



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 267 420 A1

4(51) A 01 N 63/00
A 01 N 47/14
A 01 N 55/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP A 01 N / 309 789 3

(22) 02.12.87

(44) 03.05.89

(71) VE Forschungszentrum Biotechnologie Berlin (PKG), Alt-Stralau 62, Berlin, 1017, DD

(72) Huber, Johann, Dr. Dipl.-Biol.; Junge, Helmut, Dr. Dipl.-Gartenbauing.; Krebs, Birgit, Dr. Dipl.-Gartenbau-
ing.; Jacob, Marthe, Dr. Dipl.-Gartenbauing.; Malcharowitz, Cornelia, DD

(54) Verfahren zur Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze mit Fungiziden und mikrobiellen Antagonisten

(55) Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze, Fungiziden, sehr geringe Konzentration, mikrobielle Antagonisten, Kombination, übliche Behandlungsweise, Behandlungszyklen, *Bacillus subtilis* T99, *Streptomyces spec. G 43*, *Streptomyces graminofaciens*, *Streptomyces flavescens*, *Streptomyces murinus*, verdünnte Kulturlösungen, verdünnte Sporensuspensionen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze mit Fungiziden und mikrobiellen Antagonisten im gärtnerischen Pflanzenschutz. Erfindungsgemäß werden sehr geringe, bei alleinigem Einsatz unwirksame Fungizidmengen zusammen mit mikrobiellen Antagonisten in bekannter Weise und in den praxisüblichen Behandlungszyklen eingesetzt. Die erfindungsgemäß in der Kombination verwendeten Fungizidmengen betragen nur 10 bis 25% der Fungizidmengen, die bei alleinigem, praxisüblichem Einsatz eingesetzt werden. Die vorgeschlagene Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze ist sehr wirksam und umweltfreundlich.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze mit Fungiziden und mikrobiellen Antagonisten, **dadurch gekennzeichnet**, daß geringe, bei alleinigem Einsatz unwirksame Fungizidmengen zusammen mit mikrobiellen Antagonisten in bekannter Weise und in den praxisüblichen Behandlungszyklen eingesetzt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß 10 bis 25 % der Fungizidmengen, bezogen auf den alleinigen praxisüblichen Einsatz, eingesetzt werden.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Fungizide
 - bercema-Zineb 90 = Zink-ethylenbis (dithiocarbamat)
 - Chinoin-Fundazol WP 50 = Methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolcarbammat oder
 - bercema Mancozeb 80 = Mangan-Zink-ethylendiaminbis-dithiocarbamatverwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß mikrobielle Antagonisten von *Bacillus subtilis* T99 (ZIMET 11095), *Streptomyces* spec. G 43 (ZIMET 43801), hergestellt nach DD-WP 250456, oder *Streptomyces graminofaciens* (ZIMET 43852), *Streptomyces flavescens* (ZIMET 43851) bzw. *Streptomyces murinus* (ZIMET 43853), ..., in den Applikationsformen: verdünnte Kulturlösungen mit 10^3 bis 10^7 cfu/ml, verdünnte Kulturlösungskonzentrate mit etwa 10^5 bis 10^7 cfu/ml verdünnte Sporensuspensionen der genannten Streptomyceten mit 10^5 und 10^6 cfu/ml, eingesetzt werden.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze mit Fungiziden und mikrobiellen Antagonisten im gärtnerischen Pflanzenschutz.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Bekämpfung phytopathogener pilzlicher Erreger im Unterglasanbau erfolgt neben den kulturtechnischen und hygienischen Maßnahmen bevorzugt mit chemosynthetisch hergestellten Fungiziden (Fungistatika). Sie wirken bei praxisüblichen Applikationsdosen phytotoxisch und/oder umweltbelastend, da sie im Substrat, in oder auf den Pflanzen meist nur langsam oder nicht rückstandslos abgebaut werden. Die praxisüblichen Anwendungskonzentrationen liegen üblicherweise bei 0,1–0,5%.

In zunehmendem Maße werden gegenwärtig auch biologische Bekämpfungsmaßnahmen mittels antagonistisch-wirkender Mikroorganismen durchgeführt, s. z. B. DE-OS 3311071; DD-WP 250456; US-PS 3617448 und US-PS 4595589.

Darüber hinaus sind im Interesse einer Ertragssteigerung bei land- und forstwirtschaftlichen Nutzpflanzen kombinierte Anwendungstechnologien zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten bekannt, indem z. B. Antibiotika und Fungizide benutzt werden, s. GB-PS 1484407, DE-PS 1005311, FR-PS 2508766, DD-AP 0153995.

Ferner gelangen auch Gemische von Mikroorganismen und Fungiziden zur Anwendung, s. GB-PS 1450424, die mit der DE-OS 2352403 identisch ist und DE-OS 2740052, wobei potenzierte Wirkungen in Gegenwart verringerter Fungizidmengen weder erwähnt noch nachgewiesen wurden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die wirkungsvollere Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze ohne zusätzliche bzw. bei stark reduzierter Belastung der Umwelt mit Schadstoffen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, durch die Kombination an sich bekannter Mittel gegen phytopathogene Bodenpilze eine wesentlich bessere Wirkung zu erzielen.

