


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

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : A01N	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/38379 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. August 1999 (05.08.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00459 (22) Internationales Anmeldedatum: 25. Januar 1999 (25.01.99) (30) Prioritätsdaten: 198 03 630.2 1. Februar 1998 (01.02.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): POLUS, Horst [DE/DE]; Freiherr-vom-Stein-Strasse 12, D-64678 Lindenfels (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHNABL, Heide [DE/DE]; Auf dem Äckerchen 50, D-53343 Wachtberg-Villip (DE). POLUS, Gudrun, L. [DE/DE]; Freiherr-vom-Stein-Strasse 12, D-64678 Lindenfels (DE). (74) Anwalt: BENZ, Jürgen; Spessarttring 63, D-64287 Darmstadt (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: BIOLOGICAL PLANT PROTECTION AGENT WITH RESISTANCE-PROMOTING ACTION AND METHOD FOR PRODUCING SAME (54) Bezeichnung: BIOLOGISCHES PFLANZENSCHUTZMITTEL MIT RESISTENZFÖRDERNDER WIRKUNG UND VERFAHREN ZU SEINER HERSTELLUNG (57) Abstract The invention relates to a novel biological plant protection agent based on a plant product. In addition to strengthening plants it induces in crops and other cultivated plants a general and surprisingly intensive resistance to a wide range of pathogenic influences and especially to bacterial, fungal and even viral infection. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein neuartiges biologisches Pflanzenschutzmittel auf Basis einer pflanzlichen Zubereitung. Es bewirkt neben pflanzenstärkenden Effekten vor allem eine generelle, überraschend intensiv ausgeprägte Resistenzinduktion bei Nutz- und Kulturpflanzen gegenüber pathogenen Einflüssen vielerlei Art, insbesondere gegenüber dem Befall durch Bakterien, Pilze und sogar Viren.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Biologisches Pflanzenschutzmittel mit resistenzfördernder Wirkung und Verfahren zu seiner Herstellung

5

Die Erfindung betrifft ein neues und neuartiges biologisches Pflanzenschutzmittel. Das Pflanzenschutzmittel basiert selbst auf einer spezifischen Pflanzenzubereitung und bewirkt neben pflanzenstärkenden Effekten vor allem eine generelle, überraschend intensiv ausgeprägte Resistenzinduktion bei Nutz- und Kulturpflanzen gegenüber pathogenen Einflüssen vielerlei Art, insbesondere gegenüber dem Befall durch Bakterien, Pilze und sogar Viren. Das erfindungsgemäße Mittel ist hochwirksam aber in jeder Beziehung untoxisch und unterscheidet sich somit von den klassischen zu-

10 meist auf chemisch synthetisierten Verbindungen beruhenden Pflanzenschutzmitteln, wie Pestizide oder Fungizide, welche häufig aufgrund ihrer Toxizität in vielen Ländern gesetzlichen Bestimmungen unterworfen sind .

15

Die Erfindung betrifft auch die dem Pflanzenschutzmittel zugrundeliegende pflanzliche Zubereitung und ein Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ein Verfahren zur schnellen Feststellung der biologischen Wirksamkeit entsprechender pflanzlicher Zubereitungen, bzw. Extrakte *in vitro*.

20

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der besagten Zubereitung zur Verbesserung belasteter Böden durch Stärkung der ansässigen mikrobiellen Bodenkulturen.

Die Erfindung betrifft schließlich auch Stoffe, die in der erfindungsgemäßen Zubereitung aufgefunden wurden, und die den beschriebenen Wirkungen zugeschrieben werden können oder einen Beitrag hierzu leisten.

25

Pflanzenkrankheiten bei Kultur- bzw. Nutzpflanzen, beziehungsweise ihre Bekämpfung, stellen eine immer größer werdende Herausforderung dar. Durch derartige Krankheiten sowie durch umwelt- und / oder klimabedingte Streßfaktoren, wie beispielsweise ausgeprägte Trocken- bzw. Dürreperioden oder saure, überdüngte oder anderweitig schadstoffbelastete Böden müssen Jahr für Jahr weltweit beachtliche Ertragsverluste hingenommen werden, oder es gehen in unter Umständen ganze Kultur-

30

landschaften verloren. Oft bedingen und verstärken schädliche Umwelt- und Klimaeinflüsse die Ausbreitung entsprechender Krankheiten, da die Pflanzen unter einem permanenten Streß stehen und so in ihrer natürlichen Abwehrkraft geschwächt werden.

5

Pflanzenkrankheiten werden heute überwiegend mit herkömmlichen, chemischen Pflanzenschutzmitteln, wie beispielsweise Pestizide oder Fungizide, bekämpft. Damit lassen sich zunächst rasche und gute Erfolge erzielen, da solche Mittel meist sehr wirksam sind und überdies meist preisgünstig und mit einfachen technischen Mitteln hergestellt werden können, so daß sie insbesondere für die Dritte Welt von Interesse sind. Herkömmliche chemische Pflanzenschutzmittel weisen aber auch beträchtliche, weitreichende Nachteile auf, so daß ihr Einsatz von der Öffentlichkeit zumindest in den industrialisierten Ländern zunehmend kritisch betrachtet wird. So ist ein Nachteil des chemischen Pflanzenschutzes die Selektion resistenter Erregerstämme, die bei der Pilzbekämpfung mit der Einführung der systemischen Fungizide entstanden sind und entstehen. Solche Stämme können oft nur mit noch toxischeren Mitteln bekämpft werden. Pflanzenfungizide verhalten sich somit analog Antibiotika in der Medizin, wo das Resistenzproblem bereits sehr virulent ist. Überdies sind nicht alle Pflanzenkrankheiten, wie z. B. Gefäßmykosen, Virosen oder Bakteriosen mit den bisher bekannten Mitteln erfolgreich zu behandeln. Ein weiterer Nachteil von chemischen Pflanzenschutzmitteln ergibt sich aus ihrer bereits erwähnten oft beträchtlichen Toxizität, die nicht nur ihre Handhabbarkeit sondern auch ihre Auswirkung auf die Umwelt (Böden, Trinkwasser, etc.) betreffen. Über die Nahrungskette können sie oder ihre zum Teil ebenfalls toxischen Metabolite auch vom Menschen aufgenommen werden und zu teilweise irreversiblen körperlichen Schäden oder Krankheiten führen. Demzufolge unterliegen Pflanzenschutzmittel in vielen Ländern der Zulassungspflicht und werden von den Behörden immer restriktiver behandelt.

30 Als eine echte Alternative zu chemischen Pflanzenschutzmitteln werden biologische Mittel auf Basis von Mikroorganismen, Pflanzen, Pflanzenextrakten oder einzelnen isolierten Wirkstoffen oder Wirkstoffgemischen betrachtet, obwohl sie in der Praxis

aus verschieden Gründen noch keine größere Rolle spielen. Beispiele hierfür sind die Behandlung von Gurken und Melonen gegen Anthraknose mit Extrakten von *Colletotrichum lagenarium* (Caruso, Kuc, 1977, Phytopathology 67, 1285), welches selbst der Erreger der Anthraknose ist. Tabak konnte in Feldversuchen gegen Blauschimmel
5 weitgehend durch Behandlung mit Sporensuspensionen von *P. tabacina* geschützt werden (Tuzun, Kuc, 1989, in: McKeen (Ed.), Blue mold of tobacco, 177, APS Press, St. Paul Minnesota). Weiterhin sind Extrakte aus Blättern von Staudenknöterich (*Reynoutria sachalinensis*) gegen Pflanzenschimmel bekannt (Herger et al., 1988, Nachr. Blatt. Dt. Pflanzenschutzdienst 40, 56). Auch über die Schutzwirkung von be-
10 stimmten Bakterien- und Pilzsubstraten auf höhere Nutzpflanzen wurde schon berichtet (Schönbeck et al., 1980, Z. Pfl.Krankheiten, PflSchutz 87, 654). Weiterhin sind auch definierte in der Natur vorkommende Einzelverbindungen wie Salicylsäure oder Acetylsalicylsäure (z.B. Mills, Wood, 1984, Phythopathol., 111, 209) oder Isonicotin-
säure bzw. Isonicotinsäurederivate (Kunz et al., 1988, EP 0026875) bekannt, für die
15 eine Schutzwirkung gegenüber Pflanzen gezeigt werden konnte.

In einigen der bekannten Beispiele des Pflanzenschutzes durch biologische Mittel wurde der Schutz durch induzierte Resistenz hervorgerufen bzw. bewirkt.

