bmvit
Bundesministerium
für Verkehr,
Innovation und Technologie

NACHHALTIG wirtschaften
konkret

Einsatz von Rainfarnextrakt und dessen Inhaltsstoffe als Insektizid gegen den Apfelwickler

S. Wagner

Berichte aus Energie- und Umweltforschung

46/2011

Dynamik mit Verantwortung

Impressum:

Eigentümer, Herausgeber und Medieninhaber:
Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie
Radetzkystraße 2, 1030 Wien

Verantwortung und Koordination:
Abteilung für Energie- und Umwelttechnologien
Leiter: DI Michael Paula

Liste sowie Downloadmöglichkeit aller Berichte dieser Reihe unter
http://www.nachhaltigwirtschaften.at

Einsatz von Rainfarnextrakt und dessen Inhaltsstoffe als Insektizid gegen den Apfelwickler

Mag. Susanne Wagner
JOANNEUM RESEARCH Forschungsgesellschaft mbH,
Institut für Wasser, Energie und Nachhaltigkeit

ao. Univ.-Prof. Dr. Franz Hadacek
Universität Wien – Department für ökologische Chemie und Ökosystemforschung

Graz, April 2011

Ein Projektbericht im Rahmen der Programmlinie

FABRIK der Zukunft

Impulsprogramm Nachhaltig Wirtschaften

Im Auftrag des Bundesministeriums für Verkehr, Innovation und Technologie

Vorwort

Der vorliegende Bericht dokumentiert die Ergebnisse eines Projekts aus der Programmlinie FABRIK DER ZUKUNFT. Sie wurde im Jahr 2000 vom Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie im Rahmen des Impulsprogramms Nachhaltig Wirtschaften als mehrjährige Forschungs- und Technologieinitiative gestartet. Mit der Programmlinie FABRIK DER ZUKUNFT sollen durch Forschung und Technologieentwicklung innovative Technologiesprünge mit hohem Marktpotential initiiert und realisiert werden.

Dank des überdurchschnittlichen Engagements und der großen Kooperationsbereitschaft der beteiligten Forschungseinrichtungen und Betriebe konnten bereits richtungsweisende und auch international anerkannte Ergebnisse erzielt werden. Die Qualität der erarbeiteten Ergebnisse liegt über den hohen Erwartungen und ist eine gute Grundlage für erfolgreiche Umsetzungsstrategien. Anfragen bezüglich internationaler Kooperationen bestätigen die in FABRIK DER ZUKUNFT verfolgte Strategie.

Ein wichtiges Anliegen des Programms ist es, die Projektergebnisse – seien es Grundlagenarbeiten, Konzepte oder Technologieentwicklungen – erfolgreich umzusetzen und zu verbreiten. Dies soll nach Möglichkeit durch konkrete Demonstrationsprojekte unterstützt werden. Deshalb ist es auch ein spezielles Anliegen die aktuellen Ergebnisse der interessierten Fachöffentlichkeit zugänglich zu machen, was durch die Homepage **www.FABRIKderZukunft.at** und die Schriftenreihe gewährleistet wird.

Dipl. Ing. Michael Paula
Leiter der Abt. Energie- und Umwelttechnologien
Bundesministerium für Verkehr, Innovation und Technologie

Inhaltsverzeichnis

1 AKTUALISIERTE KURZFASSUNG UND ABSTRACT 5

2 EINLEITUNG 8

2.1 AUSGANGSSITUATION UND MOTIVATION DES PROJEKTES 8
2.2 VORARBEITEN ZUM THEMA 9
2.3 ZIELSETZUNGEN DES PROJEKTES 10
2.4 GLIEDERUNG DES BERICHTES 11

3 HINTERGRUNDINFORMATION ZUM PROJEKTINHALT 11

3.1 DURCHGEFÜHRTE ARBEITEN IM RAHMEN DES PROJEKTES INKL. METHODIK 11
3.1.1 Anbau Rainfarn 2008 und 2009 11
3.1.2 Ermittlung des optimalen Erntezeitpunktes 2008 und 2009 (Monitoring) 12
3.1.3 Optimierung der Extraktionsbedingungen im Labormaßstab für die nachfolgende Extraktion im Technikumsmaßstab 12
3.1.4 Durchführung der Extraktion und Weiterverarbeitung im Technikumsmaßstab 13
3.1.5 Begleitanalysen der Extrakte und weiterverarbeiteter Fraktionen mittels HPLC/UV-DAD 15
3.1.6 Präparative Isolierung der aktiven Hauptinhaltsstoffe im Milligrammbereich und Strukturaufklärung 17
3.1.7 Spritzmittelformulierung 19
3.1.8 Präparative Isolierung der aktiven Hauptfraktionen im Grammbereich 19
3.1.9 Freilandversuche in einer Apfelkultur und diagnostische Laborversuche mit dem Gesamtextrakt 21
3.2 INNOVATIONSGEHALT DES PROJEKTES 25

4 ERGEBNISSE UND MEILENSTEINE DES PROJEKTES 26

4.1 ANBAU RAINFARN 2008 UND 2009 26
4.2 ERMITTLUNG DES OPTIMALEN ERNTEZEITPUNKTES 2008 UND 2009 (MONITORING) 35
4.3 OPTIMIERUNG DER EXTRAKTIONSBEDINGUNGEN IM LABORMAßSTAB FÜR DIE NACHFOLGENDE EXTRAKTION IM TECHNIKUMSMAßSTAB 38
4.4 DURCHFÜHRUNG DER EXTRAKTION UND WEITERVERARBEITUNG IM TECHNIKUMSMAßSTAB 38
4.5 BEGLEITANALYSEN DER EXTRAKTE UND WEITERVERARBEITETER FRAKTIONEN MITTELS HPLC/UV-DAD 40
4.6 PRÄPARATIVE ISOLIERUNG DER AKTIVEN HAUPTINHALTSSTOFFE IM MILLIGRAMMBEREICH UND STRUKTURAUFKLÄRUNG 43
4.7 SPRITZMITTELFORMULIERUNG 48
4.8 PRÄPARATIVE ISOLIERUNG DER AKTIVEN HAUPTFRAKTIONEN IM GRAMMBEREICH 51
4.9 FREILANDVERSUCHE IN EINER APFELKULTUR UND DIAGNOSTISCHE LABORVERSUCHE MIT DEM GESAMTEXTRAKT 51

5 DETAILANGABEN IN BEZUG AUF DIE ZIELE DER PROGRAMMLINIE 56

5.1 EINPASSUNG IN DIE PROGRAMMLINIE UND BEITRÄGE ZU DEN GESAMTZIELEN 56
5.2 EINBEZIEHUNG DER ZIELGRUPPEN 58
5.3 BESCHREIBUNG DER UMSETZUNGSPOTENTIALE 58

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN ZU DEN PROJEKTERGEBNISSEN 59

7 AUSBLICK UND EMPFEHLUNGEN 60

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 61

9 LITERATURVERZEICHNIS 63

1 Aktualisierte Kurzfassung und Abstract

Die für die konventionelle Obstproduktion in Österreich zugelassenen Insektizide und Repellentien gegen den Apfelwickler sind ausschließlich synthetischen bzw. biotechnologischen Ursprungs. Im Gegensatz dazu gibt es für biologisch wirtschaftende Betriebe nur wenige zugelassene Bekämpfungsmöglichkeiten von Schädlingen. Im Fall des Apfelwicklers werden meist Pheromone und das Granulosevirus als Insektizid eingesetzt. Deshalb ist sowohl für die biologische als auch für die konventionelle Landwirtschaft der nachhaltige Einsatz von repellent oder insektizid wirksamen Pflanzenextrakten gegen den Apfelwickler von zunehmendem Interesse.

Hauptziel dieses Projektes war die Gewinnung von Repellentien aus der heimischen Pflanze Rainfarn (*Tanacetum vulgare* L.) gegen den ökonomisch bedeutsamen Schädling Apfelwickler (*Cydia pomonella*) als Gesamtextrakt im größeren Maßstab für Freiland- und Laborversuche, um daraus alternative Strategien für den Pflanzenschutz auf Basis von Naturstoffen am Beispiel eines Extraktes bzw. Wirkstoffes gegen den Apfelwickler entwickeln zu können. Der Gesamtextrakt wurde sowohl in Freilandversuchen in einer Apfelkultur als auch in diagnostischen Laborversuchen getestet. Der Anbau von Rainfarn wurde über zwei Vegetationsperioden (2009 und 2010) durchgeführt. Die Bestimmung des Extraktgehaltes in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand des Pflanzenbestandes wurde nur für die Vegetationsperiode 2009 bestimmt, da Daten aus eigenfinanzierten Vorarbeiten des Auftragnehmers[i] (Diplomarbeit Anne Hambammer) aus dem Jahr 2008 eingearbeitet wurden. Für die Untersuchung des Verlaufes des Extraktgehaltes wurden 2008 zu 6 Zeitpunkten (n=20) und 2009 zu 4 Zeitpunkten (n=10) Stichproben entnommen, mittels einer Laborextraktionsanlage (ASE = Accelerated Solvent Extraction) extrahiert und die Extraktgehalte bestimmt. Zu den Probezeitpunkten erfolgte auch die Bestimmung des phänologischen Entwicklungszustandes der Pflanzen nach der BBCH – Skalierung[ii] (Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen – BBCH Monografie). Neben der Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes wurde auch eine Optimierung der wesentlichen Parameter der Lösungsmittelextraktion (unterschiedliche Temperaturen und Lösungsmittel - auch CO_2-Extraktion) durchgeführt, um die Menge an repellent aktiven Inhaltsstoffen im Gesamtextrakt zu erhöhen. Aus diesen Untersuchungen konnte n-Hexan als geeignetes Lösungsmittel für die Gewinnung der aktiven Inhaltsstoffe aus Rainfarn abgeleitet werden. Ein Teil der Gesamternte des ersten Projektjahres wurde zur Extraktion im Technikumsmaßstab herangezogen, um den Rohextrakt in größeren Mengen für die weiteren Anwendungen und Versuche zu gewinnen. Ein Teil des getrockneten Rohextraktes wurde zur Fraktionierung, semipräparativen Isolierung und Strukturaufklärung der aktiven Hauptsubstanzen im Labormaßstab (Milligrammbereich) verwendet. Mit einem anderen Teil

des Rohextraktes wurde die Fraktionierung im Grammbereich durchgeführt. Der restliche Gesamtextrakt wurde in der Spritzmittelformulierung, in den Freilandversuchen in einer Apfelkultur sowie in den diagnostischen Einbohrungsversuchen im Feldversuch und Glashaus eingesetzt. Die Spritzmittelformulierung erfolgte in Anlehnung an konventionelle Pflanzenschutzmittel und wurde unter Verwendung von Emulgatoren, die in der biologischen Landwirtschaft eingesetzt werden dürfen, durchgeführt. Alle Prozessschritte wurden mittels geeigneter Analytik (HPLC/UV-DAD bzw. GC/MS) begleitet.

Aus 1 kg Pflanzenmaterial (Trockensubstanz = TS) konnte eine Rohextraktmenge (TS) von ca. 10,8 g gewonnen werden (ca. 1% Ausbeute). Der Gesamtextrakt wurde in den Freiland- und diagnostischen Laborversuchen in unterschiedlichen Konzentrationen (0,4, 0,1 und 0,04%) angewandt. In den Freilandversuchen konnte eine Wirkung des Extraktes gegen den Apfelwickler nachgewiesen werden, wobei die höhere Konzentration (0,4%) zu besseren Resultaten führte als die niedrigere Dosierung (0,1 %). Die Auswertung des Befallsgrades der mit Extrakt behandelten Äpfel im Sommer 2010 nach der 1. Apfelwicklergeneration ergab Befallsraten, die auch beim Einsatz konventionellen Spritzmittel beobachtet werden. Die Auswertung des Schädlingsbefalls bis zum Ende der Saison, zeigt allerdings für den Herbst einen stark zunehmenden Apfelwicklerbefall auf. Die Ursachen für die Abnahme der Aktivität sind noch unklar. Möglicherweise sind kürzere Anwendungsintervalle oder höhere Extraktkonzentrationen anzusetzen. In den diagnostischen Versuchen hat der Extrakt mit der höchsten Konzentration (0,4%) im Gegensatz zu den niedrigeren Konzentrationen eine deutlich abschreckende Wirkung gezeigt. Als aktive Substanzen wurden Monomethylolivetol und dessen Derivat 3-Methoxy-5-undecylphenol aus der Naturstoffgruppe der Resorcinole identifiziert. Zur Absicherung der Ergebnisse müssten noch weitere Versuchsreihen mit höheren Konzentrationen des Extraktes im Spritzmittel, eventuell auch in Verbindung mit anderen (pflanzlichen) Wirkstoffen, durchgeführt werden.

Abstract

PHYTOZID – Tansy raw extract and its compounds as insecticides against the codling moth

In Austrian conventional fruit production permitted insecticides and repellents against the codling moth are in most cases of synthetic and biotechnological origin. In contrast for organic fruit farming only few possibilities for pest control such as pheromones and granulosevirus are available. In this respect, the sustainable usage of repellents or insecticides gained from plants or plant extracts against the codling moth is of increasing interest for both cultivation methods.

Main goals of this project were the large scale recovery of repellent compounds from the native plant tansy (*Tanacetum vulgare* L.) against the economically important pest codling moth (*Cydia pomonella*). Tansy raw extracts were used for field trials and lab testing to establish strategies for pest control based on natural substances. The raw extract was tested in one apple plantation in field trials as well as in diagnostic lab scale tests. Cultivation of tansy was carried out in two habitats over a period of two years (2009 and 2010), the determination of the extract yield, depending on the developmental state of the plant, only for the vegetation period of 2009 since data from self-financed preparatory work of the contractor[i] (Thesis Anne Hambammer) from 2008 were incorporated. To investigate the development of the extract yield in 2008 at 6 dates (n = 20) and 2009 at 4 dates (n = 10) samples were taken, extracted by the lab extraction system (ASE = Accelerated Solvent Extraction) and the extract yields were determined. At sampling dates the development stages of plants adapted on the extended BBCH method[ii] (Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen – BBCH Monografie) were described. In addition to the evaluation of the optimal harvest time regarding extract yield and quality also an optimization of important parameters in solvent extraction (different temperatures and solvents – e.g. CO_2 extraction) was performed to enhance the amount of repellent active compounds in the raw extract. From these investigations n - hexane could be identified as appropriate solvent for the extraction of active repellents from tansy. A part of the herbal material harvested in the first year was used for extraction and further processing in pilot plant scale to provide larger quantities of the raw extract. Parts of the dried raw extract were used for fractionation, semi preparative isolation and structure elucidation of major active substances in laboratory scale (milligram range). With another part of the raw extract fractionation in gram range was performed. The rest of the raw extract was used for repellent formulation, field trials in one apple plantation and the diagnostic bore tests in lab scale and greenhouse trials. The repellent formulation was abutted on conventional pesticides and was conducted by using emulsifiers that may be suitable for organic farming. All investigations were accompanied by HPLC/UV-DAD or GC/MS analysis respectively.

