäß der EP 2 012 589 B1 kann zur Bekämpfung von *Erwinia amylovora* auch nanoskaliges Silber verwendet werden, das potentiell als Element vergleichbar mit Kupfer im Boden akkumuliert werden kann.

In einem anderen Ansatz werden antagonistische Bakterien bei der Obstblüte gegen Feuerbrand verwendet, erreichen aber nicht den Wirkungsgrad von Streptomycin.

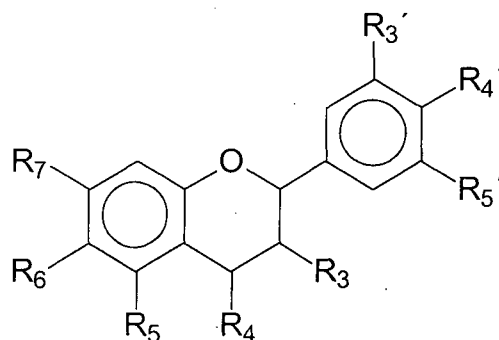
Die im Stand der Technik beschriebenen Mittel zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen bei Pflanzen, wie von *Erwinia*, insbesondere des Feuerbranderregers *Erwinia amylovora*, weisen eine Reihe von Nachteilen auf. Viele der verwendeten Substanzen können für Tiere und Menschen gesundheitsschädlich sein. Andere Substanzen weisen hingegen eine zu geringe Wirksamkeit gegenüber *Erwinia* auf, so dass durch einen erhöhten Wirkstoffeinsatz die

Wirtschaftlichkeit nicht mehr gegeben ist und die Umwelt höher belastet wird.

Andere Verbindungen wie z.B. das 3-Deoxyflavonoid Luteoforol zeigen in vitro einen stark wachstumshemmenden Effekt gegenüber Bakterien wie *Erwinia amylovora*. Jedoch ist diese Verbindung, wie auch vergleichbare Verbindungen derselben Gruppe, chemisch äußerst labil, so dass die Wirkung gegenüber Bakterien entweder nicht oder nur für eine äußerst kurze Zeitspanne eintritt.

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung Mittel und Verfahren zur Verfügung zu stellen mit deren Hilfe bakterielle Infektionen bei Pflanzen, insbesondere Infektionen durch *Erwinia* und insbesondere den Feuerbranderreger *Erwinia amylovora*, effizient bekämpft werden können.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen bei einer Pflanze umfassend den Schritt des Inkontaktbringens der Pflanze oder Teilen davon mit einer Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I)



Formel (I)

wobei

R3 und R6 Wasserstoff,

R4 eine Hydroxy-, Methoxy-, Malonoyl-, Oxo- oder Succinoyl-Gruppe,

R5 eine Hydroxy-, Methoxy-, Malonoyl- oder Succinoyl-Gruppe,

R7 ein Glykosylrest,

R3', R4' und R5' jeweils unabhängig voneinander eine Wasserstoff-, Hydroxy- oder Methoxy-Gruppe

sind.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Er-

findung wird der Glykosylrest unmittelbar vor, während oder nach dem Schritt des Inkontaktbringens von der Verbindung gemäß Formel (I) entfernt.

Es hat sich überraschenderweise herausgestellt, dass Flavonoidverbindungen mit der allgemeinen Formeln (I) geeignet sind, Pflanzenschädlinge wie *Erwinia amylovora* aktiv im Wachstum zu hemmen und abzutöten. Da Flavonoidverbindungen dieser Art chemisch labil sind, werden erfindungsgemäß nur solche Flavonoidverbindungen eingesetzt, die mit einer Schutzgruppe, wie dem Glykosylrest, vorzugsweise an R7, stabilisiert wurden. Durch das Anbringen einer Schutzgruppe an den erfindungsgemäßen Verbindungen gemäß Formel (I) kommt es zu einer Stabilisierung, so dass die Wirkung gegenüber Bakterien verlängert werden kann. Zudem zeigen mit Schutzgruppen versehene Verbindungen eine reduzierte bzw. keine Wirkung gegenüber Bakterien.

Vorzugsweise werden diese Verbindungen vor, während oder nach dem Inkontaktbringen der Pflanzen oder Teilen davon mit den erfindungsgemäßen Verbindungen durch Abspaltung der Schutzgruppe aktiviert und können ihre antibakterielle Wirkung entfalten. Die Abspaltung der Schutzgruppe kann dabei unmittelbar vor dem Aufbringen der Verbindungen auf die Pflanzen, während dessen oder aber auch danach erfolgen. Der Zeitpunkt der Abspaltung der Schutzgruppe kann durch die Zugabe von Mitteln beeinflusst werden, die die Abspaltung katalysieren. Zudem ist es auch möglich, zunächst die erfindungsgemäßen Verbindungen und im Anschluss daran die Mittel, die zur Aktivierung der Verbindungen beitragen, auf die Pflanze aufzubringen. Unter „Aktivierung“ wird hierbei verstanden, dass durch die Abspaltung der Schutzgruppe die erfindungsgemäße Verbindung in die aktive, sprich bakterizide, Form gebracht wird.

„Unmittelbar vor“ im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, dass die Schutzgruppe an der erfindungsgemäßen Flavonoidverbindung kurz vor dem Inkontaktbringen derselbigen mit der Pflanze entfernt wird. Dadurch wird gewährleistet, dass die Verbindung eine ausreichende Wirkung gegenüber den an der Pflanze befindlichen Bakterien entfaltet. „Unmittelbar vor“ bedeutet, dass die Schutzgruppe max. 1 Stunde, vorzugsweise max. 50 Min., noch mehr bevorzugt max. 40 Min. oder 30 Min. oder 15 Min. oder 5 Min., vor dem Inkontaktbringen entfernt wird, d.h. die Reaktion gestartet wird, in deren Zuge die Schutzgruppe entfernt wird.

Die Schutzgruppe, vorzugsweise die Glykosylgruppe, wird vorzugsweise chemisch oder enzymatisch abgespalten.

Die erfindungsgemäße Verbindung kann in einem entsprechenden, vorzugsweise wässrigen, Pflanzenschutzmittelgemisch Tenside zur besseren Benetzung der Pflanze umfassen, die keine der bakteriziden Wirkung abträglichen chemischen Reaktionen mit den erfindungsgemäßen Wirkstoffen eingehen (z.B. Tween 20 (0,005-0,1 Vol%), aber auch natürliche Stoffe mit Tensidwirkung). Besonders bevorzugt umfasst ein derartiges Pflanzenschutzmittel Na- und K-Seifen, oder handelsübliche Netzmittel, wie z.B. Agrowax 010, Break thru, Citowett, Exzellent CS 7, Neo-Wett, Agronetz, Ajutol, Silwet top, Zellex CS, Mc Illvaine-Puffer und dgl..

Erfindungsgemäß ist der Glykosylrest ein Mono-, Di- oder Triglykosid.

Flavonoidverbindung der eingangs beschriebenen Art kommen in der Natur häufig in Pflanzen vor. Die in Pflanzen vorkommenden Flavonoidverbindungen weisen als Schutzgruppe häufig Glykoside auf. Der Vorteil solcher Verbindungen liegt darin, dass in der Natur, sprich in den Pflanzen in denen diese Verbindungen vorkommen, auch Mittel vorhanden sind bzw. sein können, mit deren Hilfe die Schutzgruppen abgespaltet werden können.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Glykosid ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glucosyl-, Mannosyl-, Galactosyl-, Fructosyl-, Ribosyl-, Arabinosyl-, Rhamnosyl- oder Xylosyl-Resten.

Die Flavonoidverbindung ist vorzugsweise ein mit einer Schutzgruppe versehenes Flavan-4-ol, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Apiforol und Luteoforol.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I) in einer Konzentration von 0,1 mM bis 10 mM, vorzugsweise von 0,1 mM bis 5 mM, noch mehr bevorzugt von 0,1 mM bis 4 mM, auf die Pflanze oder Teilen davon aufgebracht.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Verbindung in einer Konzentration von 0,5 mM bis 2 mM, noch mehr bevorzugt von 1 mM bis 2 mM, auf die Pflanze aufgebracht. Diese Mengen an Wirkstoff sind für die gewünschte Wirkung beim Aufbringen des Pflanzenschutzmittels auf Pflanzen, insbesondere auf die Blüten, ausreichend.