20 Unter dem Begriff der induzierten Resistenz einer Pflanze oder auch eines Mikroorganismus versteht man allgemein die Befähigung des betreffenden Organismus, die Entfaltung der Wirkung von schädigenden Faktoren durch bestimmte äußere Behandlungen oder Stoffe zu hemmen, ohne die genetische Konstitution des Organismus zu verändern. Die Widerstandsfähigkeit des Organismus wird generell und dauerhaft erhöht,
25 was zu einer Verminderung der Befallsintensität sowie der Schadwirkung des noch verbleibenden Befalls führt. Induzierte Resistenz zeichnet sich unter anderem vor allem durch fehlende Toxizität der die Resistenz induzierenden Stoffe gegenüber den schädigenden Stoffen, bzw. Schadorganismen (Pathogen), sowie durch das Fehlen einer strengen, linearen Dosis-Wirkungsrelation aus. Eine weitere Konsequenz der indu-
zierten Resistenz bei einer Pflanze kann auf molekularer Ebene beobachtet werden
30 und betrifft die Expression verschiedener Proteine, die nach dem Pathogenbefall bzw. Pathogenkontakt, bzw. dem Kontakt mit dem an sich nicht pathogenen, die Resistenz

induzierenden Stoff gebildet und als PR-Proteine ("pathogenesis related proteins") bezeichnet werden. Zu ihnen gehören unter anderem PR-1 Proteine, β -1,3-Glucanasen (PR-2), Chitinasen (PR-3), Hevein- (PR-4) und Thaumatin/Osmotin- ähnliche Proteine (PR-5) (Schneider et al., 1996, Intern. Review of Cytology 168, 303). In vielen
5 Fällen der induzierten bzw. erworbenen Resistenz kann beobachtet werden, daß der Effekt nicht nur auf die Stelle lokalisiert bleibt, welche mit dem die Resistenz induzierenden Stoff bzw. dem Pathogen direkt in Kontakt gekommen ist, sondern sich systemisch auch auf nicht befallene, noch gesunde Pflanzenteile ausbreitet. Durch Resistenzinduktion wird also ein bereits latent in der Pflanze vorhandenes Potential an
10 unterschiedlichen Abwehrmechanismen dauerhaft aktiviert, welche wiederum abhängig von der Pflanzenart und dem attackierenden Schadstofferreger, bzw. dem die Resistenz induzierenden Stoff, sind. Letztlich ist diese Möglichkeit der Pflanze sich zu wehren, im gewissen Sinn vergleichbar mit der medizinischen Immunisierung beim Menschen durch aktive Impfung. Für den Pflanzenschutz ist die induzierte Resistenz
15 von erheblicher Bedeutung, weil es die Palette seiner Möglichkeiten erweitert und Krankheiten erfassen kann, die einer Bekämpfung mittels der herkömmlichen, oben genannten chemischen Mittel nicht zugänglich sind.

Davon zu unterscheiden sind Mittel, die eine rein pflanzenstärkende Wirkung aufweisen. Pflanzungsstärkungsmittel zeichnen sich durch eine vorübergehende Kräftigung
20 des betreffenden Organismus aus, ohne die immunisierende Wirkung über erworbenen bzw. induzierte Resistenz aufzuweisen.

Biologische Pflanzenschutzmittel sind also eine echte Alternative zu herkömmlichen chemischen, meist stark toxischen Pestiziden, Fungiziden und ähnlich wirkenden
25 Mitteln, da letztere, wie bereits erwähnt, zunehmend restriktiver in bezug auf behördlicher Zulassung behandelt werden und auf Ablehnung in der breiten, ökologisch sensibilisierten Öffentlichkeit stoßen.

Die bislang bekannten biologischen Mittel sind aber oft schwer zu handhaben (wenn
30 sie z. B. auf dem Krankheitserreger selbst basieren, wie beispielsweise Suspensionen von Pilzen oder Bakterien), lassen sich oft nicht einfach in ausreichenden Mengen für den breiten Einsatz in der Land- oder ökologischen Wirtschaft herstellen, sind teilwei-

se nicht spezifisch genug oder weisen sehr oft eine unzureichende Wirkungsintensität gerade im Vergleich mit herkömmlichen Pflanzenschutzmitteln auf. Insbesondere bei Pflanzen, die schon befallen und geschädigt sind, werden die wenigen bekannten, biologischen Mittel kaum eingesetzt, da sie in solchen Fällen wenig und oft erst zu
5 spät Wirksamkeit zeigen. Der Einsatz solcher bekannten biologischen Pflanzenschutzmittel oder Pflanzenstärkungsmittel beschränkt sich somit in der Praxis zumeist allenfalls nur auf die prophylaktische Behandlung, oder wenn die allerersten Anzeichen eines Befalls erkennbar sind und auch dann in der Regel nur auf kleine Pflanzenbestände.

10

Es bestand somit die Aufgabe ein biologisches Pflanzenschutzmittel zur Verfügung zu stellen, daß nicht die oben genannten Nachteile der bekannten biologischen und chemischen Pflanzenschutzmittel aufweist und überdies nicht nur ein reines Pflanzenstärkungsmittel ist. Insbesondere sollte ein Mittel bereitgestellt werden, welches relativ
15 einfach herzustellen und in möglichst geringen Konzentrationen hochwirksam ist sowie für ein breites Spektrum von Pflanzen und Pflanzenkrankheiten auch bei großen Pflanzenbeständen angewendet werden kann.

20 Erfindungsgemäß kann ein solches Mittel zur Verfügung gestellt werden. Es basiert auf einer pflanzlichen Zubereitung, die leicht herzustellen ist.

Gegenstand der Erfindung ist somit eine Zubereitung auf Basis von Pflanzen oder Pflanzenteilen aus den Familien der Nelkengewächse (*Caryophyllaceae*) und der Leguminosen, wobei der Gewichtsanteil des Pulvers, welches aus der Pflanzenfamilie
25 der Nelkengewächse stammt, über 80 % aber unter 99% liegt, und die Zubereitung durch die in den Ansprüchen angegebenen und weiter unten näher spezifizierten Verfahrensmaßnahmen erhalten werden kann.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung der besagten für den biologischen Pflanzenschutz geeigneten Zubereitung auf Basis von Pflanzen oder
30 Pflanzenteilen, welches durch folgende Maßnahmen charakterisiert werden kann:

- (a) Einsetzen von Pflanzen aus den Familien der Nelkengewächse (*Caryophyllaceae*) und der Leguminosen als Ausgangsmaterial;
- (b) Durchführung der für jede Pflanzenfamilie einzeln vorzunehmender Schritte:
- 5 (i) Zermahlen der getrockneten Pflanzen oder Pflanzenteile der entsprechenden Familie,
- (ii) Aufnahme des Mahlgutes in einem polaren, organischen Lösungsmittel,
- (iii) Durchführung einer Rührextraktion der so erhaltenen Suspension,
- (iv) Entfernung des Lösungsmittels, ohne eine vorangegangene Trennung der festen Phase von der löslichen Phase durchgeführt zu haben,
- 10 (v) Trocknen des Rückstandes; und
- (c) Vermischung der beiden gemäß der Schritte b (i) bis b (v) erhaltenen pulverförmigen Produkte im gewünschten Verhältnis.

15 Entscheidend für die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen pflanzlichen Zubereitung ist das Verhältnis des Pflanzenmaterials Nelkengewächse zu Leguminosengewächse. Der Anteil der Nelkengewächse muß mindestens 80 Gewichtsprozent bezogen auf das Pulvergemisch sein, darf jedoch 99 % nicht überschreiten. Die Wirksamkeit ist zwischen 90 und 98% Nelkengewächs-Anteil deutlich erhöht gegenüber den Gemischen mit einer Zusammensetzung von 80 und 99 %. Ein Gemisch mit etwa 95 % Anteil

20 Nelkengewächse und 5 % Anteil Leguminosengewächse ist erfindungsgemäß besonders bevorzugt, da die Wirksamkeit als biologisches Pflanzenschutzmittel mit resistenzinduzierender Wirkung hier ein relativ schmales aber ausgeprägtes Maximum zeigt. Zubereitungen, welche aus nur einer der beiden genannten Pflanzenkomponenten bestehen, sind überraschenderweise unwirksam, ebenso wie Zubereitungen, die einen Anteil von Nelkengewächse aufweisen, der deutlich unter 80 % liegt. Die sprunghaft gestiegene, überraschend hohe Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Zubereitung

25 bei einem Nelkengewächs - Anteil von etwa 95 % läßt vermuten, daß es hier zu einer synergistischen Wirkung der Wirkstoffe aus den Nelkengewächsen und der Leguminosen kommt.