From 1 kg (dry matter = DM) of plant material 10.8 g raw extract were obtained (about 1% extract yield). The raw extract was applied in different concentrations respectively (0.4, 0.1 and 0.04%) in the field and laboratory diagnostic trials. In the field trials an effect against the codling moth could be shown, whereas the higher dose (0.4%) led to better results than the lower one (0.1%). When evaluating the level of infestation of the apples in the first codling moths generation 2010 results in the range of conventional pesticides were reached. The overall impact decreased by the end of the season in the way, that infestation of codling moth was too high and effect of the applied dosages too low. Reasons for that effect have to

be investigated, maybe shorter application intervals or higher concentrations should be applied. In the diagnostic tests, the extract with the highest concentration (0.4%) showed a significantly higher deterrent effect compared to the lower concentrations. As active substances monomethylolivetol and its derivative 3-methoxy-5-undecylphenol from the natural product group of resorcinols were identified. To confirm and ensure the results further experiments with higher concentrations of the extract have to be performed possibly in conjunction with other active compounds from plants.

2 Einleitung

2.1 Ausgangssituation und Motivation des Projektes

In der konventionellen Landwirtschaft kann eine Vielzahl von Insektiziden und Repellentien gegen unterschiedlichste Schädlinge eingesetzt werden. Im Gegensatz dazu gibt es für biologisch wirtschaftende Betriebe nur wenige zugelassene Bekämpfungsmöglichkeiten. Im Fall des Apfelwicklers ist dies der Einsatz von Pheromonen und des Granuloseviruses. Deshalb ist sowohl für die biologische als auch für die konventionelle Landwirtschaft der nachhaltige Einsatz von repellent wirksamen Pflanzenextrakten gegen den Apfelwickler von steigendem Interesse. Pflanzenextrakte stellen vor allem aufgrund ihrer bioaktiven, organischen Inhaltsstoffe eine reiche Quelle für Repellentien - Produkte dar. Repellents wehren im Unterschied zu Insektiziden Schädlinge ab und töten die Schadorganismen nicht. Durch den Eingriff in deren Entwicklung wird der Schädlingsdruck vermindert.

Die Raupen unterschiedlicher Wicklerarten, u.a. der Apfelwickler, minieren die Früchte vieler Obstsorten und tragen zu starken Ertragseinbußen bei. Der Apfelwickler (*Cydia pomonella*) ist ein Schmetterling (Nachtfalter) aus der Familie der Wickler (Tortricidae). Ursprünglich nur in Europa verbreitet, findet man ihn inzwischen weltweit. Neben Äpfeln (*Malus spec.*) werden vor allem unter klimatisch günstigeren Bedingungen auch Birnen (*Pyrus spec.*), Quitte (*Cydonia oblonga*), Aprikose, Pfirsich, Pflaume, Kirsche, Weißdorn, Esskastanie und Walnuss befallen. Pro Jahr treten ein bis zwei Generationen dieses Insekts auf. Die Raupen überwintern unter der Borke der Apfelbäume. Im Mai schlüpfen die ersten Falter, die dann ihre Eier auf den jungen Früchten ablegen. Nach 1-2 Wochen schlüpfen die weißen Raupen mit braunem Kopf und bohren sich nach 1-2 Tagen in die Früchte. Befallene Äpfel weisen Löcher und Fraßgänge mit Kotspuren auf. Nach 4-wöchigem Fraß verlässt die ca. 2 cm lange Raupe die Frucht mit Hilfe eines Fadens, den sie abspinnt, oder sie verlässt die Frucht, wenn diese vorzeitig vom Baum abgestoßen wird und zu Boden fällt. Bei günstiger Witterung kann noch eine weitere Generation des Apfelwicklers entstehen.

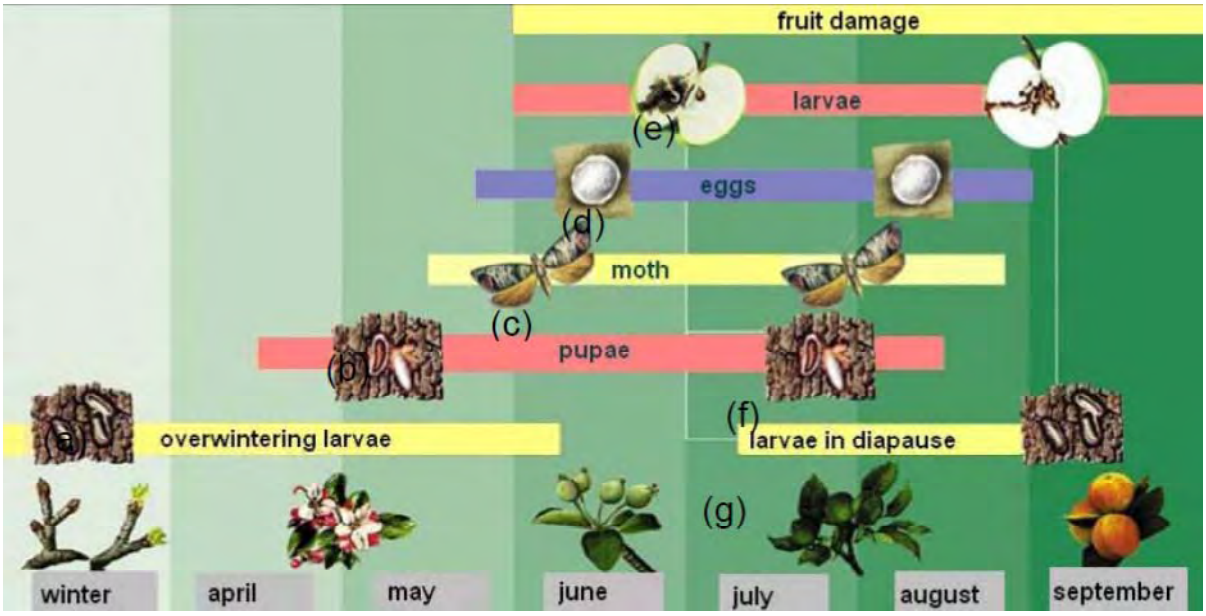

Abbildung 1: Lebenszyklus des Apfelwicklers, *Cydia pomonella*[iii]

Bekämpft wird der Apfelwickler mit Insektiziden, die oft präventiv eingesetzt werden, oder mit Pheromonfallen. Zur biologischen Bekämpfung der Larven des Apfelwicklers eignet sich das Granulosevirus, wogegen aber schon Resistenzen aufgetreten sind.

Ein kürzlich publizierter Review über Naturstoffe[iv] listet eine Reihe von Inhaltsstoffen, Extrakten bzw. von Pflanzen auf, die bereits als kommerzielle Insektizide bzw. Repellents angewandt werden. Darunter befinden sich u.a. Eugenol, Azadirachtin, Karanjin, Nikotin, Phenethylpropionat, die Pyrethrine, Rotenon, sowie Extrakte von Sabadill (*Schoenocaulon officinale,* Melanthiaceae, Veratrum-Alkaloide). Dies verdeutlicht, dass aktuell Pflanzeninhaltsstoffen und –extrakten ein erhebliches Anwendungspotential beigemessen wird.

Trotzdem besitzen Repellents aus Pflanzen bei agrochemischen Konzernen einen geringen Stellenwert, da sie oft nur Nischenprodukte sind. Nichtsdestotrotz könnten aber gerade diese Produkte für den biologischen Landbau eine besondere Bedeutung erlangen.

2.2 Vorarbeiten zum Thema

Im Rahmen von Voruntersuchungen des Konsortiums wurden mehrere Pflanzenextrakte auf ihre insektiziden oder repellenten Eigenschaften gegen den Apfelwickler getestet.

Abbildung 2 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse, die bei der Austestung einer Reihe von Rohextrakten erhalten wurde. Die Blätter des Rainfarns (*Tanacetum vulgare*) und die Infloreszenzen des Wiesensalbeis (*Salvia pratensis*) zeigen signifikant abschreckende Wirkung.

Obwohl schon Vorarbeiten geleistet wurden, sollte die Wissensbasis auf diesem Gebiet in diesem Projekt noch weiter verbreitert werden.

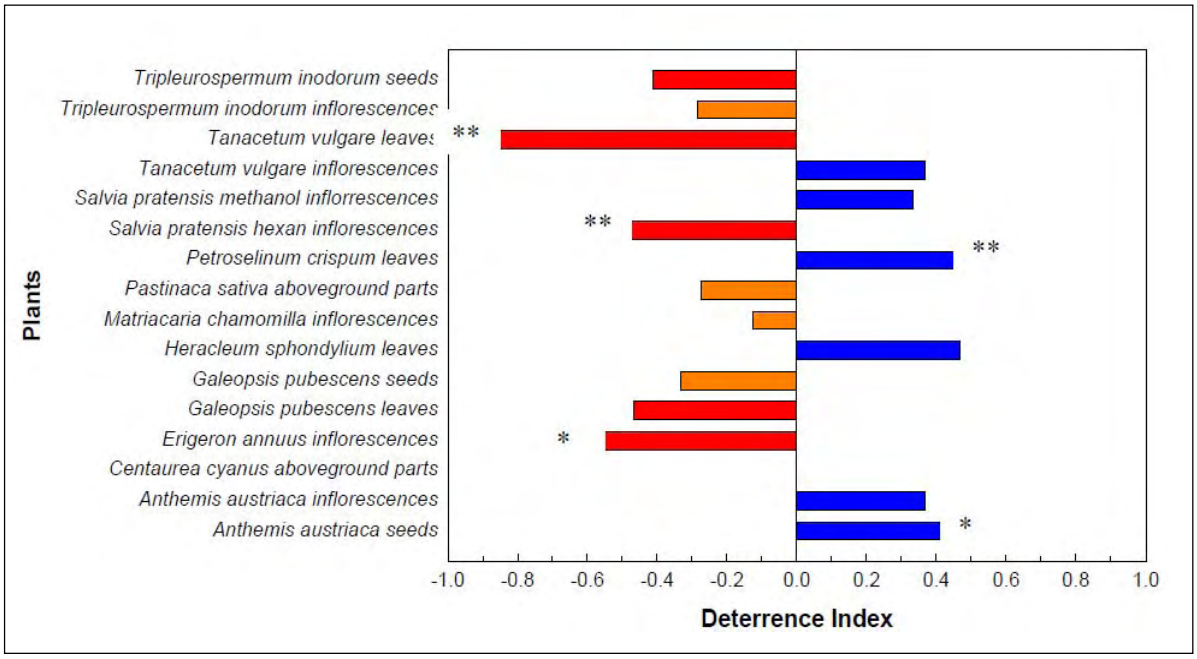

Abbildung 2: Entwicklungshemmende Wirkung der Gesamtextrakte (Pflanzen mit entwicklungsstimulierender Wirkung auf Apfelwicklerlarven sind durch die blauen Balken dargestellt. Rote und orange Balken stehen für Pflanzen mit entwicklungshemmender Wirkung: ** $p < 0,05$; * $0,05 < p < 0,1$; nichtparametrischer Binominaltest)

2.3 Zielsetzungen des Projektes

Hauptziel dieses Projektes war die Gewinnung von Repellentien aus der heimischen Pflanze Rainfarn (*Tanacetum vulgare* L.) gegen den ökonomisch bedeutsamen Schädling Apfelwickler (*Cydia pomonella*) als Gesamtextrakt im größeren Maßstab für Freiland- und diagnostische Einbohrungsversuche im Feldversuch und Glashaus, um daraus alternative Strategien für den Pflanzenschutz auf Basis von Naturstoffen am Beispiel eines Extraktes bzw. Wirkstoffes gegen den Apfelwickler etablieren zu können. Das Verhalten des Apfelwicklers sollte dahingehend beeinflusst werden, dass Schäden an Kulturpflanzen (Äpfel) bis zu einem wirtschaftlich tragbaren Prozentsatz reduziert bzw. verhindert werden können. Der Gesamtextrakt wurde sowohl in Freilandversuchen in einer Apfelkultur als auch

in diagnostischen Einbohrungsversuchen im Feldversuch und Glashaus getestet. Zusätzlich wurden die Fraktionierung der aktiven Hauptfraktion und die Isolierung von Einzelsubstanzen aus dem Rainfarnextrakt zunächst im Milligrammbereich und für die Hauptfraktionen anschließend im Grammbereich durchgeführt um festzustellen, ob es sich um eine synergistische Repellentwirkung mehrerer Inhaltsstoffe des Gesamtextraktes handelt oder ob für die Wirkung einzelne Inhaltsstoffe verantwortlich gemacht werden können. Für ein mögliches nachfolgendes Zulassungsverfahren wurden diese Einzelsubstanzen identifiziert.

2.4 Gliederung des Berichtes

Dieser Endbericht stellt die im Rahmen des Projektes gewonnenen Ergebnisse dar. Nach einer Einleitung mit Ausgangssituation und Motivation des Projektes folgen eine Kurzdarstellung der Vorarbeiten zur Thematik und die wichtigsten Zielsetzungen im Projekt. Im Anschluss sind die durchgeführten Arbeiten (Kapitel 3) und die davon abgeleiteten Ergebnisse (Kapitel 4), gegliedert nach Arbeitspaketen und zeitlicher Abfolge, dargestellt. Kapitel 5 setzt sich mit den Detailzielen des Projektes und dem übergeordneten Gesamtziel und den Leitprinzipien der Programmlinie „Fabrik der Zukunft“ auseinander. Am Schluss folgen die Schlussfolgerungen zu den Projektergebnissen (Kapitel 6) und ein Ausblick auf weiterführende Arbeiten zur Optimierung der gewonnenen Ergebnisse (Kapitel 7).

3 Hintergrundinformation zum Projektinhalt

3.1 Durchgeführte Arbeiten im Rahmen des Projektes inkl. Methodik

3.1.1 Anbau Rainfarn 2008 und 2009

Rainfarn gedeiht auf allen ackerbaulich nutzbaren Standorten und stellt keine besonderen Ansprüche an den Boden und an die Vorfrucht. Er verlangt ein feinkrümeliges feuchtigkeits-bewahrendes Saatbett (TLL 2003).

Der Anbau von Rainfarn erfolgte 2008 an einem und 2009 an zwei Standorten in der Steiermark:

- Biohof Oswald, Oberlungitz (Nordoststeiermark)
- Biogemüsehof Wressnig, Unterpurkla (Südoststeiermark)

Der Biohof Oswald befindet sich auf 400 m Seehöhe. Bei den Anbauflächen handelt es sich um mittelwertiges Acker- und Grünland. Der mittelschwere bis schwere Boden ist aus feinem Tertiärmaterial mit sandigem Lehm aufgebaut (Pseudogley) und bei einem mittleren

Jahresniederschlag von 802 mm wechselfeucht. Die Versorgung mit Phosphor und Kalium ist niedrig, mit Magnesium sehr hoch und mit Bor ausreichend. Der pH-Wert liegt mit 6,7 im neutralen Bereich, der Humusgehalt beträgt 2,7 g/100 g Feinboden und ist als mittel einzustufen.

Der Biogemüsehof Wressnig befindet sich auf 265 m Seehöhe. Bei der Anbaufläche handelt es sich um mittelwertiges Acker- und Grünland. Der Boden ist wechselfeucht mit hoher Speicherkraft und gehemmter Durchlässigkeit. Es handelt sich um einen mittelhumosen, lehmigen Schluff aus einer pseudovergleyten Lockersediment-Braunerde.

Das Saatgut der Sorte „Goldsticks“ wurde von der Firma Jelitto Staudensamen GmbH in Schwarmstedt (Deutschland) bezogen. Laut Dragland und Coautoren[v] zählt *Tanacetum vulgare* „Goldsticks“, zu den gemischten Chemotypen („Thujon-Camphor-Crysanthenyl-Typ“).