Die erfindungsgemäßen Flavonoidverbindungen können besonders

gut zur Bekämpfung von *Erwinia amylovora* bei Kulturpflanzen eingesetzt werden. Beispielhafte Kulturpflanzen, welche häufig von *Erwinia amylovora* befallen werden, entstammen vorwiegend aus der Familie der Rosengewächse (Rosaceae). Besonders anfällig ist dabei die Unterfamilie der Kernobstgewächse (Maloideae). Im Holz von Kernobstgewächsen ist *Erwinia amylovora* zudem in der Lage zu überwintern. Daher ist es besonders bevorzugt, das erfindungsgemäße Pflanzenschutzmittel bei Rosengewächsen, vorzugsweise bei Kernobstgewächsen, insbesondere bei Äpfeln der Sorten Berlepsch, Braeburn, Cox Orange, Granny Smith, Elstar, Fuji, Gala, Gloster, Golden Delicious, Gravensteiner, Idared, James Grieve, Jonagold-Gruppe, Jonathan, Weißer Klarapfel, Topaz und Vista Bella, und bei Birnen der Sorten Abbate Fetel, Conference, Williams Christ, Vereinsdechants, Gellerts Butterbirne, Harrow Sweet, Clapps Liebling, Comice, Concorde, Frühe von Trévoux, Gute Luise, Bosc's Flaschenbirne (Kaiser Alexander), Pastorenbirne und Passa Crassana zu verwenden. Neben Kulturpflanzen können auch Ziergehölze beziehungsweise Wildobst wie Quitten, Mispeln, Speierling, Elsbeere, Mehlsbeeren wie Vogelbeere/Eberesche und Echte Mehlsbeere, Apfelbeeren, Zierquitten, Weißdorne wie Rotdorn und Feuerdorn, Wollmispeln, Zwergmispeln und Glanzmispeln/Stranvaesia mit der erfindungsgemäßen Verbindung behandelt werden, um *Erwinia amylovora* auf diesen Pflanzen zu bekämpfen.

Mit der erfindungsgemäßen Verbindung kann besonders gut *Erwinia amylovora* bekämpft werden. Jedoch eignet sich die Verbindung auch zur Bekämpfung anderer *Erwinia*-Arten, die als Pflanzenpathogene wirksam sind. Hierbei seien *Erwinia carotovora* (verursacht die Schwarzbeinigkeit bei Kartoffelpflanzen und die Nassfäule bei Kartoffelknollen), *Erwinia billingia*, *Erwinia cypripedii* und *Erwinia papayae* genannt.

Die erfindungsgemäße Verbindung wird vorzugsweise an jenen Stellen der Pflanze aufgebracht, die die bekannten Infektionspforten darstellen. Daher sind die Teile der Pflanze, welche bevorzugt mit der erfindungsgemäßen Verbindung in Kontakt gebracht werden, vorzugsweise Blüten und/oder Blätter.

Die Schutzgruppe, d.h. der Glykosidrest, der Flavonoidverbindung kann mit unterschiedlichsten Verfahren entfernt werden. So ist es möglich die Entfernung chemisch durchzuführen. Um jedoch die Reaktion möglichst unter physiologischen und damit die Pflanze schonenden Bedingungen durchzuführen, wird die Schutz-

gruppe vorzugsweise enzymatisch von der Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I) entfernt. Geeignete Enzyme für diese Reaktion sind Glykosidasen, vorzugsweise Naringinase, β -Glykosidase, Tannase oder andere, dem jeweiligen Glykosylrest entsprechende Glykosidasen.

Wie bereits eingangs erwähnt, kommen die erfindungsgemäßen Flavonoidverbindungen bzw. deren oxidierte Vorstufen in Pflanzen vor. Daher ist es besonders bevorzugt, die Pflanze oder Teile davon mit einem Pflanzenextrakt umfassend eine Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I) in Kontakt zu bringen.

In der Natur kommen die erfindungsgemäßen Verbindungen relativ häufig vor. Insbesondere von Vorteil ist dabei, dass diese in Pflanzenextrakten vorhandenen Verbindungen zumeist eine Schutzgruppe in Form z.B. eines Glykosids umfassen. Daher ist der Extrakt an sich bereits relativ stabil. Um die Stabilität der erfindungsgemäßen Enzyme bzw. Pflanzenextrakte zu erhöhen, ist es von Vorteil, etwaig vorkommende Glykosidasen zu inaktivieren. Die Inaktivierung der Glykosidasen kann beispielsweise durch geeignete Inhibitoren oder durch chemische oder thermische Denaturierung erfolgen.

Die Herstellung derartiger Extrakte ist in der Fachwelt hinreichend bekannt. Beispielsweise können *Citrus*-Fruchtsamenextrakte durch einen Druckaufschluss von etwa 12-72 Stunden, bevorzugt etwa 48 Stunden Dauer in Glycerin bei Temperaturen von etwa 50-150 °C und anschließendem Zentrifugieren und Filtrieren hergestellt werden.

Erfindungsgemäß werden die Pflanzenextrakte in Mengen von 0,001 bis 20 Gew.-%, bevorzugt 0,005 bis 10, besonders bevorzugt 0,01 bis 5 Gew.-%, der erfindungsgemäßen Flavonoidverbindungen hergestellt bzw. eingesetzt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Pflanzenextrakt vor dem Inkontaktbringen mit der Pflanze oder Teilen davon und vor dem Entfernen der Schutzgruppe reduziert.

Der Pflanzenextrakt wird vorzugsweise chemisch mit NaBH_4 , oder elektrolytisch reduziert. Entsprechende Verfahren sind dem Fachmann hinreichend bekannt. Es ist daher besonders bevorzugt, Flavonoidverbindungen der allgemeinen Formel (I) einzusetzen, deren R₄-Rest eine Hydroxygruppe aufweist.

Die erfindungsgemäßen Flavonoidverbindungen bzw. deren Vor-

läufer kommen in bestimmten Pflanzen gehäuft vor. Daher ist es von Vorteil, diese aus derartigen Pflanzen nach im Stand der Technik bekannten Verfahren zu extrahieren.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist der Pflanzenextrakt ein Extrakt aus Citrus-Früchten, insbesondere aus *Citrus paradisi* und *Citrus sinensis*.

Die bakterielle Infektion ist vorzugsweise eine *Erwinia amylovora*-Infektion, vorzugsweise an Kernobst wie Apfel, Birne, Quitte.

Erfindungsgemäß kann das hierin geoffenbarte Pflanzenschutzmittel mittels der im Stand der Technik benannten Verfahren auf das Blüten- und Blattwerk der zu behandelnden Pflanzen aufgebracht werden. Üblicherweise erfolgt das Aufbringen von Pflanzenschutzmittel durch Spritzen, Sprühen oder Stäuben.

Da die Primärinfektion vieler bakterieller Erkrankungen bei Kernobst in der Regel über die Blüte durch Bienen, insbesondere wenn feuchtwarme Wetterbedingungen herrschen, stattfindet, ist es besonders bevorzugt, zu diesem Zeitpunkt das erfindungsgemäße Pflanzenschutzmittel einzusetzen. Durch die nur kurzzeitige Anwendung während der Obstblüte werden bei dieser Ausführungsform kumulative phytotoxische Effekte auf die Obstbäume vermieden.

Erfindungsgemäß ist es auch möglich, 3-Deoxyflavonoide wie z.B. Luteoforol chemisch mit einer Schutzgruppe bzw. Glykosylgruppe zu versehen. Dies wird vorzugsweise mit Glykosyltransferasen durchgeführt (z.B. Flavonoid-7-O-Glykosyltransferasen).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Kit zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen bei einer Pflanze umfassend:

a) ein Behältnis umfassend eine Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I) wie oben definiert oder einen erfindungsgemäßen Pflanzenextrakt,

b) ein Behältnis umfassend ein Mittel zum Entfernen einer Schutzgruppe an der Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Mittel zum Entfernen einer Schutzgruppe ein Enzym, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glykosidasen wie Naringinase, β -Glykosidase, Tannase oder andere, dem jeweiligen Glykosylrest entsprechende Glykosidasen.