30

Gegenstand der Erfindung ist somit eine bevorzugte Zubereitung auf Basis von Pflanzen oder Pflanzenteilen aus den Familien der Nelkengewächse und der Leguminosen, wobei der Gewichtsanteil des Pulvers, welches aus der Pflanzenfamilie der Nelkengewächse stammt, über 90 bis 98 %, besonders bevorzugt etwa bei 95 % (5 % Legu-
5 minosengewächse) liegt.

Nelkengewächse stellen eine eigene Pflanzenfamilie dar. Sie sind, insbesondere in Mitteleuropa weitverbreitet, und haben sich innerhalb gewisser Grenzen den verschiedensten Boden- und Klimabedingungen angepaßt. Nelkengewächse findet man auf sauren wie auf kalkhaltigen Böden, jedoch bevorzugen sie in der Regel nährstoff-
10 arme Böden. Beispiele für Nelkengewächse, die sich für die Ausführung der Erfindung eignen, sind Heide-Nelke, Büschel-Nelke, Karthäuser-Nelke, Prachtnelke, Leimkraut, Kuckucks-Lichtnelke, Pechnelke, Nachtnelke, Rote Lichtnelke, Echtes und Rotes Seifenkraut, Steinmiere, Waldsternmiere, Rippen-Nebelmiere. Besonders bevorzugt sind die Kuckucks-Lichtnelke (*Lychnis flos-cuculi*) und die gemeine Pechnelke
15 (*Lychnis viscaria*). Erfindungsgemäß können auch verschiedenen Arten gemischt werden. Bevorzugt ist aber der Einsatz von jeweils nur einer Art.

Auch die Leguminosen (Schmetterlingsblütengewächse) stellen eine eigen Pflanzenfamilie dar; unter ihnen gibt es zahlreiche Unterfamilien (z.B. Fabaceae), Gattungen und Arten, die als Nutz- bzw. Futterpflanzen weltweit angebaut werden. Ihre Vertreter weisen einen hohen Anteil an Eiweißstoffen und Stärke auf und stellen keine besonderen Ansprüche an den Boden, da die in den Wurzeln symbiotisch lebenden, stickstoffbindenden Bakterien zur Bodenverbesserung beitragen. Als Beispiele für geeignete
20 Vertreter von Leguminosen können viele Kleearten, wie Echter Steinklee, Gemeiner Wundklee, Gold-Klee, Feld-Klee, Gemeiner Hornklee, Sumpf-Hornklee, Schopf-Hufeisenklee, genannt werden. Ebenso geeignet sind Luzernearten, Süßholz-Tragant, Gelbe Spargelerbse, Ranken-Blatterbse, Wiesen-Blatterbse. Besonders geeignet sind die Luzernenarten, wie beispielsweise Sichel-Luzerne oder Hopfen-Luzerne.
25

30 Zur Bereitstellung der Pflanzen für die Durchführung der Erfindung können diese auch systematisch durch Aussaat angezogen werden. Erfindungsgemäß ist dabei die

Verwendung von Wildformen, die nicht durch züchterische Maßnahmen beeinflusst worden sind, bevorzugt.

Gegenstand der Erfindung ist somit eine entsprechende Zubereitung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß das eingesetzte Pflanzenmaterial von durch Züchtung nicht beeinflussten Wildformen stammt, welche vorzugsweise ohne Behandlung von mineralischen Düngemitteln und / oder Pestiziden aufwuchsen. Dies bedeutet aber nicht, daß das benötigte Pflanzenmaterial nur aus wild wachsenden Pflanzen gewonnen werden kann. Vielmehr kann es auch unter den genannten Bedingungen durch gezielte Ansaat bereitgestellt werden. Vorzugsweise empfiehlt es sich, für jede Saison einen anderen Standort zur Ansaat auszuwählen, dessen Boden zuvor durch entsprechende Analysen charakterisiert werden kann. Prinzipiell reichen die Maßnahmen, die nach den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft EG 2092/91 für den ökologischen Landbau" aus, um befriedigende Endergebnisse zu erlangen. Die Saatgutmengen, die für ein Hektar benötigt werden, richten sich nach der auszusäenden Spezies sowie der speziellen Bodenzusammensetzung. In der Regel reichen 20 bis 30 kg Saatgut / Hektar aus. Weiterhin vorteilhaft für die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Zubereitung ist eine Vorfrucht-Aussaart, insbesondere von Mais oder Weizen. Generell sollte darauf geachtet werden, daß vor und während der Pflanzperiode der Nelken-/Leguminosengewächse keine zusätzlichen Streßfaktoren, wie z.B. Schädlingsbefall oder Kontamination mit Umweltgiften, geschaffen werden. Wird für die Herstellung der erfindungsgemäßen Zubereitung Saatgut verwendet, können durch Aussiebung des schwachen oder kranken Saatgutes noch bessere Ergebnisse erzielt werden.

Erfindungsgemäße Zubereitungen, die aus solchem Pflanzenmaterial hergestellt wurden, zeigen besonders hohe Wirksamkeit. In manchen Fällen läßt sich eine nennenswerte Pflanzenschutzwirkung nur bei derartig behandelten Ausgangspflanzen beobachten. Offensichtlich sind bei den nach den üblichen Standardmethoden kultivierten, bzw. züchterisch veränderten Formen die ursprünglichen latenten Abwehrkräfte bereits stark verkümmert, so daß sie sich nicht mehr für den erfindungsgemäßen Zweck eignen.

Prinzipiell lassen sich alle Pflanzenteile der Nelken-, bzw. Leguminosengewächse für die Herstellung der erfindungsgemäßen Zubereitung verwenden, also beispielsweise Stengel, Blätter, Wurzeln, Blüten oder Samen. Vorzugsweise werden jedoch Samen der entsprechenden Arten eingesetzt.

5

Gegenstand der Erfindung ist somit eine entsprechende Zubereitung, die dadurch gekennzeichnet ist, da die zur Verwendung kommenden Pflanzenteile Samen sind.

10

Das entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren zubereitete Pulver aus den beiden genannten Pflanzenfamilien ist problemlos über einen längeren Zeitraum lagerfähig und kann direkt für den Einsatz zur Behandlung gefährdeter oder erkrankter Pflanzen am besten in Form von wäßrigen Suspensionen zur Verfügung gestellt werden. Bei Anwendungen von großen Mengen auf großen Flächen, insbesondere in der Land- und Felderwirtschaft ist es vorteilhaft, das Pulver zunächst mit einem Träger oder Füllstoff zu versetzen. Dabei eignen sich alle für derartige Zwecke bekannten Materialien, so beispielsweise Gesteinsmehl, Magnesiumsilikatpulver oder Algenmehle. Erfindungsgemäß werden, je nach zu behandelnder Pflanzenart, 2 bis 8 g Pflanzenmischpulver mit 98 bis 92 g des jeweiligen Füllstoffes vermischt.

15

Gegenstand der Erfindung ist somit eine entsprechende Zubereitung, die zusätzlich Füll- oder Trägerstoffe enthält, wobei vorzugsweise der Gewichtsanteil des von den Pflanzen stammenden Mischpulvers bezogen auf die Füll- /Trägerstoffe 2 bis 8 % beträgt. Dieses einsatzfähige Gemisch kann nun wiederum in Wasser aufgenommen und als wäßrige Suspension zur Behandlung eingesetzt werden. Erfindungsgemäß werden 50 bis 400 g, vorzugsweise 100 bis 200 g einer solchen Gesamtmischung (Pflanzenpulver plus Füll-/Trägerstoff) auf einen Hektar eingesetzt. Letztlich hängt die Menge aber von verschiedenen Faktoren, wie Pflanzenart, Befallsart, Befallsentwicklung, bereits vorliegender Schaden, Bodenbeschaffenheit, etc. ab.

20

25

Wie bereits erwähnt, wird die erfindungsgemäße pulverförmige Zubereitung mit oder ohne Füllstoffe vorzugsweise in Wasser aufgenommen, bzw. suspendiert und die erhaltene wäßrige Suspension zum unmittelbaren Einsatz durch Besprühen, Gießen, Imprägnieren oder ähnlichem verwendet. Dabei ist es sowohl für die Wirksamkeit, als auch für die Wirtschaftlichkeit der erfindungsgemäßen Zubereitung von ausschlagge-

30

bender Bedeutung, in welcher Konzentration das besagte Pflanzenmischpulver in dieser wäßrigen Lösung vorliegen kann bzw. muß.