Da eine Aussaat aufgrund des sehr geringen Tausendkorngewichtes (TKG) von nur 0,1 g sehr ungewiss ist, wurde der Anbau in erster Linie über Jungpflanzen durchgeführt. Diese wurden im landwirtschaftlichen Versuchszentrum für Spezialkulturen in Wies (Steiermark) gezogen und in 4 x 4 cm großen Floragard Biopresswürfeln ausgeliefert. 2010 wurde zusätzlich eine Aussaat auf einer Fläche des Biogemüsehofes Wressnig erprobt.

3.1.2 Ermittlung des optimalen Erntezeitpunktes 2008 und 2009 (Monitoring)

Für die Gewinnung von Pflanzeninhaltsstoffen ist der optimale Erntezeitpunkt ausschlaggebend um sowohl quantitativ (Extraktgehalt) als auch qualitativ (Zusammensetzung des Extraktes) das beste Ergebnis zu erzielen.

Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten vom Beginn des Knospenschiebens bis zur Vollblüte Proben entnommen, getrocknet und extrahiert. Neben der Datierung der Probennahmen wurden auch das phänologische Entwicklungsstadium der Pflanzen nach der BBCH-Skalierung[ii] und die Extraktgehalte bestimmt.

3.1.3 Optimierung der Extraktionsbedingungen im Labormaßstab für die nachfolgende Extraktion im Technikumsmaßstab

Die Extraktionen für das gegenständliche Projekt wurden mit einer Extraktionsanlage im Labormaßstab (ASE 100 = Accelerated Solvent Extraction der Firma Dionex) und mit einer Technikumsanlage mit einem Batchvolumen von 10l (DIG-MAZ Extraktionstechnik der Firma Innoweld) durchgeführt. Bei den Extraktionen im Labormaßstab wurden unterschiedliche Extraktionsparameter variiert, wobei aber durch die Polarität und die Flüchtigkeit der zu

extrahierenden Inhaltsstoffe die zum Einsatz kommenden Lösungsmittel bzw. die Temperatur des Prozesses bereits von Beginn an eingeschränkt werden konnten. Nach Optimierung der Methode wurde diese in den Technikumsmaßstab überführt sowie zur Extraktion der Proben aus dem Arbeitspaket „Pflanzenmonitoring“ (AP 2 bzw. AP 9) angewandt.

Die beschleunigte Lösungsmittelextraktion (Accelerated Solvent Extraction) ist eine Technik zur Extraktion von festen und pastösen Proben. Unter hohen Drücken und/oder Temperaturen bis 180 °C werden in Gegenwart von geeigneten Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen unter Stickstoffatmosphäre (Schutzgas) organische Wirkstoffe aus festen Matrices herausgelöst. Die Temperatur kann je nach Anwendung auch niedriger gewählt werden.

Die ASE zeichnet sich im Vergleich zu konventionellen Extraktionsverfahren durch einen geringen Lösungsmittelverbrauch, kurze Extraktionszeiten und den hohen Grad der Automation aus. Es können bis zu 5 Extraktionszyklen hintereinander durchgeführt werden, wobei immer frisches Lösungsmittel in die Extraktionszelle gelangt.

Durch die Extraktion unter Schutzgas (Stickstoff) können die Inhaltsstoffe besonders schonend extrahiert werden. Dies betrifft vor allem Stoffe, die unter Lufteinfluss leicht oxidieren (z.B. Antioxidantien).

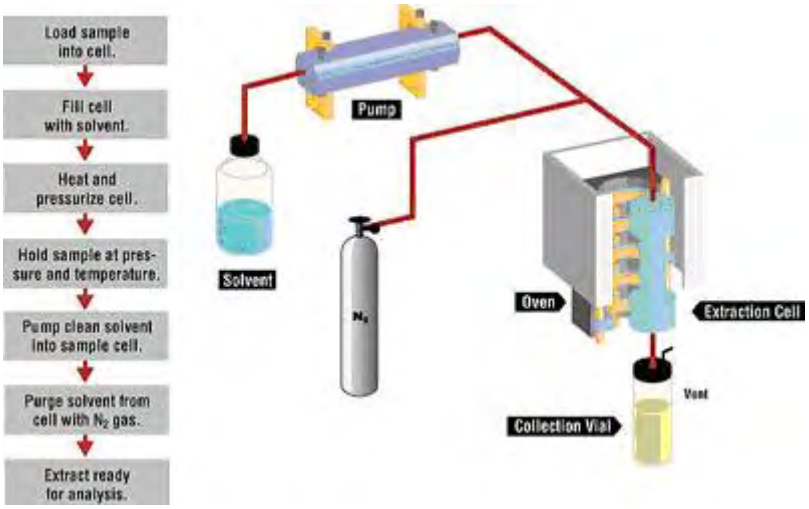

Abbildung 3: Funktionsprinzip ASE

3.1.4 Durchführung der Extraktion und Weiterverarbeitung im Technikumsmaßstab

Die Extraktionen des getrockneten Rainfarns der Ernten 2009 und 2010 zur Produktion des Rohextraktes für die präparative Isolierung sowie die Herstellung der

Spritzmittelformulierungen wurden im Technikumsmaßstab mit der DIG-MAZ 10V durchgeführt.

Die DIG-MAZ 10V ist eine diskontinuierlich arbeitende, vollautomatische Feststoffextraktionsanlage, die bei verschiedenen Temperaturen (Raumtemperatur bis 90°C) betrieben werden kann. Die am JOANNEUM RESEARCH Standort Hartberg betriebene Anlage setzt sich aus einem Extraktor mit einem Fassungsvolumen von 10L, einem Lösemittelbehälter (50L), einem Kühler mit Destillatbehälter sowie einem Wärmetauscher zusammen. Außerdem gehören noch eine Vakuumpumpe, ein Warmwassererzeuger, ein Kühlaggregat und ein Kompressor zur Ausstattung der Anlage. Die Steuerung der Anlage erfolgt über eine computerunterstützte Steuerungssoftware, jedoch ist auch ein manueller Betrieb der Anlage möglich.

Die Extraktionsanlage funktioniert auf Basis eines Umlaufperkolators mit einem unteren und oberen Siebboden. Das Lösungsmittel wird vom Lösungsmittelbehälter über ein Rohrleitungssystem mit Hilfe von zwei Kreiselpumpen durch den Extraktor wieder in den Lösungsmittelbehälter gepumpt. Das Lösungsmittel durchströmt dabei das Extraktionsgut je nach Programmerstellung in beiden Richtungen (Gleichstrom = von oben nach unten; Gegenstrom = von unten nach oben). Während des Extraktionsprozesses fließt das Lösungsmittel durch das Bodensieb über den zu extrahierenden Feststoff durch das obere Sieb zurück in den Lösungsmittelbehälter (Gegenstrom) bzw. in umgekehrter Richtung (Gleichstrom). Das Lösungsmittel wird durch einen Wärmetauscher auf die gewünschte Extraktionstemperatur gebracht. Außerdem können sowohl der Extraktor als auch der Lösungsmittelbehälter beheizt werden. Die Extraktionsanlage ist zusätzlich mit Temperatur- bzw. Drucksensoren ausgestattet. Es sind Drücke bis max. 6 bar möglich.

Neben der einfachen Extraktion („Extraktion 1“) bei der das Extraktionsmaterial mit dem bereits beladenen Lösungsmittel durchströmt wird, ist es auch möglich, die gewünschten Inhaltsstoffe ständig mit frischem Lösungsmittel herauszulösen, um eine höhere Ausbeute zu erzielen. Damit kann eine Datenvergleichbarkeit mit der ASE-Labor-Extraktionsanlage hergestellt werden. Dabei wird vom bereits bestehenden Extrakt, welches sich im Lösungsmittelbehälter befindet, unter Vakuum kontinuierlich frisches Lösungsmittel abdestilliert. Dieses wird in einem kleinen Kreislauf (Kreislauf führt nicht über den Lösungsmittelbehälter) durch den Extraktor gepumpt. Nach einer gewissen Zeit wird das angereicherte Lösungsmittel wieder durch frisches ersetzt („Extraktion 2“). Die Anzahl der Austauschzyklen ist frei wählbar. Nach erfolgter Extraktion kann bei Bedarf das Lösungsmittel durch Destillation unter Vakuum zurück gewonnen (Extrakt wird aufkonzentriert) und für weitere Extraktionen wieder verwendet werden.

Auch ein Dünnschichtverdampfer zur weiteren Aufkonzentrierung der Rohextrakte, ein Zusatzmodul der Technikumsanlage, steht zur Verfügung.

Die im Labormaßstab optimierte Extraktionsmethode wurde im Technikumsmaßstab in der computergesteuerten Extraktionsanlage DIG-MAZ 10V mit n-Hexan als Lösungsmittel durchgeführt. Die Betriebsparameter für die Extraktion mussten unter dem Gesichtspunkt einer optimalen Extraktqualität optimiert werden – dies betraf sowohl das Lösungsmittel selbst als auch die Geräteparameter Zeit und Temperatur.

Abbildung 4: Feststoffextraktionsanlage DIG-MAZ 10 V

3.1.5 Begleitanalysen der Extrakte und weiterverarbeiteter Fraktionen mittels HPLC/UV-DAD

Zur Analyse von Pflanzeninhaltsstoffen ist es notwendig, die hohe Anzahl der genannten Verbindungen sowohl qualitativ, als auch quantitativ zu charakterisieren. Je nachdem ob die zu charakterisierenden organischen Stoffe bei Temperaturen bis ca. 300°C in die Gasphase gebracht werden können oder nicht, wendet man grundsätzlich zwei Methoden an:

- Gaschromatographie (für bis 300° C flüchtige Stoffe) GC
- Hochleistungsflüssigkeitschromatographie/Mitteldruckflüssigkeits-chromatographie HPLC/MPLC

Bei diesen Trenntechniken wird das aufzutrennende Stoffgemisch mittels eines Gases (GC) oder einer Flüssigkeit unter hohem Druck (bis 300 bar, HPLC) oder im mittleren Druckbereich (je nach Säulendimensionen bis 50 bar, MPLC) durch eine chromatographische Säule transportiert. Diese ist innen variabel mit verschiedensten Materialien beschichtet. Die einzelnen Inhaltsstoffe verlassen aufgrund verschiedener

Wechselwirkungsmechanismen die Säule zu unterschiedlichen Zeitpunkten und werden mit Hilfe von speziellen Detektoren analysiert.
Der Diodenarray-Detektor (DAD) zählt neben den herkömmlichen UV - VIS - Detektoren zu den am häufigsten eingesetzten Detektoren in der HPLC. Er besitzt im Unterschied zum UV-VIS-Detektor nicht nur einzelne Photomesszellen, die nur eine Wellenlänge messen können, sondern ein gesamtes Diodenarray (eine Anordnung vieler einzelner Photodioden, 512 bis 1024 Dioden). Dieser Detektor ermöglicht die Aufnahme eines Spektrums über den gesamten UV - VIS - Wellenlängenbereich und kann somit verschiedene Wellenlängen gleichzeitig erfassen. Dies bietet die Möglichkeit von jedem Peak im Chromatogramm das gesamte UV - VIS - Spektrum aufzunehmen. Dieses Spektrum wird neben der Retentionszeit zur Identifikation der Substanzen herangezogen. Der DAD lässt somit nur eine Bestimmung UV-aktiver Substanzen (Substanzen mit chromophoren Gruppen) zu. Dazu zählen vor allem aromatische und ungesättigte konjugierte Verbindungen, aber auch Verbindungen mit Doppel- und Mehrfachbindungen und Carbonylverbindungen. Die Vorteile des DAD liegen in seiner hohen Empfindlichkeit gegenüber UV-aktiven Substanzen und seiner großen Verbreitung in der HPLC-Technik. Durch die gleichzeitige Messung bei mehreren Wellenlängen kann er auch bei Substanzen, deren Absorptionsmaxima nicht genau bekannt sind bzw. bei Analytenmischungen mit stark unterschiedlichen Absorptionsmaxima eingesetzt werden. Die durch den DAD mögliche dreidimensionale Darstellung des UV - VIS - Spektrums einer Substanz (3D-Technik) in Abhängigkeit von Zeit, Absorption und Wellenlänge ist eine wertvolle Hilfe für die Bestimmung der Inhaltsstoffe. Weiters reagiert der DAD, wie der UV - VIS - Detektor, unempfindlich auf die meisten Eluenten. Dies ermöglicht den Einsatz der meisten Laufmittel in Verbindung mit dem DAD.

Zunächst wurde eine HPLC/UV-DAD - Methode zur Analyse der Inhaltsstoffe erarbeitet, optimiert und schließlich für alle weiteren Extrakte aus dem Monitoring (AP 2 bzw. AP 9) und der Extraktion der Gesamternte im Technikumsmaßstab angewandt.
Als Vorbereitung für die Auftrennung der Inhaltsstoffe mittels HPLC/UV-DAD mussten die n - Hexan-Extrakte mit einem Mikrofilter (0,45 µm) filtriert werden. Vom Filtrat wurden 4 ml in Rundkolben pipettiert und n-Hexan im Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand im Rundkolben wurde mit 1 ml Methanol versetzt und in einem Ultraschallbad gelöst. Die Proben wurden in Vials überführt und in das HPLC/UV-DAD-System Summit (Dionex) mit Probengeber, Niederdruckgradientensystem, Säulenthermostat und UV-DAD-Detektor eingebracht. Das Injektionsvolumen für die HPLC - Analysen wurde auf den Extraktgehalt bezogen.

Folgende HPLC - Methode wurde entwickelt:
Flussrate: 0,2 ml/min
Säule: Phenomenex Synergi Max - RP (C_{12} mit TMS-Endcapping) (4 µm, 2 x 150 mm)
Laufmittel: Laufmittel A (Wasser : Methanol : Phosphorsäure = 95 : 5 : 0,5) and B (Methanol)
Gradient:
0 min: 100 % A und 0 % B Gradient
100 min: 0 % A und 100 % B isokratisch (gleich bleibende Zusammensetzung der Laufmittel)
110 min: 0 % A und 100 % B Gradient (Veränderung der Laufmittelzusammensetzung)
120 min: 100 % A und 0 % B isokratisch, Datenaufzeichnung wird beendet
140 min: 100 % A und 0 % B
Wellenlänge zur Detektion: 229 nm

3.1.6 Präparative Isolierung der aktiven Hauptinhaltsstoffe im Milligrammbereich und Strukturaufklärung

Dem Projektpartner (Universität Wien) wurden 5 g Rainfarnrohextrakt zur Verfügung gestellt. Davon wurden 3 g für die Fraktionierung weiterverwendet. Ziel der Fraktionierung war die Überprüfung, in welcher Fraktion die repellent wirksamen Inhaltsstoffe in ausreichenden Mengen enthalten sind um sie isolieren und identifizieren zu können.
Die Fraktionierung des Rohextraktes wurde durch Kieselgelsäulenchromatographie bei Normaldruck und die präparative Isolierung der wirksamen Hauptfraktion mit Hilfe einer MPLC-Anlage im Labormaßstab durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte die Strukturaufklärung der aktiven Hauptinhaltsstoffe.
Die konventionelle, präparative Säulenchromatographie bei Normaldruck ist eine gängige Trennmethode. Die MPLC arbeitet mit Drücken von 5-20 bar und wird erfolgreich in der Naturstoffisolierung angewandt.
Die Qualitätsbestimmung wurde mittels Dünnschichtchromatographie und eines HPLC/UV-DAD– bzw. GC/MS–Systems, die Strukturaufklärung mittels NMR (Kernspinresonanzspektroskopie) erzielt.
Die HPLC/UV-DAD-Analysen wurden mit einem Dionex Summit HPLC mit Famos Autosampler und UV-Photodiodenarraydetektor durchgeführt. Die Proben wurden in Methanol gelöst (10 mg/ml), davon wurden 5 µl injiziert und auf einer Trennsäule von Phenomenex (Max C_{12}, 150 x 2 mm) aufgetrennt. Der Laufmittelgradient begann bei 5% Methanol in Phosphorsäurepuffer und endete nach 100 min bei reinem Methanol. UV-Spektren wurden von 450 nm bis 220 nm aufgenommen.