Die gegenständliche Erfindung wird anhand der folgenden Figuren und Beispiele näher illustriert, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt die Absorption bei 600 nm der Varianten 1-6 und der Kontrollen 1-3 des Küvettentests zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Apiforol auf das Wachstum von *E. amylovora*.

Fig. 2 zeigt die Absorption bei 600 nm der Varianten 1-6 und der Kontrolle des Küvettentests zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration reduzierten Naringins auf das Wachstum von *E. amylovora*.

BEISPIELE:

Naringin, das 7- β -Neohesperidosid von Naringenin, ist ein 3-Deoxy-Flavonoid von Zitrusfrüchten. In der Grapefruit (*Citrus paradisi*) kann Naringin bis zu 70% des Trockengewichts grüner Früchte ausmachen. Naringin verleiht Grapefruits ihren charakteristischen bitteren Geschmack.

In den folgenden Beispielen wurde reduziertes Naringin verwendet, welches teilweise durch Zugabe von Naringinase zu Apiforol deglykosyliert wurde.

Beispiel 1: Herstellung von reduziertem Naringin und Freisetzung der aktiven Wirkstoffe aus reduziertem Naringin:

Reduktion von Naringin

Durch die Reduktion von Naringin wurde das stabile Apiforol-Glykosid, das nach der Aktivierung (Glykosidspaltung) für 1) Einzelblüten-Inokulationstests, 2) Küvettentests und 3) Plattiertests (bakterizid vs. bakteriostatisch) verwendet wurde,

1. in einem Rundkolben wurden 290 mg Naringin eingewogen und in 24 ml EtOH gelöst
2. 50 mg NaBH₄ wurden in den Rundkolben dazugegeben
3. nach ca. 3 h wurde die Mischung eingedampft und in 2 ml Wasser aufgenommen
4. anschließend wurde mit ca. 10 μ l Essigsäure angesäuert, gemischt und eingefroren
5. die Extrakte wurden mit 3 ml Mc Ilvaine-Puffer (0,1 M NaHPO₄, 0,4% Na-Ascorbat, pH 6,0) komplettiert und bis zur Verwendung wieder eingefroren

Reduktion von Hesperidin

1. in einem Spitzkolben wurden 305 mg Hesperidin eingewogen und in 4,5 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst.
2. 50 mg NaBH₄ wurden dazugegeben
3. nach ca. 3 h wurde die Mischung eingedampft und in 2 ml Wasser aufgenommen
4. anschließend wurde mit ca. 10 µl Essigsäure angesäuert, gemischt und eingefroren
5. die Extrakte wurden mit 3 ml Mc Illvaine-Puffer (0,1 M NaHPO₄, 0,4% Na-Ascorbat, pH 6,0) komplettiert und bis zur Verwendung eingefroren.

Für Küvettentests wurden 160 µl reduziertes Naringin mit 240 µl Mc Illvaine-Puffer (0,1 M NaHPO₄, 0,4% Na-Ascorbat, pH 6,0) verdünnt. 70 mg Naringinase wurden in 240 µl Mc Illvaine-Puffer vollständig gelöst und dem reduzierten Naringin zugegeben. Das Gemisch wurde 15 min bei 40°C inkubiert. Anschließend wurde es je nach weiterer Verwendung entweder mit 1280 µl sterilem vollentsalztem Wasser verdünnt oder es wurden 1280 µl *E. amylovora*-Suspension in KB-Medium pH 6,0 mit einem OD₆₀₀-Wert von 0,2 zugegeben. Die so entstandene Wirkstofflösung beziehungsweise *E. amylovora*-Suspension enthielt nominell 2 mM reduziertes deglykosyliertes Naringin (Apiforol).

Spritzlösung für Einzelblüten-Inokulations-Tests:

für reduziertes Naringin:

1. 2 ml red. Naringin wurden mit 3 ml Mc Illvaine-Puffer (0,1 M NaHPO₄, 0,4% Na-Ascorbat, pH 6,0) komplettiert
2. 875 mg Naringinase wurden in 4 ml Mc Illvaine-Puffer (= 500 U/Test) gelöst und zum reduzierten Naringin gegeben
3. Inkubation für 15 min. bei 40 °C
4. Mit 16 ml Wasser wurde auf 25 ml Spritzlösung verdünnt

für reduziertes Hesperidin:

1. 2 ml red. Hesperidin wurden mit 3 ml Mc Illvaine-Puffer (0,1 M NaHPO₄, 0,4% Na-Ascorbat, pH 6,0) komplettiert
2. 1500 mg Hesperidinase wurden in 4 ml Mc Illvaine-Puffer gelöst und zum reduzierten Hesperidin gegeben
3. Inkubation für 30 min. bei 40 °C
4. Mit 16 ml Wasser wurde auf 25 ml Spritzlösung verdünnt

Beispiel 2: Plattiertest zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung potentieller Wirkstoffe auf *Erwinia amylovora*

Für diesen Test wurden, entsprechend dem Küvettentest (siehe Beispiel 1), pro Ansatz 2 ml *E. amylovora*-Suspension mit einer OD₆₀₀ von 0,2 in Küvetten vorgelegt und anschließend der jeweilige Wirkstoffkandidat zugegeben. Nach dem Verschließen der Ansätze mit Parafilm wurden diese jedoch für 0,5, 2 oder 15 Stunden bei 28°C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden jeweils 1:10-, 1:100-, 1:1000- und 1:10000-Verdünnungen mit KB-Medium hergestellt, daraus je Aliquots zu 10 µl entnommen und diese auf wirkstofffreie KB-Platten ausplattiert.

Die Platten wurden bei 28°C 1-2 Tage inkubiert, um anschließend gewachsene Kolonien auszuzählen.

Beispiel 3: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von reduziertem Naringin auf in vitro-Suspensionkulturen von *Erwinia amylovora*

Es wurden Küvettentests (siehe oben) mit abnehmenden Konzentrationen von durch Naringinase deglykosyliertem, reduziertem Naringin (Apiforol) durchgeführt.

In der ersten Reihe wurde die minimale Hemmkonzentration von Apiforol (reduziertes Naringin / Naringinase) bestimmt. Es wurden Konzentrationen von 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,2 mM, 0,1 mM und 0,02 mM getestet.

Die Zubereitung der 2 mM Wirkstofflösung erfolgte wie oben beschrieben (siehe Reduktion von Naringin). Nach der Inkubation der Lösung bei 40°C wurden 1280 µl *E. amylovora*-Suspension in KB-Medium pH 6,0 zugegeben. Die in den Lösungen mit geringeren Konzentrationen an reduziertem Naringin entstandene Volumendifferenz wurde durch die Zugabe von Mc Illvaine-Puffer kompensiert.

Als Kontrolle dienten Ansätze, welche nur Naringinase beziehungsweise nur 2 mM reduziertem Naringin enthielten, sowie ein Ansatz, welchem weder reduziertem Naringin noch Naringinase zugegeben worden war (Tab. 1). Die jeweiligen Volumendifferenzen wurden auch bei diesen Ansätzen durch die Zugabe von Mc Illvaine-Puffer kompensiert.

Tab. 1: Kontrollen und Varianten des Küvettentests zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von reduziertem Naringin

	<i>c</i> (red. Naringin) [mM]	<i>m</i> (Naringinase) [mg]
Kontrolle 1	0	0
Kontrolle 2	2	0
Kontrolle 3	0	70
Variante 1	2	70
Variante 2	1	70
Variante 3	0,5	70
Variante 4	0,2	70
Variante 5	0,1	70
Variante 6	0,02	70

Die Herstellung der Ansätze erfolgte in steril gehaltenen Küvetten, welche anschließend mit Parafilm verschlossen und bei 28°C und 180 rpm inkubiert wurden. Es wurde die optische Dichte bei 600 nm bei 0, sowie nach 2, 4 und 6 Stunden gemessen.

Das Lösen von Naringinase in Mc Illvaine-Puffer führte zu einer starken Rotfärbung. Die Zugabe von reduziertem Naringin löste eine weitere Farbveränderung aus. Aus diesem Grund weisen die Ansätze, die sowohl reduziert Naringin als auch Naringinase enthalten schon zu Beginn der Messreihe eine höhere optische Dichte auf als solche, welchen nur eine oder keine der beiden Substanzen zugegeben worden war.