Gegenstand der Erfindung ist somit eine entsprechende Zubereitung, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie durch Zusatz von Wasser als wäßrige Suspension vorliegt, wobei die Konzentration des von den Pflanzen stammenden Mischpulvers 0.1 mg bis 2 mg / l, vorzugsweise 0.5 bis 1.0 mg / l, besonders bevorzugt 0.5 bis 0.6 mg / l (nur auf das Pflanzenpulver bezogen) beträgt. In diesem überraschend niedrigen Wert begründet sich ein großer Teil der erfinderischen Leistung der vorliegenden Anmeldung. Weiterhin ist es als überraschend zu bezeichnen, daß höhere Konzentrationen, so z. B. 5 mg / l, meist eine geringere resistenzinduzierende Wirkung zeigen.

Gegenstand der Erfindung ist also auch die Verwendung der besagten Zubereitung als biologisches Pflanzenschutzmittel, insbesondere als Mittel mit resistenzinduzierender Wirkung. Der Begriff der induzierten Resistenz ist erfindungsgemäß entsprechend den in der Einleitung gemachten Angaben definiert. Die erfindungsgemäße Zubereitung zeigt dabei, sofern gemessen, alle entsprechenden Merkmale, welche für die Wirkung der induzierten Resistenz in Frage kommen.

Die Zubereitung ist in den angegebenen Konzentrationen bei einer breiten Palette unterschiedlicher Pflanzen, wie Getreide oder Gemüse aber auch Zierpflanzen, Ziergehölzen oder Pflanzen der Forstwirtschaft hochwirksam und zwar gegen eine Vielzahl von pathogenen Schimmelarten, darunter Echtem Mehltau, sowie gegenüber Bakterien- oder sogar Virenbefall. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, daß Tabak nach Behandlung nicht nur vor Befall mit Tabakmosaikvirus (TMV) geschützt werden kann, sondern, daß bei bereits mit TMV befallenen Tabakpflanzen eine starke Abnahme der Blattschäden zu beobachten ist.

Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung der genannten Zubereitung zur Erzielung und Förderung der induzierten Resistenz bei Nutz- und Kulturpflanzen gegenüber pathogenen Einflüssen und streßbedingten Faktoren, insbesondere bei bakteriellen, fungiziden oder viralen Infekten. Erfindungsgemäß werden unter dem Begriff "pathogene Einflüsse und streßbedingte Faktoren" auch alle Belastungen und Schädigungen der Pflanze durch Umweltgifte, Bodenbelastung, Klimastreß, wie Dürre- und

Kälteperioden, starke Sonnen- bzw. UV-Bestrahlung, oder auch übermäßige und / oder einseitige Düngung verstanden. Oft sind es gerade solche Faktoren oder Einflüsse, welche die Abwehrkräfte der Pflanze schwächen und so erst einen Pilz-, Bakterien- oder Virenbefall ermöglichen.

5

Neben der Wirkung bzw. Verwendung als biologisches, untoxisches, die resistenz-induzierendes Pflanzenschutzmittel, welches somit nicht den behördlichen Zulassungsaufgaben unterliegt, weist die erfindungsgemäße Zubereitung auch noch pflanzenstärkende Wirkungen auf, die sich zum Beispiel in einer erhöhten Chlorophyllproduktion, im kräftigeren Wuchs, verstärktem Wurzelwachstum und ähnlichem bemerkbar machen können. Das Ausmaß dieses Wirkeffektes hängt allerdings stark von der Art der Pflanze und anderen äußeren Faktoren ab. Es ist durchaus möglich, daß in einigen Fällen, die Wirkung der induzierten Resistenz ohne oder ohne einen merklichen Stärkungseffekt begleitet wird. Um den Stärkungseffekt besonders herauszustellen, genügt im Gegensatz zur Resistenzinduktion in der Regel eine einmalige Behandlung nicht.

10

15

Die erfindungsgemäße Zubereitung kann unter anderem auf die heranwachsenden Pflanzen aufgebracht, vorzugsweise gesprüht, werden. Zur prophylaktischen Behandlung werden dabei die frisch gekeimten oder die jungen Pflanzen, welche das erste, zweite oder dritte Blatt gerade ausgebildet haben, mit der wäßrigen Suspension behandelt. Bei bereits befallenen Pflanzen erfolgt die Behandlung unmittelbar nach Feststellung der Schädigung. Alternativ kann auch das Saatgut durch Besprühen oder Imprägnierung vor Aussaat behandelt werden. Diese Methode hat sich als besonders wirksam gezeigt, um Befall oder Schädigungen zu verhindern.

20

25

Eine weitere erfindungsgemäße Methode ist die vorzugsweise Besprühung oder Begießung der Bodenfläche, auf der das zu schützende Pflanzengut aufwachsen soll. Der keimende Samen kann so die für die Wirkung verantwortlichen Stoffe der erfindungsgemäßen Zubereitung aufnehmen, wodurch die Abwehrkraft der sich entwickelnden Pflanze im erwähnten Sinn gestärkt wird.

30

Die Behandlung des Bodens mit der erfindungsgemäßen Zubereitung hat aber auch noch einen weiteren positiven und erfinderischen Effekt. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß die erfindungsgemäße Zubereitung die im Boden befindlichen und für ein gesundes Wachstum der in ihm wachsenden Pflanzen verantwortlichen mikrobiellen

5 Bodenkulturen überraschenderweise stärkt bzw. regeneriert. Die Anwendung der erfindungsgemäßen Zubereitung kann somit auch auf die Sanierung von belasteten, bzw. Verbesserung verbrauchter Böden ausgedehnt werden. Die erfindungsgemäße Zubereitung wird dabei in den Boden eingebracht, wobei durch ein- oder mehrmalige Umschichtung des Bodens eine bessere Verteilung des Materials bis in eine bestimmte

10 gewünschte Tiefe bei gleichzeitiger Belüftung des Bodens erreicht wird. Die Aktivität der nützlichen Bodenkulturen kann dabei nach Standardmethoden während des Sanierungsvorganges verfolgt werden. Durch Kombination von Bodenbehandlung und Pflanzen- bzw. Samenbehandlung können somit besonders vorteilhafte Ergebnisse erzielt werden. Die überraschende zusätzliche positive Wirkung auf Mikroorganismen

15 befähigt die erfindungsgemäße Zubereitung auch zum Einsatz als Kompostierungsmittel, bzw. Kompostierungsbeschleuniger. Hierbei können, wie gezeigt wurde, insbesondere auch schädigende Fäulnisbakterien stark zurückgedrängt werden. In diesem Sinne läßt sich die erfindungsgemäße Zubereitung auch zur längeren Aufbewahrung und Konservierung von beispielsweise Schnittpflanzen, insbesondere Schnittblumen,

20 erfolgreich einsetzen.

Gegenstand der Erfindung ist somit auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Zubereitung zur Stärkung und Regenerierung von insbesondere in Böden vorkommenden nützlichen Mikroorganismen.

25 Die erfindungsgemäßen Zubereitungen umfassen auch solche Zubereitungen auf Basis von Pflanzen oder Pflanzenteilen aus den Familien der Nelkengewächse und der Leguminosen, welche zusätzlich weitere Bestandteile enthalten können. Solche Bestandteile können im Prinzip Düngemittelzusätze, insbesondere auf organischer Basis, Bodenverbesserungszusätze, inklusive nützliche Mikroorganismen, oder Zusätze, welche die Wirkung der erfindungsgemäßen Zubereitung zu verstärken oder zu regulieren

30 vermögen.

Verstärkende Zusätze im Sinne der Erfindung können herkömmliche Pflanzenschutzmittel sein, falls der Befall, bzw. die Schädigung der betreffenden Pflanzen bereits so intensiv ist, daß mit derartigen Zusätzen, die erfindungsgemäße Wirkung zumindest temporär unterstützt werden muß, um die Pflanzen noch zu retten. In solchen Fällen
5 ist die benötigte Menge an herkömmlichen Pflanzenschutzmitteln generell wesentlich geringer als ohne Einsatz der erfindungsgemäßen Zubereitung, so daß die Belastung der Umwelt mit derartigen Zusätzen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Zubereitung deutlich geringer ausfällt.

10 Regulierende Zusätze im Sinne der Erfindung sind vorzugsweise pflanzliche Zubereitungen, welche insbesondere die pflanzenstärkenden Effekte der erfindungsgemäßen Zubereitung in Fällen, in denen es gewünscht ist, zu regulieren vermögen. Da durch Applikation der erfindungsgemäßen Zubereitung sehr häufig bestimmte Inhaltsstoffe
15 in den behandelten Pflanzen vermehrt gebildet werden, kann es erwünscht sein, diesen Effekt wieder herunterzufahren bzw. sogar unter das normale Maß zu senken. Beispiele hierfür sind der Nikotingehalt von Tabakpflanzen oder der Proteingehalt von für bestimmte Anwendungen benötigte Getreide (z.B. Braugerste). Ein Beispiel für einen solchen regulierenden Zusatz sind entsprechend dem erfindungsgemäßen Verfahren
20 gewonnene Pulver aus Senfpflanzen oder Wildkirschen. Der Anteil solcher regulierender Zusätze an der Gesamtmischung kann erfindungsgemäß zwischen 0.5 und 10% liegen.