Wegen der Unpolarität der Inhaltsstoffe, wurde die Fraktionierung über Kieselgel 60 (200-500 µm Partikelgröße, Merck) durchgeführt. Um eine Überladung der Säule zu vermeiden, wurde jeweils 1 g Rohextrakt über 40 g Kieselgel aufgetrennt. Die Dimension der Glassäule betrug 500 x 10 mm. Als Eluentenmischung wurde n-Hexan mit steigenden Zusätzen tert-Butylmethylketon (tBMK) verwendet. Dieses Lösungsmittel ist mit Ethylacetat vergleichbar, zeichnet sich aber durch eine geringere Neigung aus Peroxide zu bilden, die andere Inhaltsstoffe oxidieren können. Pro Eluentenmischung wurden 100 ml hergestellt und in 50 ml-Kolben geschnitten (Abbildung 5).

Abbildung 5: Fraktionierung des Rainfarnextrakts im Milligrammbereich

Fraktion/Lösungsmittel	n-Hexan	tBMK	Ethanol
I	100	0	0
II	95	5	0
III	90	10	0
IV	80	20	0
V	50	50	0
VI	0	100	0
VII	0	0	100

Tabelle 1: Verwendete Eluentenmischungen (Angaben in Volumsprozent)

Die Reindarstellung der aktiven Hauptfraktion wurde mittels präparativer Mitteldruckchromatographie (MPLC) durchgeführt. Als Trennsäule diente eine Glassäule (400 x 40 mm), die mit Kieselgel 60 (Lichroprep 25-40 µm, Merck) gefüllt war. Als Elutionsmittel wurden 5% und 10% Ethylacetat (in n-Hexan) verwendet, der UV Detektor wurde auf 254 nm eingestellt. Eine weitere MPLC-Auftrennung erfolgte mit 2 % Ethylacetat (in n-Hexan).

3.1.7 Spritzmittelformulierung

In der Formuliertechnik für Spritzmittel soll der Wirkstoff in eine Zubereitungsform gebracht werden, die für den Anwender praktikabel ist und die gewährleistet, dass eine bestimmte Menge Wirkstoff gleichmäßig über eine große Fläche verteilt werden kann.
Im vorliegenden Projekt wurde die Spritzmittelformulierung als Öl-in-Wasser Emulsion (EW) ausgeführt. Dabei ist die Emulsion von wasserunlöslichem Wirkstoff und Wasser schon gebildet und wird beim Ansetzen der Spritzbrühe nur verdünnt. Vorteil der EW-Formulierung im Gegensatz zur EC-Formulierung (emulgierbares Konzentrat – bildet erst beim Ansetzen mit Wasser eine Emulsion) ist der geringere Einsatz an Lösungsmitteln und somit auch ein verbessertes Umweltverhalten.
Da der aus dem Rainfarn gewonnene Rohextrakt bzw. die Hauptfraktionen stark lipophil (wasserunlöslich) sind, musste ein geeigneter Emulgator gefunden werden, der es ermöglichte, die wasserunlöslichen Wirkstoffe ohne Entmischung in Wasser einzubringen.
Es wurden unterschiedliche Emulgatoren und Lösungsmittel in verschiedenen Konzentrationen im Zuge der Entwicklung einer Spritzmittelformulierung ausgetestet.

3.1.8 Präparative Isolierung der aktiven Hauptfraktionen im Grammbereich

Eine vollständige Isolierung von Einzelsubstanzen im Grammbereich, wie ursprünglich beabsichtigt, war aufgrund der Ähnlichkeiten, der geringen Mengen und der damit verbundenen erschwerten Auftrennung der repellent wirksamen Substanzen nicht möglich und im Hinblick auf die Wirtschaftlichkeit einer Produktentwicklung auch nicht zielführend.
Die im AP 6 entwickelte Fraktionierung des Rohextraktes wurde mittels Kieselgelsäulen bei Normaldruck in größerem Maßstab durchgeführt.
Dazu wurden jeweils 10 g Rohextrakt über 100 g Kieselgel 60 (0,063 – 0,2 µm Partikelgröße, Merck) über eine Glassäule mit den Dimensionen von 30 cm Länge und 6,5 cm Innendurchmesser aufgetrennt. Zur Beschleunigung der Trennung wurde zeitweise ein Unterdruck in der Säule durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt. Die 10 g Rohextrakt wurden

vor der Trennung mit ca. 80 ml des Extraktionsmittels n - Hexan auf ca. 30 g Kieselgel aufgezogen und getrocknet. Es wurden insgesamt fünf Säulenauftrennungen durchgeführt und die jeweils gleichen Fraktionen zusammengeführt.

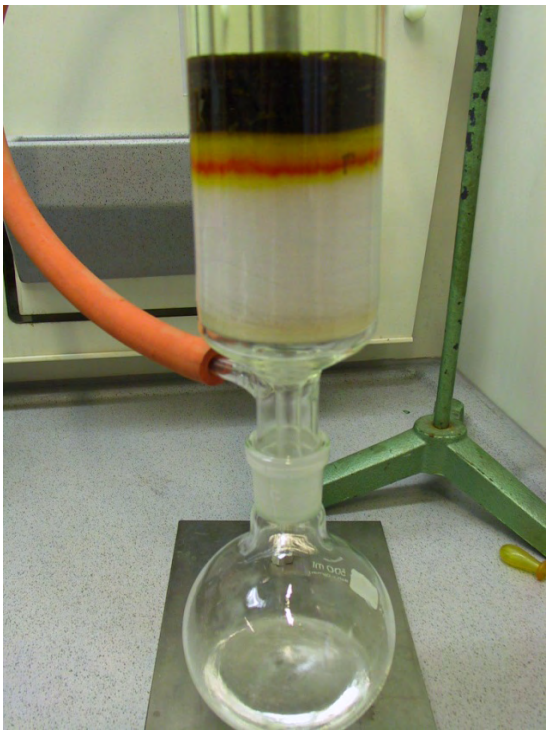

Abbildung 6: Fraktionierung des Rainfarnextrakts im Grammbereich

Die verwendeten Eluentenmischungen wurden an jene des Kapitels 3.1.6. angepasst:

Fraktion/Lösungsmittel	n-Hexan	tBMK	Ethanol
I	100	0	0
II	95	5	0
III	90	10	0
IV	80	20	0
V	50	50	0
VI	0	100	0
VII	0	0	100

Tabelle 2: Verwendete Eluentenmischungen (Angaben in Volumsprozent)

Die verwendeten Eluentenmischungen wurden an jene des Kapitels 3.1.6. angepasst. Vom ersten Elutionsmittel wurden 450 ml, von allen weiteren 250 ml für die Fraktionierung eingesetzt und die Eluate in entsprechenden Kolben aufgefangen. Die Lösungsmittelentfernung erfolgte am Rotationsverdampfer bei 40°C bzw. ab Fraktion V bei 50°C unter Vakuum bis fast zur Trockene. Die eingeengten Extrakte wurden in tarierte Gefäße überführt und unter Stickstoffstrom getrocknet.

3.1.9 Freilandversuche in einer Apfelkultur und diagnostische Laborversuche mit dem Gesamtextrakt

Freilandversuche:

Die Freilandversuche 2010 wurden im Versuchszentrum Laimburg in Südtirol (Italien) im Sachbereich Ökologischer Landbau durchgeführt. Das Versuchsdesign bildeten vier randomisierte Blöcke mit 10 + 2 Randbäumen pro Versuchseinheit (Abbildung 7). Die Anwendung des Rainfarnrohextraktes erfolgte in zwei Dosierungen („Rainfarn 400“ für 0,4 % bzw. „Rainfarn 100“ für 0,1%). Um den Einfluss der Spritzmittelformulierung vergleichen zu können, wurde diese Formulierung ohne Zusatz des Extraktes als sogenanntes „Versuchsprodukt“ ebenso im Versuchsdesign mitberücksichtigt. Die Behandlungsvarianten und Spritzintervalle sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Behandlungen erfolgten vom 1. Juni bis zum 9. September 2010 in wöchentlichen Abständen.

Die Auswertung wurde hinsichtlich folgender Parameter durchgeführt:

- Monitoring Rim Pro: Falter, Eiablage, Einbohrung
- Juli: Obstmade – befallene Früchte (lebend, Gesamtschaden)
- Oktober: Obstmade Gesamtbefall – befallene Früchte (ausgewandert (lebend), Gesamtschaden)

Thema: Obstmade, 1. + 2. Generation, Mittelprüfung

Versuchsanlage: VZ Laimburg, Block 23

Sorte/Unterlage: Braeburn / M9

Pflanzabstand: 3,0 x 0,90 m

Pflanzjahr: 1997

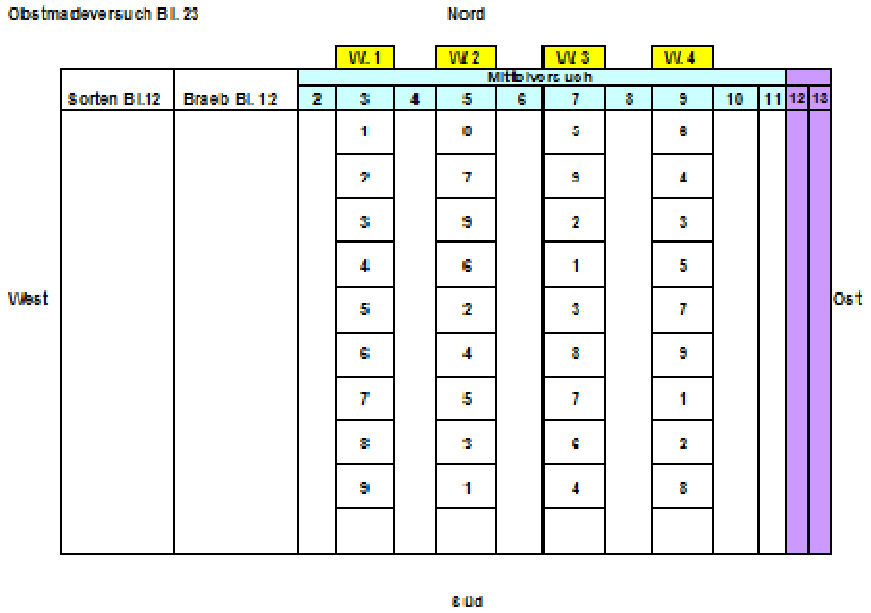

Abbildung 7: Versuchsdesign der Mittelprüfung gegen den Apfelwickler

Nr. V	Varianten	Name	Applikationstechnik	Dosis g/hl	Spritzintervalle
1	Chlorpyriphos	Pyrinex ME	Sprüher	210 ml	Achtung nur jede 2. Spritzung
2	Sojaöl	Greenline	Sprüher	500 ml	1x pro Woche
3	Bacillus Th.	EXP 128	Sprüher	100 gr	1x pro Woche
4	Bacillus Th.	Bacillus Terranalisis	Sprüher	100 gr	1x pro Woche
5	Cerealtoscana	Duofruit	Sprüher	1l + 300g	1x pro Woche
6	Dosis 1 Pflanzenextrakt	Rainfarn 400	Sprüher	400 ml	1x pro Woche
7	Dosis 2 Pflanzenextrakt	Rainfarn 100	Sprüher	100 ml	1x pro Woche
8	Spritzformulierung	Versuchsprodukt	Sprüher	400 ml	1x pro Woche
9	Kontrolle	-	Sprüher	-	-

Tabelle 3: Behandlungsvarianten und Spritzintervalle

Varianten:

Chlorpyriphos ist ein Thiophosphorsäureester, das als Insektizid von Dow Chemical Co. Mitte der 1960er-Jahre eingeführt wurde. Handelsnamen sind unter anderem Dursban, Empire, Eradex, Lorsban (Dow Chemical Company), Loxiran und Stipend. Chlorpyriphos hat Kontakt-, Fraß- und Atemgiftwirkung. Es wirkt am Nervensystem der Insekten, indem es das Enzym Acetylcholinesterase hemmt. Chlorpyriphos wird vielfältig gegen saugende und beißende Insekten sowie gegen Bodenschädlinge in zahlreichen landwirtschaftlichen Kulturen, gegen Ameisen in Haus und Garten, gegen Hausfliegen, Haushalts- und Lagerschädlinge, gegen Kleidermotten, zur Moskitobekämpfung, als Stallspritzmittel sowie zur Bekämpfung von Ektoparasiten an Tieren eingesetzt.[vi]

Bacillus thuringiensis ist ein Bakterium, das vor allem im Boden, aber auch an Pflanzen und in Insektenkadavern gefunden werden kann und produziert kristalline Proteine (Bt-Toxine), die spezifisch auf verschiedene Insektenarten der Ordnungen Käfer, Schmetterlinge, Hautflügler und Zweiflügler sowie Nematoden toxisch wirken, bei Pflanzen, Wirbeltieren und Menschen jedoch wirkungslos sind. Sie sind vollständig biologisch abbaubar.[vii]

Duofruit ist ein Produkt der Firma Cerealtoscana Spa und dient als Ersatz von kupfer- und schwefelhältigen Pestiziden und Botrytiziden im Weinbau.

Im Falle des Rainfarnextraktes wurden bei der 0,4% - igen Anwendung 60 g/100 l aktive Substanz (GA = Gramm aktive Substanz) und bei der 0,1% - igen Anwendung 15 g/l aktive Substanz (GA) eingesetzt (Tabelle 4)

Trt No	treatment name	Form Conc.	Form Unit	Form Type	Rate	Rate Unit	Other Rate	Other Rate Unit
6	Rainfarnextrakt	150	g/l	EC	0,4	% V / V	60	GA/100l
7	Rainfarnextrakt	150	g/l	EC	0,1	% V / V	15	GA/100l

Tabelle 4: Spritzmittelformulierungen mit Rainfarnextrakt

Diagnostische Einbohrungsversuche im Feldversuch und Glashaus:

Diese Tests wurden ebenso im landwirtschaftlichen Versuchszentrum Laimburg im Sachbereich Pflanzenschutz durchgeführt.

Einbohrungsversuche mit Apfelpaaren im Feldversuch:

Für den Versuch wurden zwei Reihen Granny Smith in Block 118 ausgewählt. Die Bäume wurden 1984 gepflanzt. Der Pflanzenabstand beträgt 1,3 m und die Fahrgassenbreite 3,5 m.

Für den Halbfreilandversuch wurden Apfelwicklereier verwendet, die sich im sogenannten Schwarzkopfstadium befanden, d.h. die Eier waren unmittelbar vor dem Schlüpfen. Bei allen Versuchen im Freiland wurden Eier des Stammes BL 22 verwendet. Der Stamm wurde aus Block 22, einer Anlage des Versuchszentrums Laimburg, welche mit der Sorte Fuji bepflanzt ist, entnommen. Für den ersten Termin am 30.06.2010 wurden Eier der 20. Filialgeneration verwendet. Am 01.10.2010 waren es Eier der 21. Filialgeneration desselben Stammes.