Abgesehen von dem Ansatz, der lediglich 2 mM reduziert Naringin enthält, stieg bei allen Ansätzen die optische Dichte im Laufe des Versuches an (Fig. 1).

Die optische Dichte der Kontrolle ohne reduziert Naringin und ohne Naringinase wächst um 450%.

Es wurde die minimale Hemmkonzentration von reduziert Naringin bestimmt. Es wurden Konzentrationen von 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,2 mM, 0,1 mM und 0,02 mM getestet.

Die Zubereitung der 2 mM Stammlösung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden anstatt der Naringinase-Lösung 320 µl Mc Illvaine-Puffer zugegeben. Die Inkubation bei 40°C für die Naringinase-Reaktion wurde nicht durchgeführt, es wurden direkt 1280 µl *E. amylovora*-Suspension mit einer OD₆₀₀ von 0,2 zugegeben. Für die Herstellung der geringer konzentrier-

ten Lösungen wurde entsprechend weniger reduziertes Naringin eingesetzt und die Volumendifferenz mit Mc Illvaine-Puffer kompensiert (siehe Fig. 2).

Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Wirkstoff.

Reduziertes Naringin hat bis zu einer Konzentration von 1 mM eine vollständig wachstumshemmende Wirkung auf *E. amylovora*. Bei niedrigeren Konzentrationen nähert sich die Wachstumskurve sukzessive dem Wachstum der Kontrolle an (Fig. 2).

Beispiel 4: Bestimmung der bakteriostatischen oder bakteriziden Wirkungsweise reduzierten Naringins

Mittels Küvettentests wurde gezeigt, dass reduziertes Naringin einen wachstumshemmenden Effekt auf *E. amylovora* hat. In dem nun durchgeführten Plattiertest wurde ermittelt, ob der Wirkstoff bakteriostatisch oder bakterizid wirkt. Bei einer bakteriostatischen Wirkungsweise enthält eine *E. amylovora*-Suspension nach der Inkubation mit reduziertem Naringin noch den Anfangstiter an lebenden Zellen. Durch das Ausplattieren von Aliquots der *E. amylovora*-Suspension auf wirkstofffreien Platten verdünnt sich der in der Suspension enthaltene Wirkstoff unter die physiologisch schädliche Konzentration und es kommt zum Wachstum von Kolonien.

Wirkt reduziertes Naringin jedoch bakterizid, enthält die *E. amylovora*-Suspension nach der Inkubation mit dem Wirkstoff keine lebenden Zellen mehr beziehungsweise weniger lebende Zellen als zu Beginn des Experiments.

Der Plattiertest wurde mit vier verschiedenen Varianten durchgeführt (Tab. 2). Die Herstellung von reduziertem, deglykosyliertem Naringin (Apiforol) erfolgte wie beim Küvettentest. Nach der Inkubation bei 40°C wurden 1280 µl *E. amylovora*-Suspension zugegeben.

Tab. 2: Pipettierschema zur Herstellung der unterschiedlichen Ansätze des Plattiertest zur Bestimmung der bakteriostatischen oder bakteriziden Wirkung reduzierten Naringins

Ansatz	V (red. Naringin) [µl]	V (Naringinase-Lösung) [µl]	V (Mc Illvaine-Puffer) [µl]
1	0	0	720
2	0	320	400

3	160	0	560
4	160	320	240

Die Varianten 1 und 2 stellten die Kontrollen dar. Sie enthielten weder Naringinase noch reduziertes Naringin (Variante 1) beziehungsweise lediglich Naringinase (Variante 2). Das Endvolumen von 2 ml wurde in diesen Ansätzen durch die Zugabe von Mc Illvaine Puffer erreicht.

In Variante 3 diente reduziertes Naringin als Wirkstoff. Die Herstellung erfolgte wie oben beschrieben, allerdings wurde anstatt der Naringinase-Lösung 320 µl Mc Illvaine-Puffer zugegeben. Die Inkubation bei 40°C wurde nicht durchgeführt, es wurden direkt 1280 µl *E. amylovora*-Suspension zugegeben.

Variante 4 (Tab. 2) enthielt 2 mM Apiforol (reduziertes Naringin / Naringinase).

Der Versuch wurde nacheinander dreimal mit unterschiedlichen Inkubationszeiten von 30 min, 2 h beziehungsweise 15 h durchgeführt. In der dritten Durchführung (Inkubationszeit 15 h) wurde neben den in Tabelle 2 aufgeführten Ansätzen ein weiterer Ansatz 1b angesetzt, welcher bei 4°C inkubiert wurde.

In den ersten beiden Versuchsdurchläufen (Inkubationszeit 30 min beziehungsweise 2 h) wurden anschließend unverdünnte *E. amylovora*-Suspension, sowie je eine 1:10-, 1:100- und 1:1000-Verdünnung, ausplattiert. In dem dritten Versuchsdurchlauf (Inkubationszeit 15 h) wurden je eine 1:100-, 1:1000- und eine 1:10000-Verdünnung ausplattiert.

Bei der ersten Durchführung des Versuches (Inkubationszeit 30 min) war keine durch das reduzierte Naringin beziehungsweise Apiforol bedingte Hemmwirkung auf das Wachstum von *E. amylovora* erkennbar. Alle Platten waren konfluent mit Bakterien bewachsen. Nach 2 h Einwirkungszeit von reduziertem Naringin (Versuchsdurchlauf 2) waren auf den Platten, auf denen die 1:1000-Verdünnungen ausplattiert worden waren, Einzelkolonien auszählbar (Tab. 3). Die zweistündige Behandlung mit dem jeweiligen Wirkstoff führte zu einer Reduktion der Bakteriendichte auf 56,5% (reduziertes Naringin) beziehungsweise 44,1% (Apiforol), bezogen auf die Bakteriendichte von parallel ungestört wachsenden Zellen. Da nach 2 Stunden Inkubationszeit noch immer sehr viele Bakterien wachstumsfähig waren, wurde der Versuch ein

drittes Mal wiederholt und die Inkubationszeit auf 15 Stunden verlängert.

Tab. 3: Anzahl gewachsener *E. amylovora*-Kolonien nach zweistündiger Inkubation der einzelnen Varianten des Plattiertests zur Bestimmung der bakteriostatischen oder bakteriziden Wirkung reduzierten Naringins

Variante	Wirkstoff	Kolonien un-verdünnt	Kolonien 1:10-Verdünnung	Kolonien 1:100-Verdünnung	Kolonien 1:1000-Verdünnung
1	-	konfluent	konfluent	teilweise konfluent	1700
2	Naringinase	konfluent	konfluent	teilweise konfluent	2000
3	2 mM red. Naringin	konfluent	teilweise konfluent	zahlreiche Kolonien	960
4	2 mM Apiforol	konfluent	teilweise konfluent	zahlreiche Kolonien	750

In der dritten Versuchsdurchführung (Inkubationszeit 15 h) waren bei den ausplattierten Aliquots der 1:100- und 1:1000-Verdünnungen der Ansätze ohne Wirkstoff sowohl nach einer vorangegangenen Inkubation bei 4°C (1b) als auch nach einer Inkubation bei 28°C (1a) keine Einzelkolonien auszählbar. Ebenso waren die 1:100- und 1:1000-Verdünnungen des Ansatzes 2 mit einem konfluenten Bakterienrasen überwachsen.

Ansatz 1b zeigte bei einer 1:10000-Verdünnung 1488 gewachsene Kolonien, Ansatz 1a 4686. Da Ansatz 1b im Kühlschrank aufbewahrt worden war, entsprechen die gezählten Kolonien dem Anfangstiter an *E. amylovora* in der Suspension. Die Anzahl der bei 28°C gewachsenen Kolonien des Ansatzes 1b entsprechen der Anzahl der am Ende der Versuchszeit und bei ungestörtem Wachstum vorliegenden Zellen *E. amylovora*. In 15 Stunden hat ein Bakterienwachstum um 214,9% stattgefunden.