Die Zusätze werden vorteilhafterweise in pulverisierter Form zu dem erfindungsgemäßen Pflanzenpulver gegeben und mit diesem vermischt.

25 Die erfindungsgemäße Zubereitung weist, zusammengefaßt, die folgenden wichtigsten Vorteile auf:

Sie bewirkt bei den behandelten verschiedenartigsten Pflanzen induzierte Resistenz. Sie ist sowohl bei nicht - befallenen (als Prophylaxe) als auch bei befallenen Pflanzen zu beobachten. Der Wirkungsgrad der befallenen Pflanzen liegt im Durchschnitt zwischen 30 und 75%, vorzugsweise zwischen 50 und 70%, d.h. daß beispielsweise die
30 Blattschäden nach erfolgter einmaliger Behandlung nur noch 25 bis 70 % (30 bis 50%) des ursprünglichen Befalls betragen. In bestimmten Fällen können auch Wirkungsgra-

- de über 90% erreicht werden. Prophylaktisch behandeltes Pflanzen- oder Bodenmaterial weist in den meisten Fällen kein oder nur einen geringfügigen Befall auf, wenn die Pflanzen dem Pathogen nach Behandlung mit der erfindungsgemäßen Zubereitung ausgesetzt wird. Mittels der erfindungsgemäßen Zubereitung können Pilzerkrankungen wie Mehltau, Echtem Mehltau, Blauschimmel und Grauschimmel bei zahlreichen Kulturpflanzen, wie Tomaten, Gurken, Weizen, usw. erfolgreich behandelt werden. Besonders hervorzuheben ist die Wirksamkeit der Zubereitung gegenüber Tabakmosaikvirus bei Tabakpflanzen. Dies ist der erste Fall, daß ein auf Pflanzen basierendes biologisches Mittel gegenüber Virenbefall bei Pflanzen im hohen Maß wirksam ist.
- Die erfindungsgemäße Zubereitung wirkt nicht toxisch gegenüber dem die Pflanzenkrankheit auslösenden Pathogen, z.B. dem Bakterium, dem Pilz oder dem Virus und erfüllt somit eine wichtige Voraussetzung für das Vorhandensein von induzierter Resistenz. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß die erfindungsgemäße Zubereitung das Myzelwachstum von Pilzen konzentrationsunabhängig in keinerlei Weise beeinträchtigt, also nicht fungizid wirkt, und somit im Gegensatz zu den klassischen Pflanzenschutzmitteln steht.
- Weiterhin konnte gezeigt werden, daß wichtige für die Resistenzinduktion verantwortliche PR-Proteine, wie unter anderem Chitinase und β -1,3-Glucanase bei Applikation der erfindungsgemäßen Zubereitung auf Pflanzen deutlich verstärkt (30 bis 50%ige Steigerung) gebildet werden.
- Besonders bemerkenswert ist auch die erfindungsgemäße minimale Wirkkonzentration, welche ein relativ schmales Maximum zwischen 0.5 mg und 1 mg / l aufweist. Pflanzenschützende Naturextrakte, die in vergleichbar geringen Konzentrationen wirken, sind bislang nicht bekannt.
- Die erfindungsgemäße Zubereitung bewirkt, daß die behandelte Pflanze gesund wird oder bleibt. Gleichzeitig werden auch pflanzenstärkende Effekte wirksam. Zusammengekommen können in vielen Fällen dadurch Ertragssteigerungen von 20 bis 50%, sogar im Feldmaßstab (in Abhängigkeit von den anderen speziellen Bedingungen) erzielt werden. Diese Steigerungen können sogar im Vergleich zu gesunden Kontrollpflanzen (ohne Behandlung mit der erfindungsgemäßen Zubereitung) erreicht werden. Dies bedeutet, daß der Einsatz der erfindungsgemäßen Zubereitung beispielsweise

mittels prophylaktischer Boden- und /oder Samen-/ Pflanzenbehandlung zur Ertragssteigerung von gesunden und abwehrstarken Pflanzen führt.

5 Die erfindungsgemäße Zubereitung kann, wie folgt hergestellt werden, wobei naheliegende Varianten und Abänderungen, sofern nichts anderes hierüber gesagt wird, eingeschlossen sind. Die Behandlung bzw. Aufzucht der Pflanzen wurde bereits weiter oben beschrieben.

Es soll hier nochmals betont werden, daß für jeden Vertreter der beiden erfindungsgemäßen Pflanzenfamilien (Nelkengewächse, Leguminosen) vorzugsweise ein eigener
10 Aufarbeitungsweg bis zu der entsprechenden Vermischung erfolgen sollte, um die volle erfindungsgemäße Wirkung zu erzielen.

Geht man von Pflanzen bzw. Pflanzenteilen aus so werden diese zunächst nach üblichen Methoden schonend getrocknet. Temperaturen von über 40° C sollten hierfür, aber auch für alle weiteren Verfahrensschritte, gemieden werden. Das getrocknete
15 Pflanzenmaterial, wobei Samen mit eingeschlossen sind, wird in einer handelsüblichen Mühle fein gemahlen. Die Korngröße sollte 0.05 mm nicht unterschreiten und 0.5 mm nicht überschreiten, um optimale Extraktionseffekte zu erzielen. Vorzugsweise weist das gemahlene Material eine durchschnittliche Korngröße von 0.1 bis 0.2 mm auf.

20 Das gemahlene Material wird nun mit einem organischen, polaren Lösungsmittel versetzt und die erhaltene Suspension intensiv bei vorzugsweise Raumtemperatur gerührt. Temperaturen von deutlich unter 15° C sind zumeist mit einem Wirkungsverlust verbunden und sollten daher vermieden werden. Als polares organisches Lösungsmittel
25 eignen sich insbesondere niedere Alkohole wie z.B. Ethanol, n-Propanol, iso-Propanol oder n-Butanol. Auch Gemische verschiedener Alkohole sind möglich. Besonders bevorzugt ist Ethanol. Methanol ist nur bedingt einsetzbar. Für alle verwendeten Lösungsmittel gilt, daß sie hochrein sein sollten, also z. B. keine Vergällungsstoffe oder andere Unreinheiten enthalten. Das Lösungsmittel kann 0 bis 30 % Wasser
30 enthalten. Ein hoher Anteil von Wasser erschwert allerdings sehr häufig das spätere notwendige Entfernen des Lösungsmittels. Erfindungsgemäß werden ein bis vier Vo-

lumenteil Lösungsmittel, vorzugsweise 1.5 bis zwei Volumenteile Lösungsmittel, auf ein Volumenteil gemahlenes Pflanzenmaterial eingesetzt.

Es erfolgt eine Rührextraktion über drei bis sechs, vorzugsweise vier bis fünf Tage bei vorzugsweise Raumtemperatur. Gegebenenfalls wird etwas Lösungsmittel dem Ansatz
5 hinzugefügt, um Verdunstungseffekte auszugleichen. Anschließend wird das Lösungsmittel vorsichtig entfernt, am günstigsten mittels eines Rotationsverdampfers unter leichtem Vakuum, wobei Temperaturen von 40°C nicht überschritten werden sollten. Auch einfaches Verdunstenlassen zwischen 30 und 40°C ist geeignet. Erfindungswesentlich ist also, daß die während der Extraktion in Lösung gegangenen Stoffe
10 nicht abgetrennt, sondern vielmehr wieder dem festen, "angelösten" Rückstand zugeführt werden. Der so erhaltene, ggf. noch feuchte Rückstand wird mit einem handelsüblichen Trockenaggregat getrocknet, wobei ein Feuchtigkeitsgehalt von weniger als 10% angestrebt werden sollte. Man erhält somit ein rückstands- und lösungsmittelfreies, pulvriges Produkt, welches entsprechender Gefahrstoff-Verordnungen als gesund-
15 heitlich unbedenklich eingestuft werden kann.

Die erhaltenen Pulver, welche aus Pflanzen der Nelkengewächse und der Legumino-
sen stammt, werden dann, entsprechend der oben und in den Ansprüchen angegebenen
20 Anteile ggf. unter Hinzufügung der genannten Füll-/Trägerstoffe vermischt, und unmittelbar vor Einsatz in Wasser gelöst bzw. suspendiert, wobei die angegebenen Konzentrationen eingestellt werden.