Innerhalb der Versuchsanlage wurde eine Reihe ausgesucht bei der keine manuelle Fruchtausdünnung vorgenommen wurde. Für den Versuch wurden auf der Südseite der Reihe Fruchtbüschel zu je zwei Früchten ausgewählt. Es wurden nur Fruchtpaare ausgesucht, welche so positioniert waren, dass sie sich an der Innenseite berührten. Die Versuchsreihe wurde ab dem Versuchsdatum nicht mehr mit Insektiziden behandelt. Für die Behandlung wurden Behälter mit einer Füllmenge von einem halben Liter verwendet. Pro Fruchtpaar wurde jeweils nur eine Frucht eingetaucht. Diese Frucht wurde anschließend mit einem wasserfesten Stift markiert. Das Fruchtpaar wurde außerdem mit einer Etikette versehen, auf welcher sich Informationen zur jeweiligen Konzentration mit welcher die Behandlung erfolgte, befanden. Jeder Apfel wurde vollständig in die Lösung eingetaucht (siehe Abbildung 8). Besonders beachtet wurde dabei, dass durch mögliche Tropfen, welche am getauchten Apfel blieben bzw. abperlten, der andere Apfel des Fruchtpaares oder sich darunter befindende Fruchtpaare nicht benetzt wurden.

Abbildung 8: Vollständig eingetauchte Frucht

Nachdem die behandelten Äpfel getrocknet waren, wurde mit der Anbringung der Apfelwicklereier begonnen. Nach der Eiablage befanden sich diese weiterhin im Zuchtraum bei einer Temperatur von 20°C und 60% Luftfeuchtigkeit. Für den Versuch wurden ca. 1cm²

große Papierstücke ausgeschnitten auf denen sich jeweils ca. ein bis vier Eier befanden. Zum Zeitpunkt der Anbringung waren diese im Schwarzkopfstadium. Angeklebt wurden die Papierquadrate in Stielnähe mit einem Universalkleber. Pro Apfelpaar wurden jeweils nur auf einem Apfel Eier angebracht, so dass sich innerhalb einer Variante 50% der angebrachten Eier auf einem unbehandelten und 50% auf einem behandelten Apfel befanden. Auch wurde darauf geachtet, dass sich die Eier auf der Papierunterseite - also zum Apfel hin - befanden um eine eventuelle Austrocknung der Eier durch die Sonne zu verhindern.

Einbohrungsversuche im Glashaus:

Reife Äpfel der Sorte Nicoter Kanzi wurden mit Hilfe von speziellen Klammern am Stiel an Bambuslatten befestigt. Die einzelnen Früchte wurden so angebracht, dass sie sich gegenseitig nicht berührten. Der genaue Versuchsaufbau ist in Abbildung 9 abgebildet. Für die Behandlung wurden Bechergläser mit einer Füllmenge von einem Liter verwendet. Jeder Apfel wurde nur bis zur Hälfte in die Spritzbrühe eingetaucht, dieser Bereich wurde vorher mit einem wasserfesten Stift gekennzeichnet. Es wurden fünf verschiedene Varianten inklusive einer Kontrollvariante eingesetzt. Pro Variante wurden je 20 Äpfel (1. Serie) und je 25 Äpfel (2. und 3. Serie) behandelt. Mit der Anbringung der Apfelwicklereier wurde begonnen als die Äpfel abgetrocknet waren. Wie auch bei den Versuchen im Halbfreiland wurden Apfelwicklereier verwendet, welche sich im Schwarzkopfstadium befanden. Ihre Vitalität wurde vorher unter dem Mikroskop überprüft. Zum Unterschied zu den Halbfreilandversuchen wurden bei diesem Versuch die Papierquadrate auf denen sich die Eier befanden nicht in Stielnähe sondern direkt auf der gekennzeichneten Linie mit einem Universalkleber angeklebt. Somit befanden sich die Eier genau zwischen behandeltem und unbehandeltem Bereich des Apfels.

Der Versuch wurde an drei unterschiedlichen Terminen wiederholt. Wobei die 1. Serie des Versuches in einer Zelle des Glashauses der Sektion Pflanzenschutz des Versuchszentrums Laimburg stattfand und die zwei weiteren Serien zu einem späteren Zeitpunkt in einem Insektenzuchtraum durchgeführt wurden.

Die Auswertung des Versuches fand jeweils nach einer Woche statt.

Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einbohrungsverhaltens der Apfelwicklerlarven

Um den Einfluss der Spritzmittelformulierung vergleichen zu können, wurde diese ohne Zusatz des Extraktes als sogenannter „Blindwert“ ebenso in beiden Versuchsdesigns mitberücksichtigt.

3.2 Innovationsgehalt des Projektes

Die vermehrte stoffliche Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen aus heimischem Anbau ist ein erstrebenswertes Ziel aus ökonomischer und ökologischer Sicht. Der Einsatz eines Pflanzenextraktes als Repellent in der konventionellen wie auch in der biologischen Landwirtschaft gewinnt unter diesem Gesichtspunkt verstärkt an Bedeutung. Hierbei wird es für die österreichische Landwirtschaft auch wichtig sein, dass heimische Pflanzen, die zusätzlich eine erfolgreiche Kultivierung erlauben, eingesetzt werden. Die Herstellung von Rainfarnextrakt in den ausreichenden Mengen für Freilandversuche und die Isolierung der aktiven Einzelsubstanzen wurde in dieser Form noch nicht durchgeführt. Dazu waren in den meisten Fällen zu geringe Mengen, insbesondere für Freilandversuche, vorhanden. Dies wurde in diesem Projekt möglich. Die erzielten Ergebnisse liefern somit wichtige Hinweise für eine mögliche nachfolgende Produktentwicklung und dem damit verbundenen Zulassungsverfahren eines Spritzmittels auf Basis von Rainfarn bzw. seiner Inhaltsstoffe.

4 Ergebnisse und Meilensteine des Projektes

4.1 Anbau Rainfarn 2008 und 2009

Bereits im Jahr 2008 wurde am Biohof Oswald aus eigenfinanzierten Mitteln des Auftragnehmers der Anbau von Rainfarn durchgeführt. Unter denselben Bedingungen wie 2009 wurden am 10. April 2008 Jungpflanzen, vorgezogen im Versuchszentrum Wies, angepflanzt. Somit stand 2009 auch eine Fläche mit Rainfarn im zweiten Bestandsjahr zur Verfügung.

Rainfarnanbau 2008

Die Auspflanzung der vorgezogenen Jungpflanzen mit einem Reihenabstand von 60 cm und einem Pflanzabstand von 26 – 28 cm erfolgte am 10. April 2008 am Standort Oswald.
Es wurde ein Trockensubstanzertrag von 3,07 t/ha aus der Ernte 2008 errechnet.

Pflanzenentwicklung 2008

Der Rainfarn zeichnete sich in den ersten drei Monaten, von Mitte April bis Mitte Juli, nach dem Auspflanzen ins Freiland durch rasches Höhenwachstum aus. Zur Vollblüte wurde beim Rainfarn im 1. Bestandsjahr eine durchschnittliche Pflanzenhöhe von 140 cm erreicht, der Rainfarn, der sich bereits im zweiten Bestandsjahr befand, erreichte eine Höhe von 180 cm. Die Trockensubstanzgehalte lagen zwischen 16 und 20 % bis zur Vollblüte, beim letzten Erntetermin nach der Vollblüte bei 34 %. Der Stängelanteil lag bei 35 bis 50 % der Frischmasse.[i]

Die folgende Dokumentation (Abbildung 10) zeigt den Verlauf der Entwicklung des Pflanzenbestandes knapp nach der Anpflanzung bis zur Vollblüte am Biohof Oswald im ersten Bestandsjahr.

5. Mai

13. Juni

4. Juli

4. August

Abbildung 10: Verlauf der Pflanzenentwicklung von der Anpflanzung bis zur Vollblüte am Biohof Oswald (Foto 1: 5. Mai, Foto 2: 13. Juni, Foto 3: 4. Juli und Foto 4: 4. August 2008)[i]

Bearbeitung und Ernte 2008

Eine Bearbeitung von Rainfarnbeständen ist relativ leicht möglich, da durch den schnellen Bestandesschluss die Kontrolle des Unkrautbestandes im Vergleich mit anderen Heil- und Gewürzkräutern wenig Schwierigkeiten bereitet.

Die Ernte erfolgte am 8., 11. und 14. August 2008 während der Vollblüte mit einem Fingermähwerk. Das Pflanzenmaterial wurde abtransportiert, gehäckselt, getrocknet und in Großsäcken für die Extraktion aufbewahrt (siehe Abbildung 11).

Abbildung 11: Ernte, Transport, Zerkleinerung und Lagerung der getrockneten Rainfarndroge am Biohof Oswald[i]

Rainfarnanbau 2009

Die Auspflanzung der vorgezogenen Jungpflanzen mit einem Reihenabstand von 60 cm und einem Pflanzabstand von 26 – 28 cm erfolgte am 22. April 2009 an den beiden Standorten Biohof Oswald und Biogemüsehof Wressnig. Die Fläche betrug je 10 Ar, wobei jeweils 5.000 Pflanzen ausgepflanzt wurden. Als Vorfrucht war beim Biohof Oswald eine Gründüngung bestehend aus Kleegras angebaut und beim Biogemüsehof Wressnig ein Grünschnittroggen.

Pflanzenentwicklung 2009

Drei Pflanzenbestände wurden 2009 einem Monitoring unterzogen – der Rainfarnbestand im 1. und 2. Bestandsjahr am Biohof Oswald und Rainfarnbestand im 1. Bestandsjahr am Biogemüsehof Wressnig.

27. Mai 2009

Nach der Anpflanzung folgte eine sehr trockene Witterung. Aus diesem Grund waren die Rainfarnbestände im 1. Bestandsjahr sowohl bei Oswald als auch bei Wressnig zu diesem Zeitpunkt eher wenig entwickelt, es erfolgte jedoch ein Austrieb aller Jungpflanzen (keine Ausfälle). Die durchschnittliche Pflanzenhöhe betrug 20 cm, die vegetative Entwicklung befand sich im ersten Drittel (Entwicklungscode Ewc = 33).

Der Rainfarn im 2. Bestandsjahr am Biohof Oswald zeigte eine sehr gute, kräftige Entwicklung und erreichte eine Höhe von 110 cm. Erste Blütenanlagen bzw. –knospen waren bereits sichtbar (Ewc 51).

17. Juni 2009

Die beiden Rainfarnbestände im 1. Bestandsjahr erreichten eine Höhe von ca. 40 cm und waren gut entwickelt (Ewc 36).

Der Rainfarn im 2. Bestandsjahr war auf 160 cm angewachsen und stand kurz vor der Blüte (Ewc 59). Alle Bestände wurden mittels Handhacke unkrautfrei gehalten.

Abbildung 12: Rainfarnbestand Oswald am 17. Juni 2009 (linke Reihe: 1. Bestandsjahr; rechte Reihe: 2. Bestandsjahr)

Der Trockensubstanzertrag betrug 4,7 t/ha aus dem 1. Bestandsjahr im Jahr 2009 bzw. 5,02 t/ha aus dem 2. Bestandsjahr im Jahr 2009.

Rainfarnansaat 2010

Im Jahr 2010 erfolgte kein neuer Anbau von Rainfarn. Somit waren die zweijährigen Bestände aus dem Anbau 2009 und die dreijährigen Bestände aus dem Anbau 2008 zu beschreiben und zu ernten.

Pflanzenentwicklung 2010 am Biohof Oswald

20. April 2010

An der Basis erfolgte ein guter Neuaustrieb, aber es gab noch kein Streckungswachstum (Ewc 19). Der Bestand war unkrautfrei und der Pflanzenwuchs aus dem Anbau 2008 (3. Bestandsjahr) war etwas schwächer als aus dem Anbau 2009 (2. Bestandsjahr).

Wuchshöhe 2. Bestandsjahr: 20 – 25 cm

Wuchshöhe 3. Bestandsjahr: 15 – 20 cm

Abbildung 13: Rainfarnbestand Oswald am 20. April 2010 (links: 2. Bestandsjahr; rechts: 3. Bestandsjahr)

17. Mai 2010

sehr gute Bestandsentwicklung; Reihen sind geschlossen (Ewc 31)

Wuchshöhe 2. Bestandsjahr: 55 – 60 cm

Wuchshöhe 3. Bestandsjahr: 45 – 50 cm

Abbildung 14: Rainfarnbestand Oswald am 17. Mai 2010 (links: 2. Bestandsjahr; rechts: 3. Bestandsjahr)

26. Mai 2010

sehr gute, geschlossene Bestandsentwicklung (Ewc 33)

Wuchshöhe 2. Bestandsjahr: 80 - 100 cm

Wuchshöhe 3. Bestandsjahr: 60 - 70 cm

v.a. beim dreijährigen Bestand ist ein starker Mehltaubefall zu verzeichnen

Abbildung 15: Rainfarnbestand Oswald am 26. Mai 2010 (links: 2. Bestandsjahr; rechts: 3. Bestandsjahr)

Abbildung 16: Mehltaubefall im dreijährigen Bestand am 26. Mai 2010

28. Juni 2010

Wuchshöhe 2. Bestandsjahr: 160 cm; wenig Blattmasse, Mehltau, Läuse

Wuchshöhe 3. Bestandsjahr: 140 cm; schlechte Entwicklung; wenig Blattmasse

Die Knospenbildung hatte eingesetzt und vereinzelt sind bereits Terminalknospen vorhanden (Ewc 51). Aufgrund des Mehltaubefalls und von Hagelschäden war die Krautmasse sehr gering und diese Bestände konnten daher nicht mehr genutzt werden. Ende Juni erfolgte deshalb der Umbruch der Rainfarnbestände.

Abbildung 17: Rainfarnbestand Oswald am 28. 6. 2010 (links: 2. Bestandsjahr; rechts: 3. Bestandsjahr)

Pflanzenentwicklung 2010 am Biogemüsehof Wressnig

20. April 2010

Der Bestand wurde im Herbst 2009 nicht abgeerntet, die abgestorbenen trockenen Blütenstände waren mit einer Höhe von 80 bis 100 cm noch vorhanden. Der Bestand war unkrautfrei und an der Basis erfolgte ein guter Neuaustrieb (Höhe 20 – 30 cm). Es waren die Fiederblätter vorhanden, aber noch kein Streckungswachstum sichtbar (Ewc 19).

Wuchshöhe 2. Bestandsjahr: 20 - 25 cm

Abbildung 18: Rainfarnbestand Wressnig am 20. April 2010 (Neuaustrieb und Blütenstände aus dem Bestandsjahr 2009)

16. Juni 2010

Gesunder, schöner Bestand; 140-160 cm (180 cm); kurz vor der Knospenbildung (Ewc 50)

Die alten Blütenstände wurden nicht geschnitten, es waren aber nur mehr vereinzelt alte Blütenstände vorhanden. Eine Schnitthöhe von 30 bis 40 cm wäre sinnvoll, da erst in dieser Höhe die Blattmasse beginnt. Es wurde nur einmal gehackt – Bestand war unkrautfrei.

Abbildung 19: Rainfarnbestand Wressnig am 16. Juni 2010

28. Juni 2010

Sehr gut entwickelter Bestand; Wuchshöhe 180 cm; Beginn der Knospenbildung (Ewc 53); Die Blattmasse beginnt bei etwa 50 cm, dadurch war ein hoher Schnitt erforderlich.

Abbildung 20: Rainfarnbestand Wressnig am 28. Juni 2010

13. Juli 2010

Der Rainfarn wurde geerntet und in der Trocknungsanlage des Biohof Oswald schonend bei 35 °C getrocknet und in Großsäcken gelagert.