Erfindungsgemäß werden geringe Fungizidmengen zusammen mit mikrobiellen Antagonisten zur Bekämpfung phytopathogener Bodenpilze eingesetzt. Die verwendeten Fungizidmengen liegen etwa bei 10 bis 25% gegenüber den praxisüblichen Konzentrationen bei alleinigen Einsatz. Diese geringen Applikationsdosen zeigen in der praktischen Anwendung keine oder fast keine Wirkung gegenüber phytopathogenen Bodenpilzen.

Werden diese geringen (suboptimalen) Fungizidmengen jedoch mit mikrobiellen antagonistenhaltigen Applikationsformen gemeinsam angewandt, so stellen sich in überraschender Weise bessere Bekämpfungserfolge ein als bei alleiniger Anwendung antagonistisch wirkender Mikroorganismen.

Diese Mikroorganismen und ihre Applikationsformen haben keinen umweltbelastenden Einfluß. Es handelt sich bei ihnen um Bodenmikroorganismen, die vor der Isolierung dort ihr natürliches Areal hatten.

Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich bevorzugt mikrobielle Antagonisten von *Sacillus subtilis* T 99 (ZIMET 11095), *Streptomyces sepc. G 43* (ZIMET 43801), beide hergestellt nach DD-WP 250456 oder *Streptomyces graminofaciens* (ZIMET 43852), *Streptomyces flavescens* (ZIMET 43851) bzw. *Streptomyces murinus* (ZIMET 43853), in den Applikationsformen

- verdünnte Kulturlösungen mit 10^5 bis 10^7 cfu/ml,
- verdünnte Kulturlösungskonzentrate mit etwa 10^5 bis 10^7 cfu/ml oder
- verdünnte Sporensuspensionen der genannten Streptomyceten mit 10^5 bis 10^6 cfu/ml.

Als Fungizide werden bevorzugt verwendet:

- bercema-Zineb 90 = Zink-ethylenbis (dithiocarbamat),
- Chinoin-Fundazol WP 50 = Methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolcarbammat oder
- bercema-Mancozeb 80 = Mangan-Zink-ethylendiaminbis-dithiocarbamat.

Die verbesserte Wirkungsweise der Anwendung suboptimaler Fungizidmengen mit antagonistisch wirkenden Bakterien lassen sich sowohl in vitro als auch in vivo deutlich nachweisen.

Die in vitro Tests wurden in Petrischalen als Ringplattenmethode (G. Turhan, Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 88 [1981], 373) durchgeführt. Dazu wurde dem Agar (Biomalz) in drei Versuchen jeweils zugesetzt:

- 15% Kulturfiltrat von *Streptomyces graminofaciens* N 6 (ZIMET 43852),
- 0,02% bercema Zineb 90 = Zink-ethylenbis (dithiocarbamat) bzw.
- 0,02% bercema Zineb 90, kombiniert mit 15% Kulturfiltrat N 6 und
- zum Vergleich wurde eine Kontrollvariante ohne Zusätze angelegt.

Der Agar wurde in der Mitte der Petrischalen mit den Testpilzen *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* bzw. *Fusarium culmorum* beimpft. Der radiale Zuwachs der Pilzkolonien wurde täglich ausgemessen und diente als Bewertungsgröße für die Wirkung der Zusätze. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt:

Phytopathogene Pilze	Agar-Varianten	Durchmesser der Pilzkolonien nach 5 d (25°C) (in mm)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i>	Kontrolle	58,3
	N 6 (Kulturfiltrat)	30,5
	bercema Zineb 90	48,0
	N 6 + bercema Zineb 90	25,5
<i>Fusarium culmorum</i>	Kontrolle	90,0
	N 6 (Kulturfiltrat)	51,3
	bercema Zineb 90	90,0
	N 6 + bercema Zineb 90	47,2

In der gleichen Weise wurden Ringplattentests mit folgenden Zusätzen angelegt und die Kolonieausbreitung bei den Testpilzen *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* bzw. *Pyrenochaeta lycopersici* verfolgt:

1. Kontrolle — ohne Zustand
2. Zusatz von 25% Kulturfiltrat T 99 (*Bacillus subtilis* T 99) gemäß DD-WP 250456
3. Zusatz von 0,01% Chinoin Fundazol = Methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolcarbammat
4. Zusatz von 25% Kulturfiltrat mit *Bacillus subtilis* T 99 und 0,01% Chinoin-Fundazol
5. Zusatz von 0,01% bercema Mancozeb 80 = Mangan-Zink-ethylendiamin-bis-dithiocarbamat
6. Zusatz von 0,01% bercema Mancozeb 80 und 25% Kulturfiltrat mit *Bacillus subtilis* T 99.