Gegenstand der Erfindung ist außerdem ein in-vitro-Schnelltestverfahren zur Ermitt-
25 lung der biologischen Wirksamkeit der oben und in den Ansprüchen spezifizierten Zubereitung als biologisches Pflanzenschutzmittel mit Resistenz induzierender Wirkung, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine Probe einer besagten Zubereitung mit einer zur Gärung befähigten Mikroorganismen-Kultur versetzt und die CO₂-
Entwicklung als Maß für die durch die Wirkstoffe induzierte Zellteilungsrate unter den
30 hierfür üblichen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle mißt. Überraschenderweise hat sich nämlich gezeigt, daß die resistenzinduzierende Wirkung der erfindungsgemäßen Zubereitung, welche erst zu einem späteren Zeitpunkt durch aufwendige Versuche

in-vivo an höheren Pflanzen nachgewiesen werden kann, in einem frühen Stadium mittels eines leicht handhabbaren Mikroorganismus, beispielsweise Bäckerhefe, erkennbar gemacht werden kann. Es konnte also zumindest in bezug auf die erfindungsgemäße Zubereitung eine direkte Relation zwischen induzierter Resistenz bei höheren Pflanzen und erhöhter Zellteilungsrate bei Mikroorganismen hergestellt werden, wobei die erhöhte Zellteilungsrate sich leicht durch die vermehrte Freisetzung von CO₂ messen läßt. Die vermehrte CO₂-Entwicklung ist allerdings in vielen Fällen relativ gering, so daß mit den herkömmlichen Gärungssaccharometern nur ungenaue Aussagen gemacht werden können. Um die Messung über die leicht handhabbaren und einfachen bekannten Gärungsröhrchen dennoch durchführen zu können, müssen diese größere Volumina mit entsprechend feiner und langer Meßskala aufweisen. Erfindungsgemäß besitzen geeignete Gärungsröhrchen Volumina von mindestens 50 ml, vorzugsweise weisen sie 60 bis 80 ml auf. Das skalierte Meßröhrchen als Bestandteil des Gärungssaccharometer sollte einen Durchmesser zwischen 0.5 und 1.5 cm, vorzugsweise 0.8 bis 1.2 cm über eine Länge von 10 bis 30 cm aufweisen.

Bei der Untersuchung der erfindungsgemäßen Zubereitungen auf wirkstoffhaltige Substanzen wurde gefunden, daß neben einer Reihe von Phytosterolen auch mindestens drei Brassinosteroid-Verbindungen vorliegen, wobei eine Verbindung noch nicht identifiziert werden konnte, eine als 24-epi-castasteron ((22*R*,23*R*,24*R*)-2,3,22,23-tetrahydroxy-24-methyl-5 α -cholestan-6-on), die andere 24-epi-secasteron ((22*R*,23*R*,24*R*)-22,23-dihydroxy-2 β ,3 β -epoxy-24-methyl-5 α -cholestan-6-on) ist. Letzteres war bislang als Naturstoff noch nicht bekannt. Die Erfindung betrifft also somit auch die Verwendung von 24-epi-secasteron und 24-epi-castasteron als resistenzförderndes Mittel für Pflanzen. Ob diese Verbindungen für die resistenzfördernde Wirkung alleine verantwortlich sind, oder auch noch andere Substanzen hierbei beteiligt sind, oder ob synergistische Effekte verschiedener Komponenten der erfindungsgemäßen Zusammensetzung eine Rolle spielen, ist am Anmeldetag noch nicht bekannt gewesen. Brassinosteroide gehören zu den Phytohormonen und sind als Pflanzenwachstumsregulatoren mit wachstumsfördernder Aktivität bekannt. Sie treten im allgemeinen in Mengen von ng - μ g/ kg Pflanzenmaterial auf (z. B. Clouse und Sasse, 1998, Rev.

Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49, 427). 24-epi-castasteron kann z.B. aus der Grünalge *Hydrodictyon reticulatum* (Yokata et al., 1987, Phytochemistry, 26, 503) oder aus *Beta vulgaris* (Schmidt, J. et al., 1994, Phytochemistry 36, 175) isoliert werden. 24-epi-Secasteron war bislang nur als synthetisches Produkt bekannt (Voigt et al., 1995, J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 1495).

Weiterhin wurden in der erfindungsgemäßen Zusammensetzung eine Reihe von Phytosterolen identifiziert, wie Spinasterol, Colesterol, Campesterol, Campestanol, Stigmasterol, Stigmast-22-en-3 β -ol, 24-methylcholest-7-en-3 β -ol, Spinasterol, Sitosterol, Sitostanol, Dihydrospinasterol, 24-methylcholesta-5,22-dien-3 β -ol, und 24-methyl-cholesta-7,22-dien-3 β -ol. Der Hauptanteil dieser Fraktion wird von Spinasterol (85 – 90%) getragen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter verdeutlichen, ohne sie einzuschränken:

Beispiel 1:

1.2 g Samen der Kuckucks-Lichtnelke werden in einer Gewürzmühle fein gemahlen (durchschnittliche Teilchengröße 0.12 mm). Das Pulver wird getrocknet, so daß es einen Feuchtigkeitsgehalt von 7 bis 8% aufweist. Das Pulver wird in 20 – 30 ml reinem Ethanol (99%) aufgenommen und mittels eines elektrischen Laborrührers ca. 100 h bei 20 bis 25°C gerührt. Falls die Mischung zu sehr eindickt, wird entsprechen Ethanol zugegeben. Nach erfolgter Extraktion wird das Lösungsmittel bei Raumtemperatur am Rotationsverdampfer vorsichtig abgezogen. Der Rückstand wird ggf. weiter getrocknet, bis ein feines Pulver vorliegt.

Beispiel 2:

Analog Beispiel 1 werden Samen der Sichel-Luzerne (1.2 g) gemahlen und der Rührextraktion unterworfen. Man erhält ebenfalls ein getrocknetes Pulver.

Beispiel 3:

950 mg des Pulvers, hergestellt nach Beispiel 1, und 50 mg des Pulvers, hergestellt nach Beispiel 2, werden innig miteinander vermischt. 50 mg dieses Gemisches werden

in 100 l Wasser gegeben und gut vermengt. Die Lösung kann direkt zum Besprühen von ca. 100 m² Feldfläche eingesetzt werden.

Beispiel 4:

- 5 Man stellt, wie beschrieben, 6 g eines Gemisches, gewonnen aus Lichtnelkenblättern und Luzernenblättern, her (5.7 g Nelkenpulver, 0.3 g Luzernenpulver). Diese Menge wird zu 96 g Getreismehl gegeben, bzw. mit diesem innig vermischt. Zu diesem Gemisch werden in einem ca. 15.000 l fassenden Rührtank 10.000 l Wasser gegeben. Die Menge reicht aus, um einen Hektar Ackerfläche zu behandeln.

10

Beispiel 5:

- Im Gewächshaus werden Tabakpflanzen der hypersensitiv reagierenden Sorte „Xanthi NN“ kultiviert. Ein Teil der Pflanzen wird mit Wasser, welchem 0.125 % Tween 20 als Netzmittel zugesetzt sind, besprüht. Diese Pflanzen stellen die Kontrolle dar. Der
15 andere Teil der Pflanzen wird mit einer Lösung, welche 1 mg / l Pflanzenmehl (95/5 Mischung aus Nelken/Luzernen) und ebenfalls Tween 20 als Netzmittel (0.125%) enthält besprüht.

- Nach 5 Tagen der Inkubation werden die Pflanzen mit Tabakmosaikvirus inokuliert. Hierzu wurde zuvor TMV befallenes Pflanzenmaterial in 0.1 M Natriumphosphat-Puffer (pH = 6.8) gemörst und mit wenig Carborundum als Reibmittel versetzt. Die-
20 se Suspension wird anschließend mit einem Pinsel auf das zweite und dritte Laubblatt (von unten gezählt) der behandelten als auch der Kontrollpflanzen aufgerieben.

- Nach 6 Wochen wurde das Schadbild bzw. der Befall bewertet (% der Blattfläche, Läsionsdurchmesser in mm).
25

Tab. 1

- Wirkung der erfindungsgemäßen Zubereitungen unterschiedlicher Konzentrationen auf mit TMV befallenen Blättern von Tabakpflanzen. Angegeben sind die Blattschäden in % bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Pflanzen = 100%).*
30

5

Konz. Zubereitung / Ta- bakblätter	0 mg / l (Kon- trolle)	0.5 mg / l	1.0 mg / l	2.0 mg / l
2. Blatt	100%	80 %	50 – 60%	63 – 80%
3. Blatt	100%	n.b	35 – 62%	65 – 75%

Beispiel 6:

10

Analog Beispiel 5 werden Weizenpflanzen nach Behandlung mit der erfindungsgemäßen Zubereitung (Kontrollpflanzen: nur mit Wasser) mit Echtem Mehltau infiziert und die Blattschäden bestimmt. Die Ergebnisse sind der Tab. 2 zu entnehmen.