4.2 Ermittlung des optimalen Erntezeitpunktes 2008 und 2009 (Monitoring)

Zur Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes wurden die Pflanzenbestände zu unterschiedlichen Zeitpunkten beprobt, der Entwicklungsstand anhand der phänologischen Merkmale mit der Methode nach BBCH[ii] beschrieben und die jeweiligen Extraktgehalte bestimmt.

Extraktgehalte 2008

Zu jedem Erntetermin wurden 20 Stichproben aus dem Rainfarnfeld im ersten Bestandsjahr und 5 Stichproben aus dem Rainfarnfeld im zweiten Bestandsjahr für die Analysen entnommen und statistisch ausgewertet. Folgende Erntetermine wurden festgelegt, wobei die Probennahme immer zur gleichen Tageszeit (zw. 10:00 und 12:00) erfolgte:

Erntetermin a: Blütenanlagen bzw. -knospen sichtbar (51)

Erntetermin b: Blütenanlagen bzw. -knospen sichtbar (51)

Erntetermin c: Beginn der Blüte / 10 % der Blüten offen (61)

Erntetermin d: 30 % der Blüten offen (63)

Erntetermin e: Vollblüte - 50 % der Blüten offen (65)

Erntetermin f: Abgehende Blüte - Mehrzahl der Blütenblätter abgefallen oder vertrocknet (67)

Die Extraktgehalte bewegten sich im ersten Bestandsjahr bei 0,2 bis 0,45 % bezogen auf die Frischmasse (Abbildung 21), bzw. bei 1,0 bis 2,1 % bezogen auf die Trockensubstanz. Aufgrund der großen statistischen Schwankungsbreite ist eine eindeutige Tendenz des Inhaltsstoffgehaltes nicht ablesbar.

Beim Rainfarn im zweiten Bestandsjahr liegen die Inhaltsstoffgehalte bei 0,2 bis 0,8 % bezogen auf die Frischmasse (Abbildung 22), bzw. bei 0,8 bis 3,2 % bezogen auf die Trockensubstanz. Hier ist eindeutig erkennbar, dass die Inhaltsstoffgehalte vor der Vollblüte am höchsten sind und bis zur Vollblüte in einem hohen Bereich liegen.

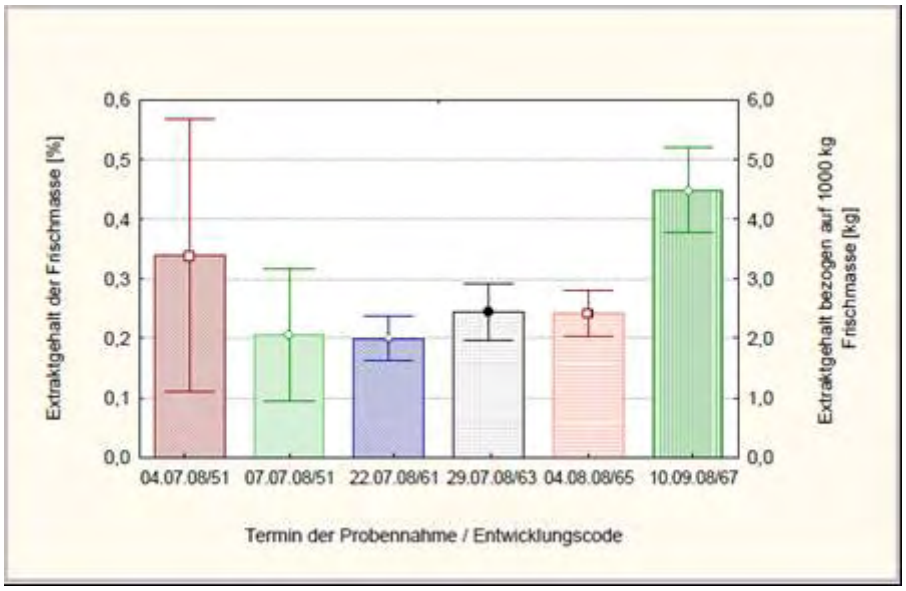

Abbildung 21: Extraktgehalte im Verlauf der Pflanzenentwicklung bezogen auf Frischmasse bei Rainfarn im ersten Bestandsjahr

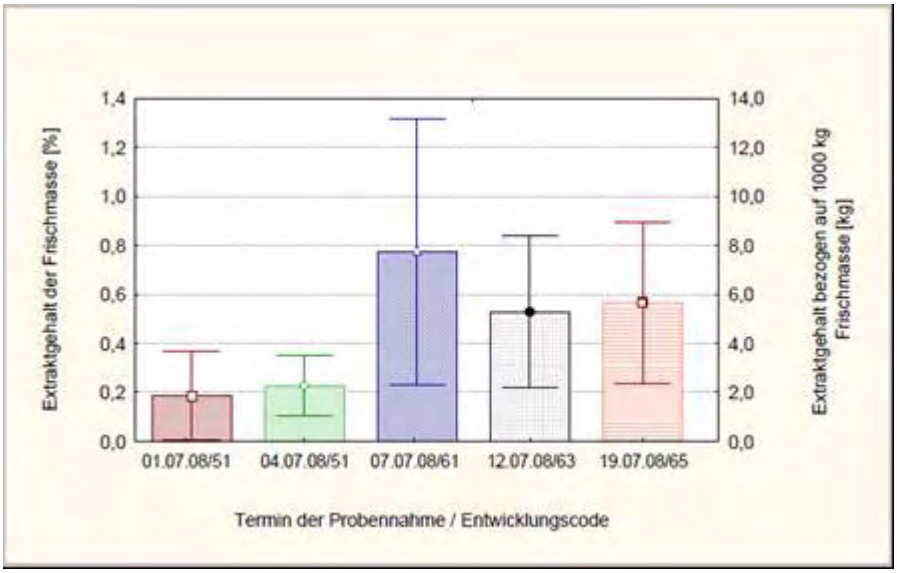

Abbildung 22: Extraktgehalte im Verlauf der Pflanzenentwicklung bezogen auf Frischmasse bei Rainfarn im zweiten Bestandsjahr

Extraktgehalte 2009

Wie auch 2008 wurden zu den verschiedenen Entwicklungsstadien Stichproben aus den Versuchsfeldern gezogen und nach Extraktion der Pflanzenproben mittels ASE die Extraktgehalte bestimmt. Die Extraktgehalte lagen bei beiden Standorten und sowohl bei den Beständen im 1. Bestandsjahr wie auch im Bestand im 2. Bestandsjahr im gleichen Bereich. Es wurde in der Zeit vor der Vollblüte ein Extraktgehalt von 1,57% bezogen auf die Trockenmasse bzw. von 0,48% bezogen auf die Frischmasse erreicht. Somit wurden

ähnliche Extraktgehalte wie 2008 erreicht. In Tabelle 5 und Abbildung 23 sind die durchschnittlichen Extraktgehalte aus den Stichprobenuntersuchungen zusammengefasst.

Standort Biohof Oswald - 1. Bestandsjahr					
Datum d. Beprobung	BBCH-Code	Wuchsh. [cm]	TS-Gehalt	Extraktgehalt [% d. TS]	Extraktgehalt [% d. FM]
17.06.2009	51	40	24,6	1,35	0,36
20.07.2009	61	120	26,03	1,42	0,39
07.08.2009	65	140	26,14	1,49	0,48
08.10.2009	51	100	18,25	0,86	0,18
Standort Biogemüsehof Wressnig - 1. Bestandsjahr					
Datum d. Beprobung	BBCH-Code	Wuchsh. [cm]	TS d. Prob. [%]	Extraktg. d. TS [%]	Extraktg. d. FM [%]
20.07.2009	63	120	25,98	1,24	0,36
07.08.2009	65	140	25,05	1,57	0,46
08.10.2009	51	100	19,65	0,95	0,25
Standort Biohof Oswald - 2. Bestandsjahr					
Datum d. Beprobung	BBCH-Code	Wuchsh. [cm]	TS d. Prob. [%]	Extraktg. d. TS [%]	Extraktg. d. FM [%]
14.07.2010	61	185	24,51	1,16	0,32
23.07.2010	63	190	26,56	1,21	0,4

Tabelle 5: Extraktgehalte der Rainfarnbestände 2009 am Standort Biohof Oswald und Biogemüsehof Wressnig

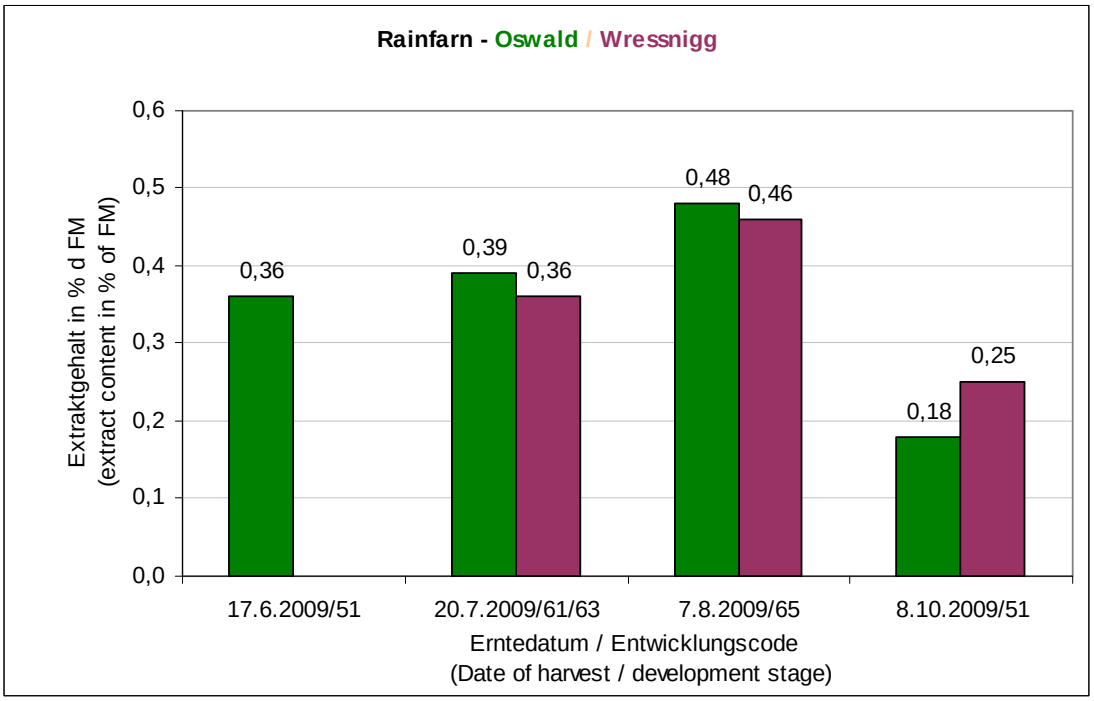

Abbildung 23: Extraktgehalte 2009 der Rainfarnbestände im 1. Bestandsjahr an den Standorten Biohof Oswald und Biogemüsehof Wressnig

4.3 Optimierung der Extraktionsbedingungen im Labormaßstab für die nachfolgende Extraktion im Technikumsmaßstab

Da die Polarität und die hohe Flüchtigkeit der zu gewinnenden Inhaltsstoffe bereits aus Voruntersuchungen bekannt waren, wurden die Extraktionsbedingungen auf diese Tatsache hin optimiert. Als Lösungsmittel wurde n-Hexan ausgewählt und als Extraktionstemperatur Raumtemperatur, da die für die Repellentwirkung verantwortlichen Stoffe sehr flüchtig sind. Durch die Flutung der Anlage mit Stickstoff wird eine Verflüchtigung bzw. Veränderung der Inhaltsstoffe weitestgehend unterdrückt. Weiters wurde auch die höchstmögliche Zyklenanzahl der Extraktionen im Labormaßstab mit 5 Zyklen gewählt, wobei die Extraktionszelle bei jedem Zyklus mit frischem Lösungsmittel befüllt und so das Pflanzenmaterial vollkommen ausgelaugt wurde. Diese optimierte Extraktionsmethode wurde im Monitoring (AP2) eingesetzt um den Verlauf des Extraktgehaltes über die Bestandsentwicklung aufzeichnen zu können.

Diese Extraktionsparameter wurden im Anschluss auf die Extraktion im Technikumsmaßstab umgelegt um ein effizientes Upscaling zu gewährleisten. Die Optimierung des Upscaling – Schrittes im Hinblick auf Lösungsmittelverbrauch, Ausbeute, Dauer des Extraktionsprozesses und Kosten ist ein wichtiger Parameter bei der Produktentwicklung von pflanzlichen Extrakten, die durch schonende, nachhaltige Extraktion hergestellt werden sollen. Deshalb müssen die verschiedenen Parameter zunächst im Labormaßstab vorsimuliert, und soweit wie möglich an den Extraktionsprozess mit der Technikumsanlage angepasst werden.

<u>Extraktionsparameter Labormaßstab:</u>

Lösungsmittel	n - Hexan
Extraktionstemperatur	Raumtemperatur (ca. 25°C)
Zellengröße	10 ml
Anzahl der Zyklen	5
Dauer eines Zyklus	10 min
Druck	100 bar (gerätebedingt)

4.4 Durchführung der Extraktion und Weiterverarbeitung im Technikumsmaßstab

Der für die Extraktion im Technikumsmaßstab verwendete einjährige Rainfarn wurde 2009 beim Biohof Oswald angebaut, geerntet, geschnitten und getrocknet. Die Trocknungstemperatur betrug 40°C. Die Lagerung erfolgte in Plastik- und Papiersäcken im

Lagerraum der JR am Ökopark in Hartberg. Die ersten Extraktionen wurden mit dem bereits geschnittenen Rainfarn ohne weitere Zerkleinerung durchgeführt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde für die nachfolgenden Extraktionen der bereits geschnittene Rainfarn in einer Retsch Schneidemühle (6 mm Sieb) weiter zerkleinert.

Die in den Laborversuchen (AP3) ermittelten optimalen Extraktionsbedingungen wurden in den Technikumsmaßstab überführt. Die Extraktionen wurden mit n-Hexan als Lösungsmittel bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Extraktionszeit betrug pro Extraktion zwei Stunden. Je Extraktion wurden 4 - 6 Zyklen mit frischem Lösungsmittel durchgeführt.

Der gewonnene Rohextrakt wurde mittels Entspannungsverdampfung aufkonzentriert (Verdampfung des Lösungsmittels im Lösungsmittelbehälter), am Rotationsverdampfer bei 40°C weiter eingeengt und in einem Vakuumtrockner bzw. unter Stickstoffgasstrom vollständig getrocknet.

Aus 1 kg Pflanzenmaterial (Trockensubstanz = TS) konnte eine Rohextraktmenge (TS) von ca. 10,8 g gewonnen werden (ca. 1% Ausbeute). Insgesamt wurden 75 kg (TS) Rainfarnkraut im Technikumsmaßstab extrahiert.

<u>Extraktionsparameter Technikumsmaßstab:</u>

Lösungsmittel	n - Hexan
Extraktionstemperatur	Raumtemperatur (ca. 25°C)
Zellengröße	10 L
Anzahl der Zyklen	4 - 6
Dauer eines Zyklus	ca. 20 – 25 min
Extraktionsdauer	2 h
Rohstoffeinwaage	2 kg
Druck	max. 2 bar

Mit Teilen des Pflanzenmaterials der Ernte 2008 wurde im Februar 2009 eine superkritische CO_2-Extraktion im Labormaßstab bei der Firma Natex GmbH (Ternitz, Niederösterreich) durchgeführt, da angenommen wurde, dass diese Technik Stoffe ähnlicher Polarität wie bei der Extraktion mit n-Hexan gewinnen lässt. Da bei diesem Prozess im Vergleich zur Fest-Flüssig-Extraktion kein Hantieren mit Lösungsmitteln notwendig ist und kein Lösungsmittel als Abfall anfällt, sollte sie als alternative Extraktionsmethode getestet werden. Im Anschluss wurde die Zusammensetzung dieses Extraktes mit den Hexanextrakten mittels HPLC/UV-DAD verglichen.