Über die Ergebnisse berichtet nachfolgende Tabelle:

Agar-Varianten	Durchmesser der Pilzkolonien in mm Inkubation bis 25°C	
	<i>F. oxysp. f. sp. dianthi</i> nach 4 d	<i>Pyr. lycopersici</i> nach 9 d
1 Kontrolle	90,0	85,0
2 T 99 (Kulturfiltrat)	43,0	45,2
3 Chinoin-Fundazol	64,8	60,0
4 Kulturfiltrat mit T 99 + Chinoin Fundazol	22,5	25,3
5 berc. Mancozeb 80	86,5	84,2
6 berc. Mancozeb 80 + Kulturfiltrat m. T 99	25,3	23,4

Zur in-vivo-Versuchsdurchführung bei Gewächshauskulturen werden wäßrige Lösungen verwendet, die verdünnte Kulturlösungen mit *Bacillus subtilis* T99 (etwa 2×10^7 Keime/ml) oder Kulturlösungen mit *Streptomyces graminofaciens* N6 (etwa 10^6 cfu/ml) und Fungizidzusätze enthalten. Diese wäßrigen antagonistischen und fungizidhaltigen Gemische werden auf die zum Pflanzen vorbereitete Substratfläche durch Gießen mit mindestens 2 l je m² aufgebracht. Während der Vegetationsperiode werden Nachbehandlungen durchgeführt, s. Beispiele:

Die eingesetzten Fungizidmengen liegen gegenüber den Mengen bei alleinigem Einsatz bei nur 10–25%. Die antagonistisch wirkenden Bakterien werden bei diesen Fungizidkonzentrationen weder in vitro noch in vivo in ihrem Wachstum und ihrer Produktbildung gehemmt. Die Nachweise hierfür lassen sich in Submerskulturen und Agaroberflächen leicht führen.

Anwendungsbeispiele

Beispiel 1

Behandlung mit Fungiziden (Kontrolle)

Die Bekämpfung der gefäßparasitären Welkeerkrankung bei der Edelnelke, verursacht durch Fusarien (*Fusarium oxysporum*-Typen) wurde unter praxisüblichen Bedingungen mit kommerziellen Fungiziden durchgeführt. Es standen 500 m² große Versuchsflächen, die jeweils mit 16000 bewurzelten Nelkenstecklingen bepflanzt wurden, zur Verfügung.

Die Fungizidbehandlung war folgende:

- vor der Pflanzung (Pfl.) 0,4 % bercema-Mancozeb 80
- 2 Wochen nach der Pfl. 0,2 % bercema-Zineb 90
- 6 Wochen nach der Pfl. 0,1 % Chinoin-Fundazol 50 WP
- 5 Monate nach der Pfl. 0,2 % bercema-Mancozeb 80
- 8 Monate nach der Pfl. 0,2 % bercema-Zineb 90

Am Ende der Kultur nach 15 Monaten waren 30 % der Nelkenpflanzen infolge Erkrankung ausgefallen.

Beispiel 2

Behandlung mit bercema-Zineb 90

Zur Bekämpfung der gefäßparasitären Fusariumwelke bei der Edelnelke wurde als alleiniges Fungizid bercema-Zineb 90 eingesetzt.

Der Fungizideinsatz vor der Pflanzung betrug 0,4 % und die Nachbehandlungen erfolgten in den im Beispiel 1 angegebenen Zeitabständen mit jeweils 0,2 % bercema-Zineb 90.

Am Ende der Kultur nach 15 Monaten waren 45 % der Nelkenpflanzen infolge Fusarienbefalls ausgefallen.

Beispiel 3

Behandlung mit antagonistischen Kulturlösungen

Zur Bekämpfung der gefäßparasitären Fusariumwelke bei der Edelnelke wurden auf etwa 10^7 Keime/ml verdünnte Kulturlösungen mit *Bacillus subtilis* T99 verwendet. Je 2 l dieser Applikationslösung wurden vor dem Pflanzen auf je 1 m² Bodenfläche ausgegossen. Es folgten Nachbehandlungen nach 2 und 3 Wochen, weitere im Abstand von je 3 Monaten nach der Bepflanzung.

Am Ende der Kultur nach 15 Monaten waren etwa 28 % der Edelnelken durch Erkrankung ausgefallen.

Beispiel 4

Anwendung suboptimaler Fungizidmengen mit antagonistischen Kulturlösungen.

Zur Bekämpfung der gefäßparasitären Fusariumwelke bei der Edelnelke wurden verdünnte Kulturlösungen mit *Bacillus subtilis* T99 (etwa 10^7 Keime/ml) gemeinsam mit 0,05 % bercema-Zineb 90 auf die Bodenfläche ausgegossen (2 l/m²) und danach mit bewurzelten Nelkenstecklingen bepflanzt.

Die erste Nachbehandlung des Bestandes erfolgte mit o. g. Gemisch nach zwei Wochen; es folgten 3 weitere Nachbehandlungen im Abstand von jeweils 3 Monaten.

Am Ende der Kultur nach 15 Monaten waren 20 % der Edelnelken durch Erkrankung ausgefallen.

Beispiel 5

Die Bekämpfung der Fusariumwelke bei der Edelnelke wurde gemäß Beispiel 4 vorgenommen. Anstelle von bercema-Zineb 90 wurden jedoch 0,05 % Chinoin-Fundazol WP 50 verwendet.

Am Ende der Kultur nach 15 Monaten waren 18 % der Edelnelken durch Erkrankung ausgefallen.