Durch die Zugabe von Naringinase (Ansatz 2) zu der *E. amylovora*-Suspension wurde das Wachstum leicht gehemmt. In der ausplattierten 10 µl der 1:10000-Verdünnung befanden sich noch 3756 Kolonien (Tab. 4). Dies entspricht einem Wachstum um 152,4% in

15 Stunden.

Tab. 4: Anzahl gewachsener *E. amylovora*-Kolonien nach 15-stündiger Inkubation der einzelnen Varianten des Plattiertests zur Bestimmung der bakteriostatischen oder bakteriziden Wirkung reduzierten Naringins.

Variante	Wirkstoff	Kolonien 1:100- Verdünnung	Kolonien 1:1000- Verdünnung	Kolonien 1:10000- Verdünnung
1a	-	konfluent	konfluent	4686
1b	-	konfluent	konfluent	1488
2	Naringinase	konfluent	konfluent	3756
3	2 mM red. Naringin	1085	350	283
4	2 mM Apiforol	326	206	254

Bei den reduzierten Naringin (Variante 3) beziehungsweise Apiforol (reduziertes Naringin / Naringinase) (Variante 4) ausgesetzten *E. amylovora*-Suspensionen verringerte sich die Anzahl lebender Bakterien in den ausplattierten 10 µl der 1:10000-Verdünnung auf 283 beziehungsweise 254. Dies entspricht einer Verringerung der Bakteriendichte um 81% (Variante 3) bzw. 83% (Variante 4) im Vergleich zu der Bakteriendichte zu Beginn des Versuches.

Reduziertes Naringin hat demzufolge sowohl im glykosylierten als auch im deglykosylierten Zustand eine bakterizide Wirkung auf *E. amylovora*, wobei Apiforol (reduziertes Naringin / Naringinase) einen etwas stärkeren bakteriziden Effekt aufweist.

In Tabelle 5 ist die prozentuale Bakteriendichte von *E. amylovora* in den einzelnen Ansätzen dargestellt, bezogen auf die Bakteriendichte zu Beginn des Versuches (Ansatz 1b) und bezogen auf die Dichte einer parallel ungestört wachsenden Population (Ansatz 1a). Letzteres stellt den praxisrelevanten Wert dar.

Tab.5: Prozentuales Wachstum der Bakterien nach Behandlung mit Naringinase (Ansatz 2), 1 mM reduziertem Naringin (Ansatz 3) beziehungsweise 1 mM Apiforol (Ansatz 4)

	Bakteriendichte [%] bezogen auf den An- fangstiter	Bakteriendichte [%] bezogen auf eine pa- rallel ungestört wachsende Population
Ansatz 1a	314,9%	100%
Ansatz 1b	100%	31,8%
Ansatz 2	252,4%	80,2%
Ansatz 3	19,0%	6,0%
Ansatz 4	17,1%	5,4%

In 10 µl der 1:100-Verdünnung der Variante 3 befanden sich 1085, in 10 µl der 1:1000-Verdünnung desselben Ansatzes 350 lebende Bakterien. In den ausplattierten 10 µl der jeweiligen Verdünnungsstufen der Variante 4 befanden sich 326 beziehungsweise 206 *E. amylovora*-Zellen (Tab. 4). Da zwischen den Koloniezahlen der einzelnen Verdünnungsstufen jeweils der Faktor 10 liegen sollte und dies bei den Ansätzen der Varianten 3 und 4 nicht der Fall ist, wurden die 6 Platten dieser beiden Varianten in einem Kontrollexperiment erneut für 4 Tage bei 28°C inkubiert. Daraufhin konnte anhand der typischen gelblichen Schleimbildung von *E. amylovora* eine Kontamination der Platten mit anderen Bakterien ausgeschlossen werden.

Beispiel 5: In-vitro Einzelblüten-Infektionstests mit Blüten des Apfels (*M. x dom.*)

Einzelblüten-Infektionstests simulieren eine natürliche Infektion von Apfelblüten mit *E. amylovora*, um anschließend verschiedene potentielle Wirkstoffe direkt auf den Blüten testen zu können.

Apfelblüten der Sorten Gala und Opal stammten von getopften Bäumen. 1,50 m große, getopfte Bäume waren bei 4°C zur Blühverzögerung aufbewahrt und etwa zwei Wochen vor Verwendung der Blüten angetrieben worden.

Am Tag 1 wurden die *E. amylovora*-Stämme 295/93 und 763 auf je einer KB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 28°C inkubiert. Zudem wurden für jede Testreihe in 15 Plastikboxen je 20

2 ml Eppendorfggefäße geklebt, welche mit 1,9 ml 10%iger Saccharoselösung befüllt wurden.

Daraufhin wurden pro Testreihe ca. 300 Blüten (Ballonstadium) geschnitten und in die Saccharoselösungen gestellt. Die Plastikboxen wurden über Nacht bei 22°C inkubiert, sodass sich die Blüten gänzlich öffneten. Knospen, welche an Tag 2 noch geschlossen waren, wurden von Hand geöffnet und Blütenblätter gegebenenfalls abgeschnitten, sodass die Narben frei zugänglich waren. Beschädigte und von Schädlingsraupen angefressene Blüten, sowie solche mit dunklen Staubblättern (Zeichen für zu alte Blüten) wurden ausgetauscht.

Von den *E. amylovora*-Stämmen 295/93 und 763 wurden Bakterien mit der Impföse in je 5 ml Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7,0) überführt und resuspendiert. Es wurde die OD₄₂₀ gemessen und die Suspensionen auf eine Bakteriendichte von je 10⁷ cfu/ml eingestellt. 1 ml der Suspension des *E. amylovora* 295/93-Stammes wurde mit 1 ml der Suspension des *E. amylovora* 763-Stammes gemischt. Für die Inokulation wurde je 1 µl der so entstandenen Suspension zweier Standard-Inokulationsstämme gleichmäßig auf die 5 Narben der Blüten pipettiert.

Die Blüten wurden zwei Stunden nach der künstlichen Infektion mit einer entsprechenden Wirkstofflösung besprüht. Die Spritzmittel wurden hierzu in Hand-Pumpzerstäuber gefüllt und 2 Hübe auf jede Blüte gesprüht (150 µl/Hub). Nach der Wirkstoffbehandlung wurden die Boxen circa 10 min offen stehen gelassen. Nach der Wirkstoffapplikation wurden jeweils 30 ml 32,6%iges Glycerin in die Plastikboxen gegeben. Falls der Wirkstoff vor der Inokulation mit *E. amylovora* appliziert wurde, erfolgte die Zugabe des Glycerins nach der Applikation der Inokulationssuspension. Das 32,6%ige Glycerin soll zu einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70% in den Plastikboxen führen, welche bei 22°C aufbewahrt und täglich von 7.00 - 18.00 Uhr beleuchtet wurden.

Ca. 46 Stunden nach der Infektion mit *E. amylovora* wurde ein Nässeereignis simuliert. Dazu wurden mit einer Handsprühflasche 2 Hübe autoklaviertes Leitungswasser mit Cantus® (0,5 g/l) auf jede Blüte gesprüht. Dabei sollten die Bakterien, sofern durch den Wirkstoff nicht abgetötet, ähnlich zu einer natürlichen Infektion, in den Blütenboden gewaschen werden. Cantus® ist ein Fungizid und schützt die Blüten vor übermäßigem Pilzbefall während der Inkubation.

Die Auswertung erfolgte 8-10 Tage später durch Bonitur der Einzelblüten auf Befall mit *E. amylovora*. Bei befallenen Blüten verfärbte sich der Blütenboden braun. Teilweise waren austretende, rot-braune Bakterientröpfchen am Blütenboden und -stiel zu beobachten.