Abbildung 24: CO_2 – Forschungsextraktionsanlage 5l/1000 bar der Firma Natex (*Mit freundlicher Genehmigung der Natex GmbH*)

4.5 Begleitanalysen der Extrakte und weiterverarbeiteter Fraktionen mittels HPLC/UV-DAD

Durch HPLC-Fingerprint-Vergleichsanalysen können Aussagen über die konstante oder abweichende Zusammensetzung von Stoffgemischen (z.B. Pflanzenextrakte) gemacht werden. Es wird überprüft, ob die zu untersuchenden Proben unter Berücksichtigung der Trockensubstanzgehalte, dieselben Inhaltsstoffmuster (Anzahl, Fläche und Form der Peaks) besitzen. Um möglichst alle Inhaltsstoffe einer Probe erfassen zu können, wird mit Hilfe des verwendeten Lösungsmittel-Gradientensystems ein möglichst breites Polaritätsspektrum aufgezeichnet. Durch den Vergleich der Fingerprint-Chromatogramme können eventuelle Qualitätsveränderungen (Zusammensetzung, Oxidation, usw.) über die einzelnen Prozessschritte hinweg, erkannt werden.

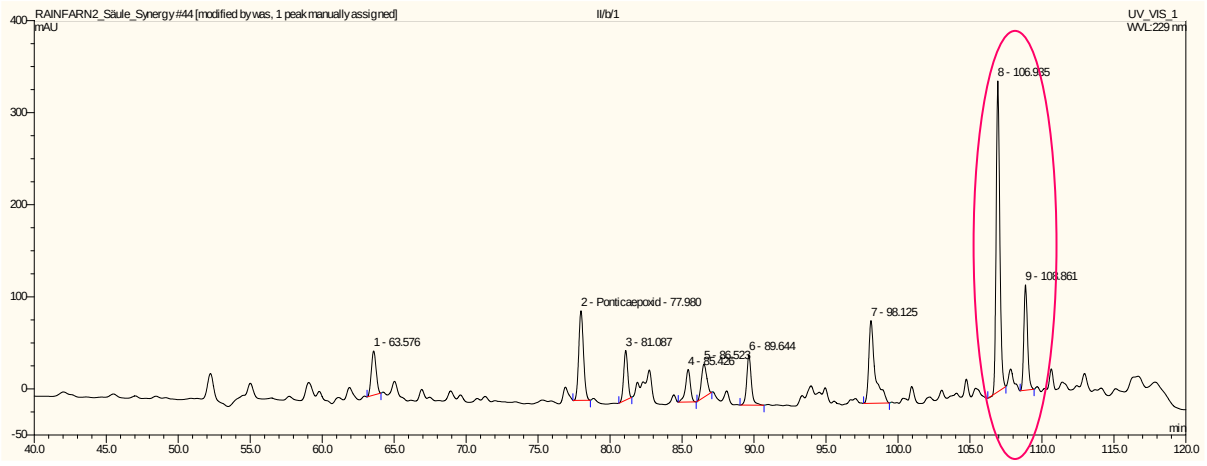

Abbildung 25: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm der Probe II/b/1 2008 (zweijähriger Bestand/Probepunkt)

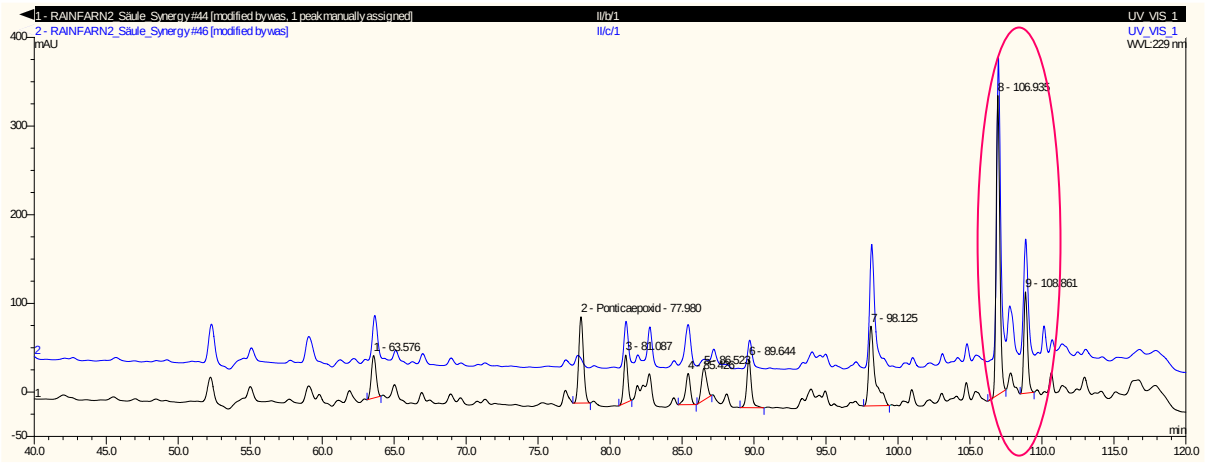

Abbildung 26: Vergleich der beiden HPLC/UV-DAD – Chromatogramme der beiden Proben II/b/1 (untere Kurve) und II/c/1 (obere Kurve) zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten 2008

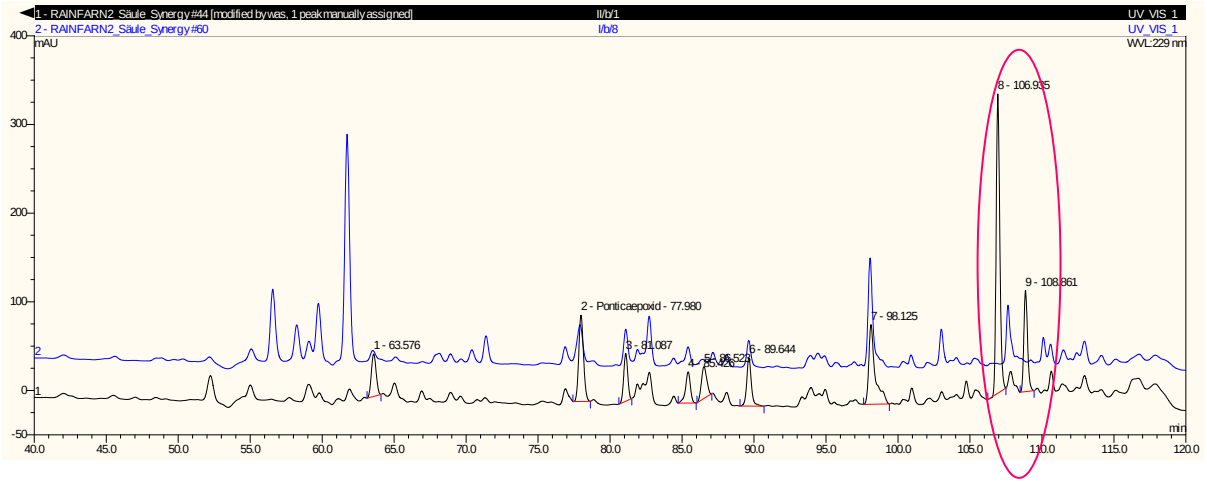

Abbildung 27: Vergleich der beiden HPLC/UV-DAD – Chromatogramme der beiden Proben II/b/1(zweijährig, untere Kurve) und I/b/8 (einjährig, obere Kurve) 2008

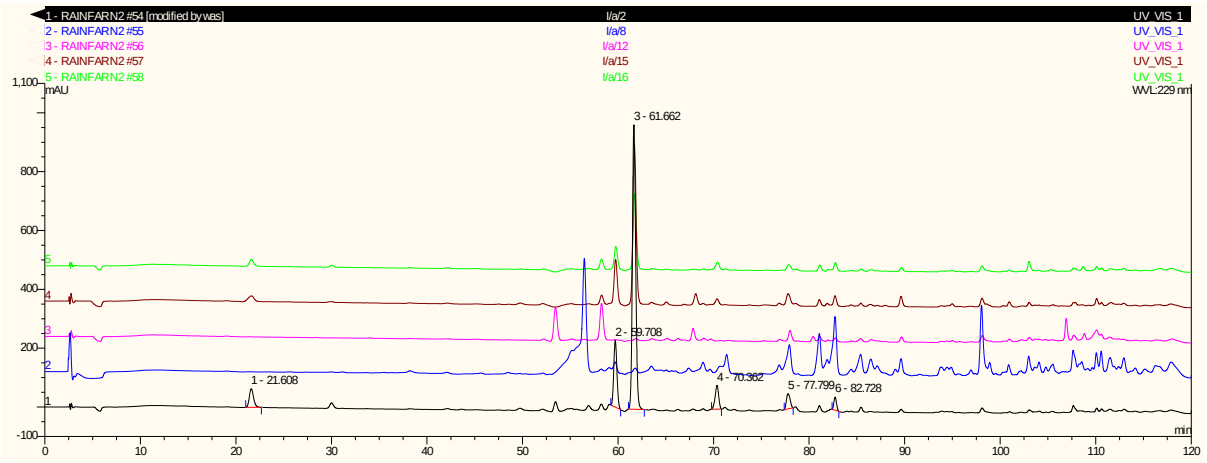

Abbildung 28: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm - Vergleich von unterschiedlichen Probennahmepunkten desselben Standortes und Erntezeitpunktes 2008

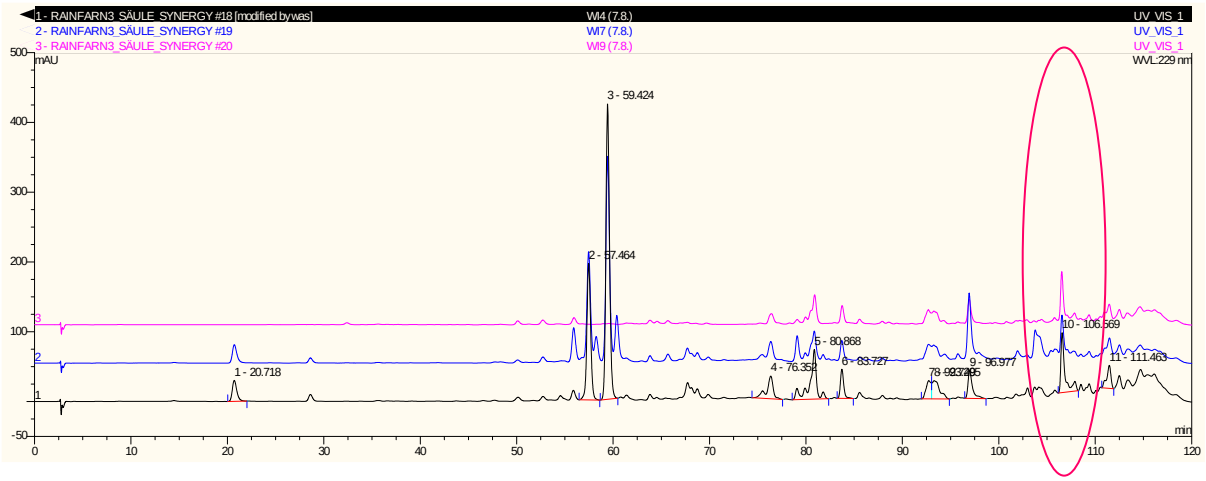

Abbildung 29: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm - Vergleich des einjährigen Bestandes am Biogemüsehof Wressnig am 07.08.2009 an unterschiedlichen Probennahmepunkten

Die Abbildungen zeigen, dass auch Proben desselben Standortes sehr stark in ihrer qualitativen Zusammensetzung schwanken können. Dies ist auf sämtliche Einflüsse bei Probennahme (Pflanzenteil), Extraktion und Trocknung (Flüchtigkeit der Stoffe) zurückzuführen. Es ist bekannt, dass vor allem stark flüchtige Inhaltsstoffe auch in den unterschiedlichen Pflanzenteilen einer einzelnen Pflanze sehr stark variieren können. Diese Trends lassen sich zumindest für die Hauptinhaltsstoffe ablesen.

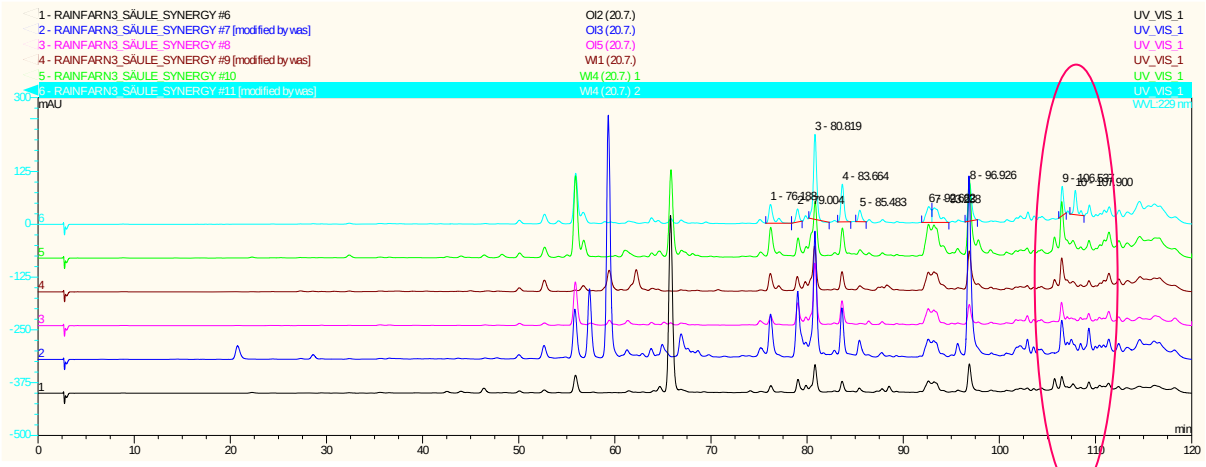

Abbildung 30: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm – Vergleich des einjährigen Bestandes am Biogemüsehof Wressnig und Biohof Oswald am 20.07.2009 an unterschiedlichen Probepunkten

Für eine genaue Identifizierung einzelner Inhaltsstoffe müssten diese einzeln aufgetrennt und im Anschluss isoliert werden. Dies erfolgte durch den Projektpartner (Universität Wien) im AP 6 für die für die Repellentwirkung verantwortlichen Inhaltsstoffe (Retentionszeit 100 – 110 Minuten → Markierung roter Kreis).