Tab. 2:

15

Wirkung der erfindungsgemäßen Zubereitungen unterschiedlicher Konzentrationen auf mit Echtem Mehltau befallenen Weizenpflanzen. Angegeben sind die Blattschäden in % bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Pflanzen = 100%).

20

Konz. Zubereitung / Wei- zen	0 mg / l (Kon- trolle)	0.25 mg / l	0.5 mg / l	1.0 mg / l	2.0 mg / l
2. Blatt	100%	70 – 90%	65 – 75 %	85 – 95 %	74 – 87%
3. Blatt	100%	78 – 85%	70 – 80 %	80 – 90 %	75 – 85%

25

30

Beispiel 7:

Analog Beispiel 5 werden Gurken nach Behandlung mit der erfindungsgemäßen Zubereitung (Kontrollpflanzen: nur mit Wasser) mit Echtem Mehltau infiziert und die Blattschäden bestimmt. Die Ergebnisse sind der Tab. 3 zu entnehmen.

5

Tab. 3:

Wirkung der erfindungsgemäßen Zubereitungen unterschiedlicher Konzentrationen auf mit Echtem Mehltau befallenen Gurkenpflanzen. Angegeben sind die Blattschäden in % bezogen auf die Kontrolle (unbehandelte Pflanzen = 100%).

10

Konz. Zubereitung / Gurken	0 mg / l (Kontrolle)	0.5 mg / l	1.0 mg / l	2.0 mg / l
2. Blatt	100%	70 – 85 %	85 – 95 %	40 – 70%
3. Blatt	100%	60 – 65 %	82 – 90 %	35 – 75%

15

20

Beispiel 8:

Analog Beispiel 5 werden Tomatenpflanzen nach Behandlung mit der erfindungsgemäßen Zubereitung (Kontrollpflanzen: nur mit Wasser) mit Grauschimmel (*Botrytis cinerea*) infiziert und die Blattschäden bestimmt.

25

Eine Behandlung mit der erfindungsgemäßen Zubereitung in einer Konzentration von 0.6 mg / l bewirkt eine Verminderung der Blattschäden im Vergleich zur unbehandelten aber ebenfalls mit Grauschimmel infizierten Kontrolle um 55 – 65 %. Eine Behandlung mit einer zehnfach konzentrierteren Lösung der erfindungsgemäßen Zubereitung bewirkt eine Abnahme der Schäden lediglich zwischen 48 und 56%.

30

Beispiel 9:

Entsprechend Beispiel 5 werden Weizen, Tomaten, Gurken- und Bohnenpflanzen im Gewächshaus aufgezogen und mit der erfinderischen Zubereitung, wie beschrieben, behandelt. Ein Teil der Pflanzen wird als Kontrolle eingesetzt. Eine Infektion mit
5 Krankheitserregern erfolgt bei diesen Versuchen nicht. Nach sechs Wochen werden verschiedenen Parameter wie Frischgewicht, Blattfläche, Sproßlänge und Chlorophyllgehalt nach gängigen Standardmethoden bestimmt und mit denen der Kontrollpflanze verglichen.

Bis auf eine Ausnahme konnte in allen Fällen eine Steigerung der genannten Parameter beobachtet werden:

Frischgewicht: Steigerung um 21(Weizen) bis 57% (Tomate);
Sproßlänge: Steigerung um 15(Bohne) bis 34% (Tomate);
Chlorophyllgehalt: Steigerung um 8 (Weizen) und 76% (Gurke), bzw. 90% (Bohne),
15 lediglich bei Tomaten konnte keine signifikante Steigerung des Chlorophyllgehaltes festgestellt werden.

Beispiel 10:

10 Liter einer Lösung der erfindungsgemäßen Zubereitung in einer Konzentration von 0.6 mg / l werden auf einen Kulturboden (Fläche: ca. 10 m²) im Gewächshaus oberflächlich versprüht. Auf diesen Boden werden Weizen, Tomaten und Bohnenpflanzen
20 angepflanzt. Ein Teil der Pflanzen wird als Kontrolle auf unbehandeltem Boden aber unter sonst gleichen Bedingungen aufgezogen. Nach sechs Wochen werden verschiedenen Parameter wie Frischgewicht, Blattfläche, Sproßlänge und Chlorophyllgehalt bestimmt und mit denen der Kontrollpflanze verglichen.

25 Während bei Weizen und Tomate unter diesen Bedingungen keine signifikante Steigerung der genannten Parameter zu beobachten waren, erhöhte sich bei Bohnenpflanzen das Frischgewicht um durchschnittlich 21%, die Blattfläche um 18%, die Sproßlänge um 25% und der Chlorophyllgehalt um 5% gegenüber den jeweiligen Kontrollpflanzen.
30

Beispiel 11:

Es wird das Myzelwachstum des Erregers der Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel, *Phytophthora infestans*, in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der erfindungsgemäßen Zubereitung auf V8-Agar gemessen. Es konnte gezeigt werden, daß
5 das Myzelwachstum im gesamten gemessenen Konzentrationsbereich zwischen 0.5 und 1000 mg / l der erfindungsgemäßen Zubereitung nicht signifikant beeinflusst wird. Dies bedeutet, daß das erfindungsgemäße Mittel keine toxische Wirkung auf den Pilz ausübt. Die erfindungsgemäße Wirkung ist somit nicht durch einen fungiziden Einfluß zu erklären, wie dies bei herkömmlichen Pflanzenschutzmitteln der Fall ist.

10

Beispiel 12:*Aufreinigung und Identifizierung von Brassinosteroiden:*

Nach Beispiel 1 hergestelltes Pulver (25g) wurde dreimal mit 200 ml Methanol innerhalb einer Woche und anschließend dreimal mit 200 ml eines Gemisches aus Methanol / Essigsäureethylester (1:1 v/v) ebenfalls eine Woche lang extrahiert. Die vereinten
15 Extrakte wurden im Vakuum konzentriert. Der Rückstand wurde mit Wasser / Essigsäureethylester (1:1 v/v) ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigsäureethylester-Phasen wurden im Vakuum konzentriert und der Rückstand dreimal mit einem Methanol (90%ig) / n-Hexan – Gemisch ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßrigen Methanol-
20 Phasen wurden konzentriert und mit einem Gemisch aus Essigsäureethylester / gesättigte Natriumhydrogencarbonatlösung (1:1 v/v) ausgeschüttelt. Der Rückstand der Essigsäureethylester-Phasen wurde auf einer Kieselgelsäule (20cm x 1 cm, 35-70 mesh Kieselgel, Merck, Germany) chromatographiert. Die Säule wurde sukzessive mit
25 Chloroform (50 ml) und dann mit Methanol in Chloroform (2, 5, 10, 15, 20, 100 v/v %, jeweils 50 ml) eluiert. Das Eluat wurde in 25 ml Fraktionen gesammelt. Die biologische Aktivität wurde mit dem Reis-Lamina-Inklinationstest gemessen. Dieser Test wurde speziell für die Phytohormongruppe der Brassinosteroide entwickelt (Arima et al., 1984, Phytochemistry 23, 1587). Die Fraktion mit biologischer Aktivität (Fraktion
30 5) wurde mittels präparativer HPLC-Chromatographie weiter gereinigt (4,6 x 250 mm Ultrasphere ODS RP-18 Säule). Die mobile Phase bestand aus A (Wasser, 0,1% TFA v/v) und B (Methanol) mit einer Flußrate von 1ml / min. Das Gradientenprofil war: 0-

1 min: 100% A, 1-10 min: 0-40% B (linear), 10-15 min: 40 B, 15-27 min: 40 –100% B (linear), 27-35 min: 100% B, 35-37 min: 0-100% A (linear). Die aktiven Fraktionen hatten eine Retentionszeit von 25,5-29,5 min und wurden zwecks GC-MS-Analyse konzentriert und derivatisiert. Folgende Bedingungen wurden verwendet: EI (70 eV),
5 200°C Quelltemperatur, Säule: DB-5MS (J&W, 15m x 0,32 mm, 0,25 µm Filmdicke), Einspritztemperatur: 260°C, Interface-Temperatur: 300 °C, Trägergas: Helium, Flußrate: 1 ml / min; Säulen-Temperaturprogramm: 170 °C für 1 min, aufheizen auf 290 °C mit 30 °C / min, 20 min bei 290°C. Die Derivatisierung erfolgte nach Standardmethoden. Zur Identifizierung von 24-epi-castasteron und 24-epi-secastron wurden
10 auch authentische Proben auf dem GC-MS-System untersucht.