Anschließend wurde mit nachfolgender Formel der Wirkungsgrad η der Wirkstoffe berechnet:

$$\eta = 1 - (\text{prozentualer Anteil befallener Blüten Wirkstoffkandidat}) / (\text{prozentualer Anteil befallener Blüten Kontrolle})$$

Für die in-vitro Infektionstests mit Apfelblüten wurden reduziertes und enzymatisch entschütztes Naringin (WS-N) bzw. Hesperidin (WS-H) getestet. Streptomycin wurde dabei als Positivkontrolle verwendet (Tabellen A, B und C). Es können für WS-N und WS-H keine genauen Konzentrationen angegeben werden, weshalb nur die theoretisch maximal enthaltene Konzentration in der Spritzlösung (errechnet sich aus der Ausgangskonzentration von Naringin im Syntheseansatz) angegeben ist. WS-N hatte im Vergleich zu WS-H höhere Wirkungsgrade (77 - 87 % vs. 48 %). Da die beiden Wirkstoffe und deren Applikation bislang noch nicht optimiert wurden, könnte der Wirkungsgrad noch zusätzlich gesteigert werden und jenem von Streptomycin (92 - 100 %) angenähert werden. Tabelle C zeigt zusätzlich die konzentrationsabhängige Abnahme des Wirkungsgrades von 77, 74 und 26 % beim Einsatz von (maximal) 2 mM, 1 mM und 0,1 mM Wirkstoff WS-N. Phytotoxische Schäden traten konzentrationsabhängig bei beiden Wirkstoffen und auch bei einzelnen Kontrollen auf. Die Tatsache, dass Petalen besonders empfindliches Gewebe darstellen und daher Verbräunungsschäden auftraten, während die reproduktiven Organe wie Stempel und Narbe augenscheinlich keine Schäden durch die Applikationen aufwiesen, lässt vermuten, dass der mögliche Einsatz dieser Mittel in der Praxis einen vernachlässigbaren Einfluss auf den Fruchtansatz haben dürfte.

Tabelle A

Sorte: Gala					
Varianten:	Anzahl Blüten	befallene Blüten	% Befall	MW	WG in %
WS-N (max. 2 mM) p	20	3	15	13	80
	20	2	10		
WS-H (max. 2 mM) p-	20	9	45	33	48
	20	4	20		
Kontrolle zu WS-N (ohne Naringinase = nicht entschützt) p	20	13	65	53	16
	20	8	40		
Kontrolle zu WS-H (ohne Hesperidinase = nicht entschützt) p-	20	8	40	35	44
	20	6	30		
Kontrolle (Wasser)	20	12	60	63	-
	20	13	65		
Kontrolle (0,06 % Strepto)	20	0	0	0	100
	20	0	0		

p) leichte bzw. p-) sehr leichte phytotoxische Reaktion bei v.a. Petalen, aber augenscheinlich nicht bei den Stempeln oder Narben

Tabelle B

Sorte: Opal					
Varianten:	Anzahl Blüten	befallene Blüten	% Befall	MW	WG in %
WS-N (max. 2 mM) p+	20	1	5	13	87
	20	4	20		
Kontrolle 1 zu WS-N (ohne Naringinase = nicht entschützt) p-	20	16	80	83	15
	20	17	85		
Kontrolle 2 zu WS-N (ohne WS-N, nur Na- ringinase) p+	20	13	65	60	38
	20	11	55		
Kontrolle (Wasser)	20	20	100	98	-
	20	19	95		
Kontrolle (0,06 % Strepto)	20	0	0	8	92
	20	3	15		

p+) starke bzw. p-) sehr leichte phytotoxische Reaktion bei v.a. Petalen, aber augenscheinlich nicht bei den Stempeln oder Narben

Tabelle C

Sorte: Opal					
Varianten:	Anzahl Blüten	befallene Blüten	% Befall	MW	WG in %
WS-N (max. 2 mM) p	20	2	10	18	77
	20	5	25		
WS-N (max. 1 mM) p	20	1	5	20	74
	20	7	35		
WS-N (max. 0,1 mM) p-	20	13	65	58	26

	20	10	50		
Kontrolle (ohne WS-N, nur Naringi- nase) p+	20	16	80	68	13
	20	11	55		
Kontrolle (Wasser)	20	16	80	78	-
	20	15	75		
Kontrolle (0,06 % Strepto)	20	2	10	5	94
	20	0	0		

p-) sehr leichte, p) leichte, bzw. p+) starke phytotoxische Reaktion bei v.a. Petalen, aber augenscheinlich nicht bei den Stempeln oder Narben

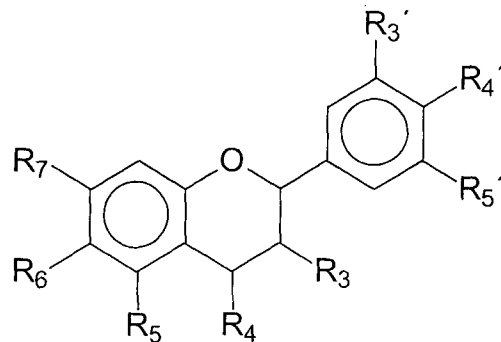
Schlussfolgerung

Besonders WS-N ($\eta = 77 - 87 \%$) aber auch WS-H ($\eta = 48$) zeigten eine Wirkung gegen *E. amylovora* im Einzelblüten-Infektionstest und besitzen deshalb ein gutes Potential als Wirkstoff zur Kontrolle von primärem Feuerbrand (Blüteninfektionen).

Besonders die Anwendung von nominell 2 mM WS-N in den in-vitro Einzelblüten-Infektionstests zeigt einen hohen Wirkungsgrad von 77 - 87 %, im direkten Vergleich zu 92 - 100 % für das konventionelle Pflanzenschutzmittel Streptomycin.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen bei einer Pflanze umfassend den Schritt des Inkontaktbringens der Pflanze oder Teilen davon mit einer Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I)



Formel (I)

wobei

R3 und R6 Wasserstoff,
R4 eine Hydroxy-, Methoxy-, Malonoyl-, Oxo- oder Succinoyl-Gruppe,
R5 eine Hydroxy-, Methoxy-, Malonoyl- oder Succinoyl-Gruppe,
R7 ein Glykosylrest,
R3', R4' und R5' jeweils unabhängig voneinander eine Wasserstoff-, Hydroxy- oder Methoxy-Gruppe

sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Glykosylrest unmittelbar vor, während oder nach dem Schritt des Inkontaktbringens von der Verbindung gemäß Formel (I) entfernt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Glykosylrest ein Mono-, Di- oder Triglykosid ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Glykosylrest ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Glucosyl-, Mannosyl-, Galactosyl-, Fructosyl-, Ribosyl-, Arabinosyl-,

Rhamnosyl- oder Xylosyl-Resten.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Flavonoidverbindung ein mit einem Glykosid versehenes Flavan-4-ol, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Apiforol und Luteoforol, ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I) in einer Konzentration von 0,1 mM bis 10 mM, vorzugsweise von 0,1 mM bis 5 mM, noch mehr bevorzugt von 0,1 mM bis 4 mM, auf die Pflanze oder Teilen davon aufgebracht wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Teile der Pflanze Blüten und/oder Blätter sind.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Glykosid enzymatisch durch Glykosidasen von der Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I) entfernt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze oder Teile davon mit einem Pflanzenextrakt umfassend eine Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I) in Kontakt gebracht wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Pflanzenextrakt vor dem Inkontaktbringen mit der Pflanze oder Teilen davon und vor dem Entfernen des Glykosids reduziert wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Pflanzenextrakt chemisch mit NaBH_4 oder elektrolytisch reduziert wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Pflanzenextrakt ein Extrakt aus Citrusfrüchten, insbesondere aus *Citrus paradisi* und/oder *Citrus sinensis*, ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die bakterielle Infektion eine *Erwinia amylovora* Infektion ist.

14. Kit zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen bei einer Pflanze umfassend:

a) ein Behältnis umfassend eine Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I) wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert oder einem Pflanzenextrakt nach einem der Ansprüche 10 bis 12,

b) ein Behältnis umfassend ein Mittel zum Entfernen einer Schutzgruppe an der Flavonoidverbindung der allgemeinen Formel (I).

15. Kit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel zum Entfernen einer Schutzgruppe ein Enzym, vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Glykosidasen ist.

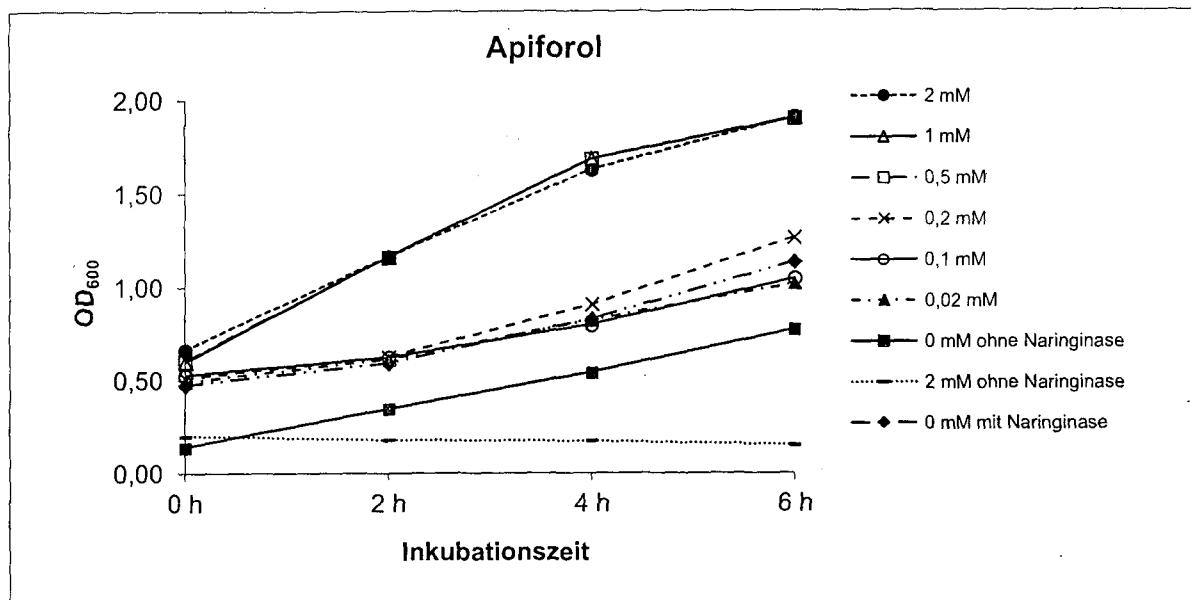


Fig. 1

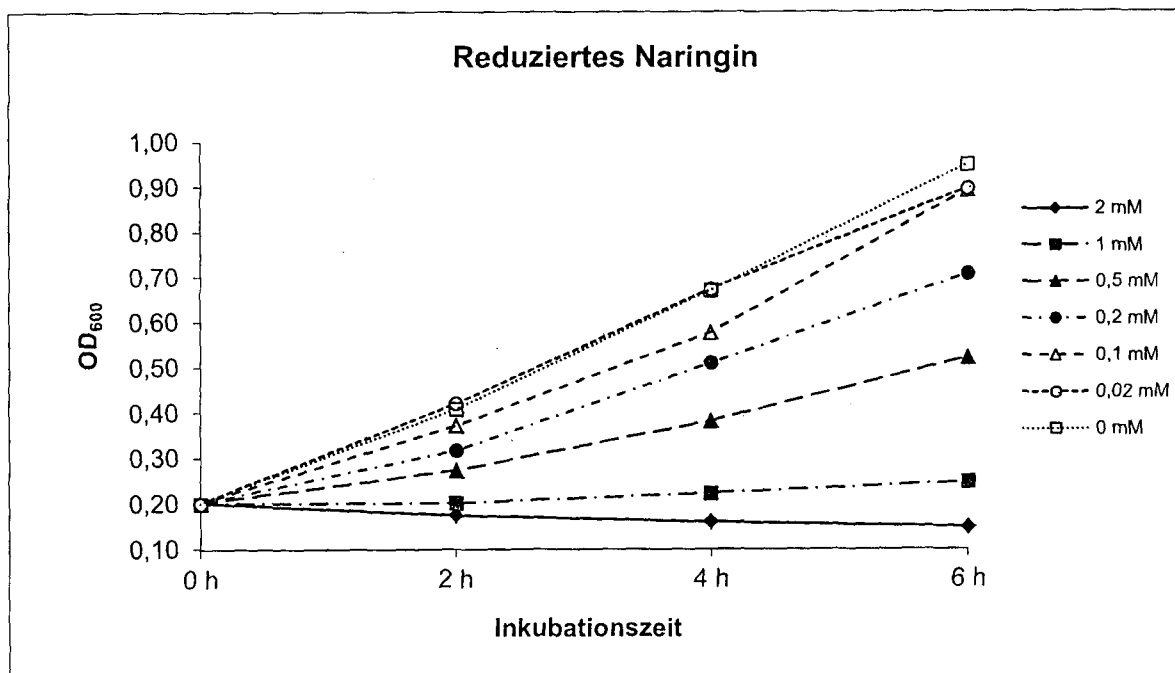


Fig. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/AT2012/000100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A01N43/16 A01N65/36 A01P1/00
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GDM TECHNOLOGIES PTY LTD: "Citrofresh. Croplife (Plant Nutrient Synergist)", INTERNET CITATION, 19 July 2008 (2008-07-19), XP007912711, Retrieved from the Internet: URL:http://web.archive.org/web/20080719035630/http://www.citrofresh.com/product-croplife.php [retrieved on 2010-04-19] the whole document ----- -/--	1-4,6,7, 9,12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 2012

Date of mailing of the international search report

26/06/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Habermann, Jörg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/AT2012/000100

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GDM TECHNOLOGIES PTY LTD: "MATERIAL SAFETY DATA SHEET. Croplife", INTERNET CITATION, 15 January 2008 (2008-01-15), page 3PP, XP007912717, Retrieved from the Internet: URL:http://web.archive.org/web/20080719003228/http://www.citrofresh.com/pdf/msds-croplife.pdf [retrieved on 2010-04-19] Anschnitte 1 und 3 -----	1-4,6,7, 9,12
X	GDM TECHNOLOGIES PTY LTD: "MATERIAL SAFETY DATA SHEET. Citrofresh Concentrate", INTERNET CITATION, 15 January 2008 (2008-01-15), page 3PP, XP007912716, Retrieved from the Internet: URL:http://web.archive.org/web/20080718203336/http://www.citrofresh.com/pdf/msds-citrofresh.pdf [retrieved on 2010-04-19] Abschnitte 1 und 3 -----	1-4,6,7, 9,12
A	WO 2008/009956 A1 (ORALDENT LTD [GB]; RICEFARMA S R L [IT]; RIPLEY IAN [GB]; THOMAS H [GB] 24 January 2008 (2008-01-24) example 1 -----	1-13
X	DATABASE WPI Week 199707 Thomson Scientific, London, GB; AN 1997-071903 XP002677588, & JP 8 317782 A (POKKA CORP KK) 3 December 1996 (1996-12-03) abstract -----	1-4,6,8, 9,12,14, 15
A	Serpil Yalim ET AL: "Naringin in Turkish Orange Juices and Its Reduction by Naringinase", Journal of Food and Drug Analysis, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 273-276, XP55029723, Retrieved from the Internet: URL:http://www.fda.gov.tw/files/publish_periodical/13_Naringin_in_Turkish_Orange_Juices_and_Its_Reduction_by_Naringinase.pdf [retrieved on 2012-06-13] the whole document ----- -/--	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/AT2012/000100

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MANDALARI G ET AL: "Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (Citrus bergamia Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, OXFORD, GB, vol. 103, no. 6, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 2056-2064, XP002466986, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1111/J.1365-2672.2007.03456.X table 3	1-13
A	----- BAE EUN-AH ET AL: "In vitro Anti-Helicobacter pylori Activity of Some Flavonoids and Their Metabolites", PLANTA MEDICA, THIEME VERLAG, DE, vol. 65, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 442-443, XP009131846, ISSN: 0032-0943 tables 1, 2	1-13
X	----- CHRISTIAN GOSCH ET AL: "New bactericides against the fire blight (Erwinia amylovora) and development of a fast Bee-Erwinia monitoring system", 28TH INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS 2010, 22 August 2010 (2010-08-22), pages 1-22, XP55029708, Lisbon, Portugal page 10	1,5-7,9, 13
X	----- FRANCESCO SPINELLI ET AL: "Luteoforol, a flavan 4-ol, is induced in pome fruits by prohexadione-calcium and shows phytoalexin-like properties against Erwinia amylovora and other plant pathogens", EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 112, no. 2, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 133-142, XP019239281, ISSN: 1573-8469, DOI: 10.1007/S10658-005-2192-X	1,5-7,9, 13
Y	page 136, column 2, line 22 - page 138, column 2, line 36 figures 3, 6 ----- -/--	10,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/AT2012/000100