Reinigung und Identifizierung von Phytosterolen :

Die oben erhaltene n-Hexan-Fraktion wurde konzentriert, in zwei Portionen aufgeteilt, und auf zwei identischen Kieselgel-Säulen (20 cm x 1cm, 35-70 mesh, Merck) chromatographiert. Die Säulen wurden stufenweise mit n-Hexan (50 ml) und dann mit
15 Essigsäureethylester in n-Hexan (10, 30, 50, 70, 90 v/v %, jeweils 50 ml) eluiert. Das Eluat wurde in 6 ml-Fractionen gesammelt und mittels DC (Laufmittel: Chloroform/ Methanol, 95:5 v/v) aufgetrennt. Die Phytosterole wurden durch Ansprühen mit 5 % Schwefelsäure in Essigsäureanhydrid und Erhitzen der DC-Platten auf 150° C sichtbar
20 gemacht. Die Fraktionen, die Phytosterole enthielten, wurden weiter mittels Kieselgelsäulen gereinigt, wobei als Elutionsmittel Dichlormetan / Heptan (1:1 v/v) eingesetzt wurde. Die sterolhaltige Fraktion wurde acetyliert und durch GC-MS nach Standardmethoden analysiert.

25

30

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung einer für den biologischen Pflanzenschutz geeigneten
Zubereitung auf Basis von Pflanzen oder Pflanzenteilen, dadurch gekennzeichnet, daß
5 man
(a) Pflanzen aus den Familien der Nelkengewächse (*Caryophyllaceae*) und der
Leguminosen als Ausgangsmaterial einsetzt;
(b) für jede Pflanzenfamilie die folgenden Schritte getrennt durchführt:
(i) Zermahlen der getrockneten Pflanzen oder Pflanzenteile der entsprechenden Fa-
10 milie,
(ii) Aufnahme des Mahlgutes in einem polaren, organischen Lösungsmittel,
(iii) Durchführung einer Rührextraktion der so erhaltenen Suspension,
(iv) Verdampfung des Lösungsmittels, ohne eine vorangegangene Trennung der festen
Phase von der löslichen Phase durchgeführt zu haben,
15 (v) Trocknen des Rückstandes;
(c) und die beiden gemäß der Schritte b (i) bis b (v) erhaltenen pulverförmigen Pro-
dukte miteinander im gewünschten Verhältnis vermischt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die durchschnittliche
20 Korngröße des gemahlenen Pflanzenmaterials zwischen 0.1 und 0.2 mm liegt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß für die
Rührextraktion 1.5 bis 2 Volumenteile Lösungsmittel auf 1 Volumenteil gemahlenes
25 Pulver eingesetzt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als
Lösungsmittel unvergälltes 98 - 100% iges Ethanol eingesetzt wird.
- 30 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die
Rührextraktion während einer Dauer von etwa 96 bis 120 Stunden durchgeführt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß jeder der Verfahrensschritte bei einer Temperatur zwischen 15 und 40° C durchgeführt wird.
- 5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Wassergehalt des getrockneten Pulvers kleiner als 10 % ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Gewichtsanteil des Pulvers, welches aus der Pflanzenfamilie der Nelkengewächse
10 stammt, 90 – 98 % beträgt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewichtsverhältnis Pulver aus Nelkengewächsen zu Pulver aus Leguminosen 95 zu 5 beträgt.
- 15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das eingesetzte Pflanzenmaterial von durch Züchtung nicht beeinflussten Wildformen stammt, welche vorzugsweise ohne Behandlung mit mineralischen Düngemitteln und / oder Pestiziden aufwuchsen.
- 20 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Samen der entsprechenden Pflanzen eingesetzt werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich das gemäß Anspruch 1 (c) erhaltene Mischpulver mit einem festen pulverförmigen Träger- oder Füllstoff vermischt wird.
25
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das gemischte Pulver unmittelbar vor Applikation als biologisches Pflanzenschutzmittel in
30 Wasser suspendiert wird, wobei eine Konzentration von 0.1 bis 2 mg Pulver / l eingestellt wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß eine Konzentration von 0.5 bis 1.0 mg Pulver / l gewählt wird.
- 5 15. Zubereitung auf Basis von Pflanzen oder Pflanzenteilen aus den Familien der Nelkengewächse (*Caryophyllaceae*) und der Leguminosen, wobei der Gewichtsanteil des Pulvers, welches aus der Pflanzenfamilie der Nelkengewächse stammt, über 80 % aber unter 99% liegt, erhältlich durch die in den Ansprüchen 1 bis 7 angegebenen Verfahrensmaßnahmen.
- 10 16. Zubereitung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Gewichtsanteil des Pulvers, welches aus der Pflanzenfamilie der Nelkengewächse stammt, 90 – 98 % beträgt.
- 15 17. Zubereitung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewichtsverhältnis Pulver aus Nelkengewächsen zu Pulver aus Leguminosen 95 zu 5 beträgt.
18. Zubereitung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das eingesetzte Pflanzenmaterial von durch Züchtung nicht beeinflussten Wildformen stammt, welche vorzugsweise ohne Behandlung von mineralischen Düngemitteln und
20 / oder Pestiziden aufwuchsen.
19. Zubereitung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Samen der entsprechenden Pflanzen verwendet werden.
- 25 20. Zubereitung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie Verbindungen aus der Gruppe der Brassinosteroide enthält.
- 30 21. Zubereitung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß sie 24-epi-secasteron und / oder 24-epi-castasteron enthält.

22. Zubereitung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich feste, pulverförmige Träger- bzw. Füllstoffe enthält.
23. Zubereitung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Gewichtsanteil
5 des von den Pflanzen stammenden Mischpulvers bezogen auf den Füll- /Trägerstoff 2 bis 8 % beträgt.
24. Zubereitung nach einem der Ansprüche 15 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch Zusatz von Wasser als wäßrige Suspension vorliegt, wobei die Konzentrati-
10 on des von den Pflanzen stammenden Mischpulvers 0.1 mg bis 2 mg / L beträgt.
25. Zubereitung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration des von den Pflanzen stammenden Mischpulvers 0.5 mg bis 1.0 mg / L beträgt.
- 15 26. Zubereitung nach einem der Ansprüche 15 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich die Wirkung verstärkende oder regulierende Zusätze enthält.
27. Verwendung einer Zubereitung gemäß der Ansprüche 15 bis 26 als biologisches
20 Pflanzenschutzmittel.
28. Verwendung nach Anspruch 27 zur Erzielung und Förderung der induzierten Resistenz bei Nutz- und Kulturpflanzen gegenüber pathogenen Einflüssen und streß-
bedingten Faktoren.
- 25 29. Verwendung nach Anspruch 27 zur Erzielung und Förderung der induzierten Resistenz bei Nutz- und Kulturpflanzen gegenüber fungiziden, bakteriziden und viralen Infekten.
- 30 30. Verwendung nach Anspruch 27 zur Bekämpfung / Behandlung von Echtem Mehltau- und Tabakmosaikvirus-Befall.

31. Verwendung einer Zubereitung gemäß der Ansprüche 15 bis 26 als Pflanzenstärkungsmittel.
32. Verwendung einer Zubereitung gemäß der Ansprüche 15 bis 26 zur Stärkung
5 nützlicher mikrobieller Bodenkulturen gegenüber pathogenen Einflüssen.
33. Verwendung von 24-epi-secastron und / oder 24-epi-castasteron als biologisches Pflanzenschutzmittel mit Resistenz induzierender Wirkung.
- 10 34. In-vitro-Schnelltestverfahren zur Ermittlung der biologischen Wirksamkeit einer Zubereitung gemäß der Ansprüche 15 bis 26 als biologisches Pflanzenschutzmittel mit Resistenz induzierender Wirkung, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe der besagten Zubereitung mit einer zur Gärung befähigten Mikroorganismen-Kultur ver-
15 setzt und die CO₂-Entwicklung als Maß für die durch die Wirkstoffe induzierte Zellteilungsrate unter den hierfür üblichen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle mißt.
35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß man als Kultur Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) einsetzt und die Gasentwicklung in einem groß-
20 volumigen, 60 bis 80 ml fassenden Gährungssaccharometer mißt.

25

30