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HALBWIRTH H ET AL: "Induction of antimicrobial 3-deoxyflavonoids in pome fruit trees controls fire blight", ZEITSCHRIFT FUER NATURFORSCHUNG. C, A JOURNAL OF BIOSCIENCES, TUEBINGEN, DE, vol. 58c, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 765-770, XP009073768, ISSN: 0939-5075 figure 6	1-13
Y	----- E.C. BATE-SMITH: "Luteoforol (3',4',5,7-pentahydroxyflavan) in Sorghum vulgare L.", PHYTOCHEMISTRY, vol. 8, no. 9, 1 September 1969 (1969-09-01), pages 1803-1810, XP55029757, ISSN: 0031-9422, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)85972-5 "Preparation"; page 1803	10,11
Y	----- ROBERT M HOROWITZ ET AL: "Flavonoid Compounds of Citrus. 111. Isolation and Structure of Eriodictyol Glycoside", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 82, no. 11, 5 June 1960 (1960-06-05), pages 2803-2806, XP55029777, the whole document -----	10,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/AT2012/000100

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008009956	A1	24-01-2008	AT 548020 T 15-03-2012
			AT 551988 T 15-04-2012
			CA 2658468 A1 24-01-2008
			CA 2658710 A1 24-01-2008
			CN 101495089 A 29-07-2009
			CN 101495090 A 29-07-2009
			EP 2043592 A1 08-04-2009
			EP 2043593 A1 08-04-2009
			GB 2440440 A 30-01-2008
			JP 2009544603 A 17-12-2009
			JP 2009544604 A 17-12-2009
			US 2010055053 A1 04-03-2010
			US 2010068157 A1 18-03-2010
			WO 2008009956 A1 24-01-2008
			WO 2008009958 A1 24-01-2008

JP 8317782	A	03-12-1996	JP 3571111 B2 29-09-2004
			JP 8317782 A 03-12-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT2012/000100

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. A01N43/16 A01N65/36 A01P1/00
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

A01N

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GDM TECHNOLOGIES PTY LTD: "Citrofresh. Croplife (Plant Nutrient Synergist)", INTERNET CITATION, 19. Juli 2008 (2008-07-19), XP007912711, Gefunden im Internet: URL: http://web.archive.org/web/20080719035630/http://www.citrofresh.com/product-croplife.php [gefunden am 2010-04-19] das ganze Dokument ----- -/-	1-4,6,7, 9,12

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Juni 2012

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

26/06/2012

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Habermann, Jörg

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GDM TECHNOLOGIES PTY LTD: "MATERIAL SAFETY DATA SHEET. Croplife", INTERNET CITATION, 15. Januar 2008 (2008-01-15), Seite 3PP, XP007912717, Gefunden im Internet: URL:http://web.archive.org/web/20080719003228/http://www.citrofresh.com/pdf/msds-croplife.pdf [gefunden am 2010-04-19] Anschnitte 1 und 3 -----	1-4,6,7, 9,12
X	GDM TECHNOLOGIES PTY LTD: "MATERIAL SAFETY DATA SHEET. Citrofresh Concentrate", INTERNET CITATION, 15. Januar 2008 (2008-01-15), Seite 3PP, XP007912716, Gefunden im Internet: URL:http://web.archive.org/web/20080718203336/http://www.citrofresh.com/pdf/msds-citrofresh.pdf [gefunden am 2010-04-19] Abschnitte 1 und 3 -----	1-4,6,7, 9,12
A	WO 2008/009956 A1 (ORALDENT LTD [GB]; RICEFARMA S R L [IT]; RIPLEY IAN [GB]; THOMAS H [GB] 24. Januar 2008 (2008-01-24) Beispiel 1 -----	1-13
X	DATABASE WPI Week 199707 Thomson Scientific, London, GB; AN 1997-071903 XP002677588, & JP 8 317782 A (POKKA CORP KK) 3. Dezember 1996 (1996-12-03) Zusammenfassung -----	1-4,6,8, 9,12,14, 15
A	Serpil Yalim ET AL: "Naringin in Turkish Orange Juices and Its Reduction by Naringinase", Journal of Food and Drug Analysis, 1. Dezember 2004 (2004-12-01), Seiten 273-276, XP55029723, Gefunden im Internet: URL:http://www.fda.gov.tw/files/publish_periodical/13_Naringin_in_Turkish_Orange_Juices_and_Its_Reduction_by_Naringinase.pdf [gefunden am 2012-06-13] das ganze Dokument ----- -/--	1-13

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MANDALARI G ET AL: "Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (Citrus bergamia Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry", JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY, OXFORD, GB, Bd. 103, Nr. 6, 1. Dezember 2007 (2007-12-01), Seiten 2056-2064, XP002466986, ISSN: 1364-5072, DOI: 10.1111/J.1365-2672.2007.03456.X Tabelle 3	1-13
A	----- BAE EUN-AH ET AL: "In vitro Anti-Helicobacter pylori Activity of Some Flavonoids and Their Metabolites", PLANTA MEDICA, THIEME VERLAG, DE, Bd. 65, 1. Januar 1999 (1999-01-01), Seiten 442-443, XP009131846, ISSN: 0032-0943 Tabellen 1, 2	1-13
X	----- CHRISTIAN GOSCH ET AL: "New bactericides against the fire blight (Erwinia amylovora) and development of a fast Bee-Erwinia monitoring system", 28TH INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS 2010, 22. August 2010 (2010-08-22), Seiten 1-22, XP55029708, Lisbon, Portugal Seite 10	1,5-7,9, 13
X	----- FRANCESCO SPINELLI ET AL: "Luteoforol, a flavan 4-ol, is induced in pome fruits by prohexadione-calcium and shows phytoalexin-like properties against Erwinia amylovora and other plant pathogens", EUROPEAN JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, Bd. 112, Nr. 2, 1. Juni 2005 (2005-06-01), Seiten 133-142, XP019239281, ISSN: 1573-8469, DOI: 10.1007/S10658-005-2192-X	1,5-7,9, 13
Y	Seite 136, Spalte 2, Zeile 22 - Seite 138, Spalte 2, Zeile 36 Abbildungen 3, 6 ----- -/--	10,11

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HALBWIRTH H ET AL: "Induction of antimicrobial 3-deoxyflavonoids in pome fruit trees controls fire blight", ZEITSCHRIFT FUER NATURFORSCHUNG. C, A JOURNAL OF BIOSCIENCES, TUEBINGEN, DE, Bd. 58c, 1. Januar 2003 (2003-01-01), Seiten 765-770, XP009073768, ISSN: 0939-5075 Abbildung 6 -----	1-13
Y	E.C. BATE-SMITH: "Luteoforol (3',4',5,7-pentahydroxyflavan) in Sorghum vulgare L.", PHYTOCHEMISTRY, Bd. 8, Nr. 9, 1. September 1969 (1969-09-01), Seiten 1803-1810, XP55029757, ISSN: 0031-9422, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)85972-5 "Preparation"; Seite 1803 -----	10,11
Y	ROBERT M HOROWITZ ET AL: "Flavonoid Compounds of Citrus. 111. Isolation and Structure of Eriodictyol Glycoside", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Bd. 82, Nr. 11, 5. Juni 1960 (1960-06-05), Seiten 2803-2806, XP55029777, das ganze Dokument -----	10,11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT2012/000100

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 2008009956	A1	24-01-2008	AT	548020 T	15-03-2012
			AT	551988 T	15-04-2012
			CA	2658468 A1	24-01-2008
			CA	2658710 A1	24-01-2008
			CN	101495089 A	29-07-2009
			CN	101495090 A	29-07-2009
			EP	2043592 A1	08-04-2009
			EP	2043593 A1	08-04-2009
			GB	2440440 A	30-01-2008
			JP	2009544603 A	17-12-2009
			JP	2009544604 A	17-12-2009
			US	2010055053 A1	04-03-2010
			US	2010068157 A1	18-03-2010
			WO	2008009956 A1	24-01-2008
			WO	2008009958 A1	24-01-2008

JP 8317782	A	03-12-1996	JP	3571111 B2	29-09-2004
			JP	8317782 A	03-12-1996