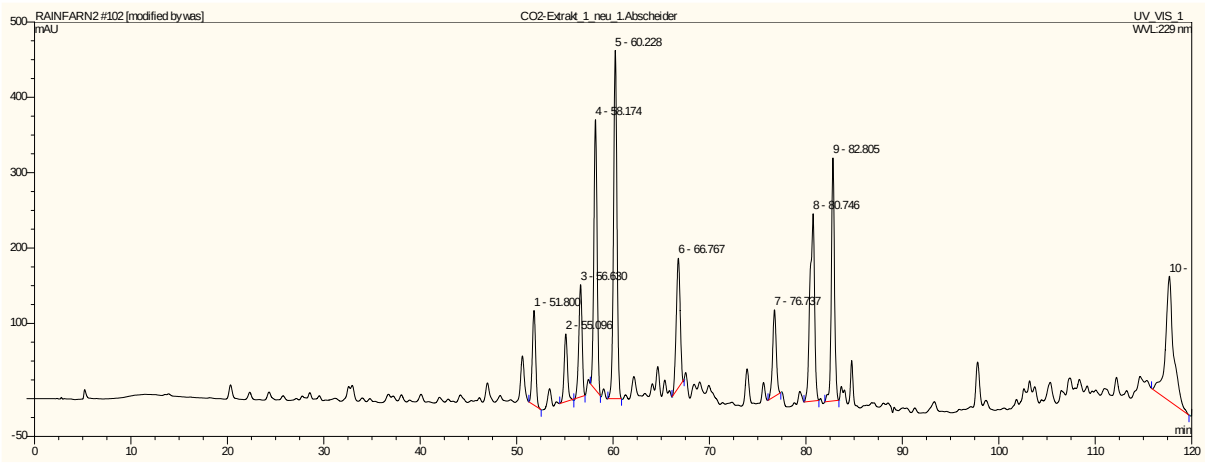

Abbildung 31: Chromatogramm des CO_2 - Extraktes

Die Abbildung 31 zeigt, dass die Zusammensetzung des CO_2-Extraktes, der von der Firma Natex hergestellt wurde, deutlich von den n-Hexanextrakten abweicht, weil die Inhaltsstoffe wesentlich polarer sind und die im AP 6 für die Wirkung verantwortlichen isolierten Stoffe nicht oder nur in geringen Mengen enthalten sind.

4.6 Präparative Isolierung der aktiven Hauptinhaltsstoffe im Milligrammbereich und Strukturaufklärung

Bereits bei der ersten Fraktionierung des Rohextraktes zeigte sich, dass die Auftrennung der repellent wirksamen Stoffe aufgrund der Ähnlichkeiten dieser Substanzen nicht zur gängigen Routineanalytik zählt. Bei der ersten Fraktionierung über eine Kieselgelsäule unter Normaldruck wurden folgende Fraktionen erhalten:

Fraktion	Ausbeute [mg]	Konsistenz
I/1	5,4	ölig, farblos
I/2	355,4	ölig, farblos
II/1	34,8	ölig, farblos
II/2	19,8	ölig, gelblich
III/1	53,0	ölig, gelb
III/2	20,4	ölig, gelborange
IV/1	57,2	ölig, gelb
IV/2	83,9	ölig, gelb
V/1	305,4	ölig, gelb
V/2	302,1	ölig, grün
VI/1	127,6	ölig, grün
VI/2	151,4	ölig, grün
VII	31,8	ölig, grün

Tabelle 6: Bei der Fraktionierung mit Kieselgel erhaltene Fraktionen

Die grünliche Färbung in den Fraktionen V bis VII wurde vor allem durch Chlorophyll hervorgerufen. Fraktion IV/2 (fett markiert) enthielt die aktiven Substanzen, die im HPLC/UV-DAD-Chromatogramm abgebildet sind (siehe Abbildung 32).

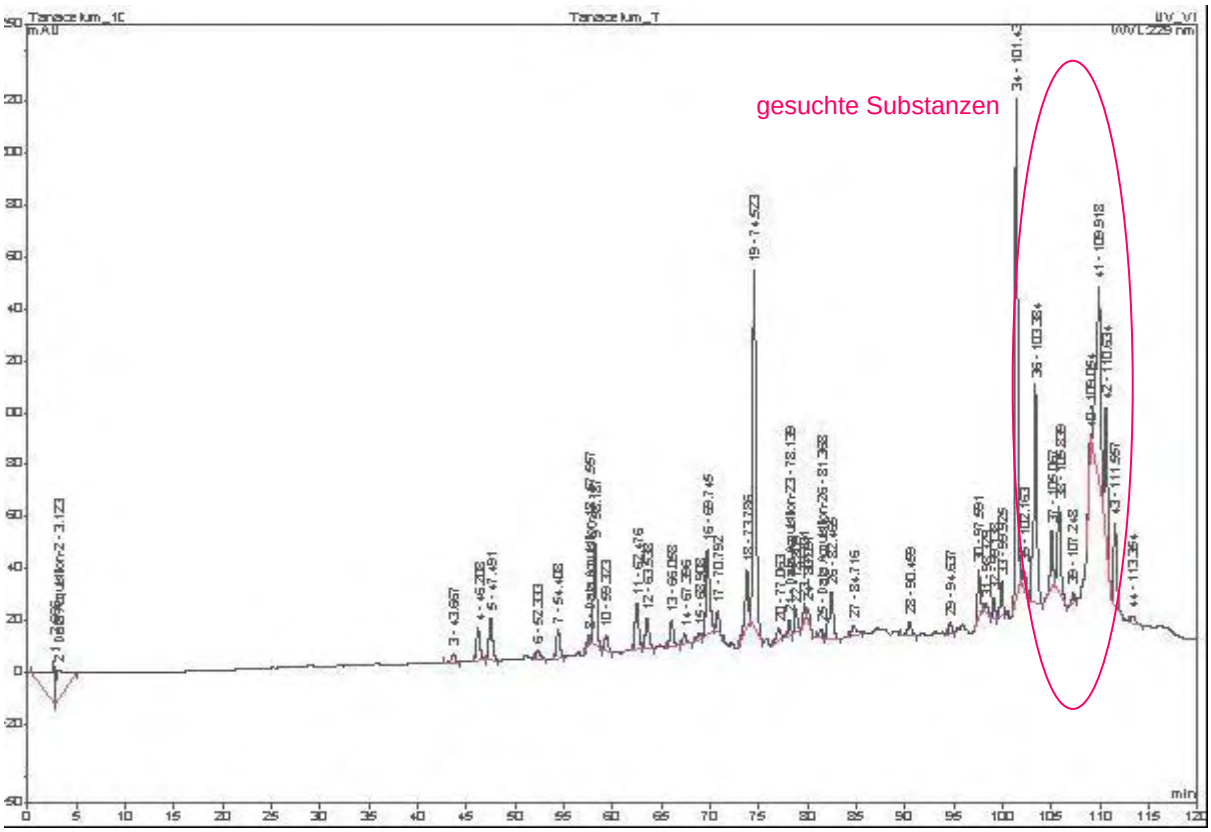

Abbildung 32: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm der Fraktion IV/2

Die Reindarstellung der in Abbildung 32 gekennzeichneten Substanzen wurde mit einem präparativen MPLC-System durchgeführt. Als Trennsäule diente eine Glassäule (400 x 40 mm), die mit Kieselgel Si 60 von Merck (Lichroprep, 25-40 µm) gefüllt war. Als Elutionsmittel wurde zunächst 5% Ethylacetat (in n-Hexan), danach 10% Ethylacetat (in n-Hexan) verwendet und das UV-Spektren bei 254 nm aufgezeichnet. In den Fraktionen 10 und 11 konnte nach erfolgter HPLC/UV-DAD-Analyse die gesuchten Substanzen identifiziert werden (siehe Abbildung 33).

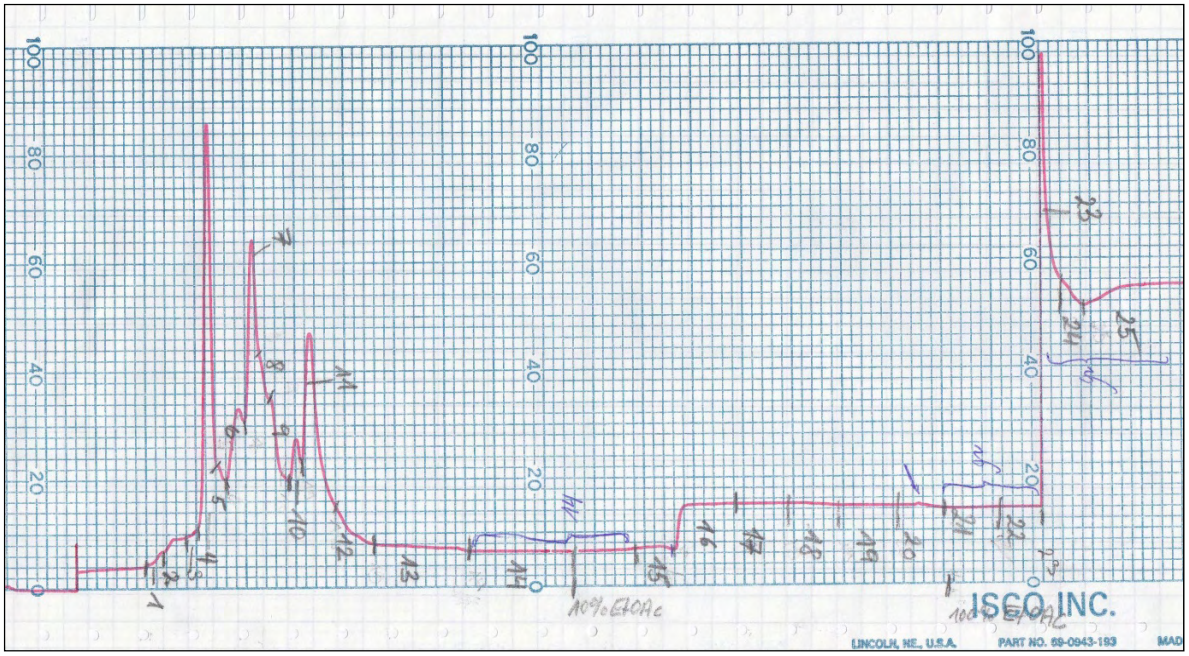

Abbildung 33: MPLC - Auftrennung der Fraktion IV/2

Zur Identifikation derjenigen Fraktion(en), die die gesuchte Substanz in ausreichend reiner Form enthielt(en), wurde von allen Fraktionen wiederum eine dünnschichtchromatographische Trennung durchgeführt.

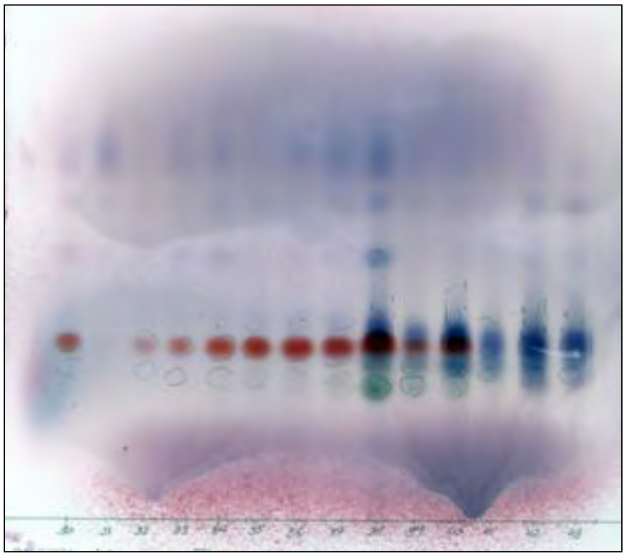

Abbildung 34: Dünnschichtchromatogramm der Fraktionen 30 - 43

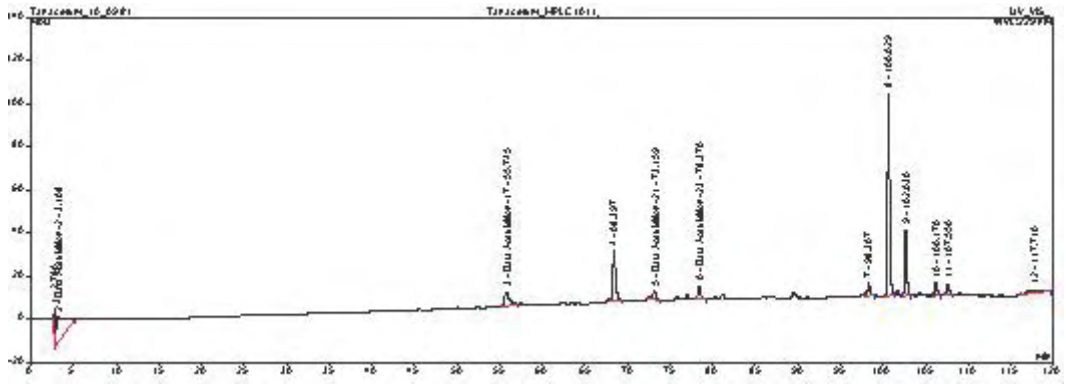

Abbildung 35: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm der Fraktion 38

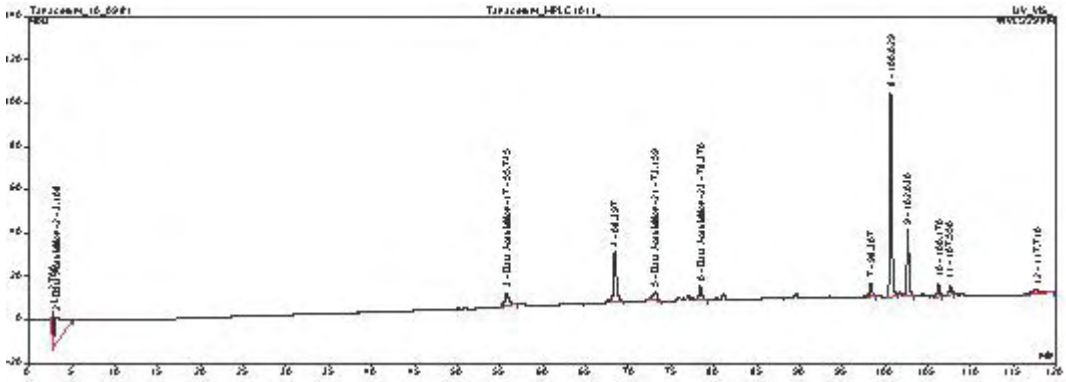

Abbildung 36: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm der Fraktion 39

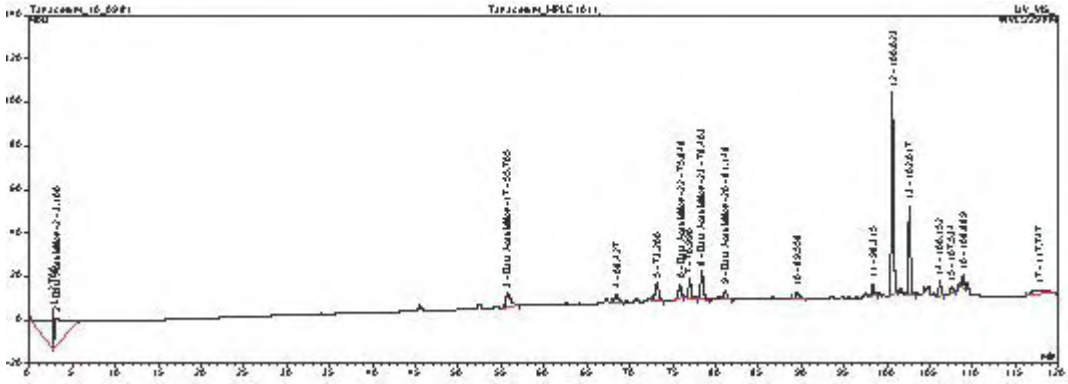

Abbildung 37: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm der Fraktion 40

Für die Fraktionen 38 bis 40 wurden am Institut für Organische Chemie der Universität Wien zur Strukturaufklärung NMR – Analysen durchgeführt. Ein Vergleich mit der ^{13}C Datenbank „C-Search“ ergab folgenden Strukturvorschlag:

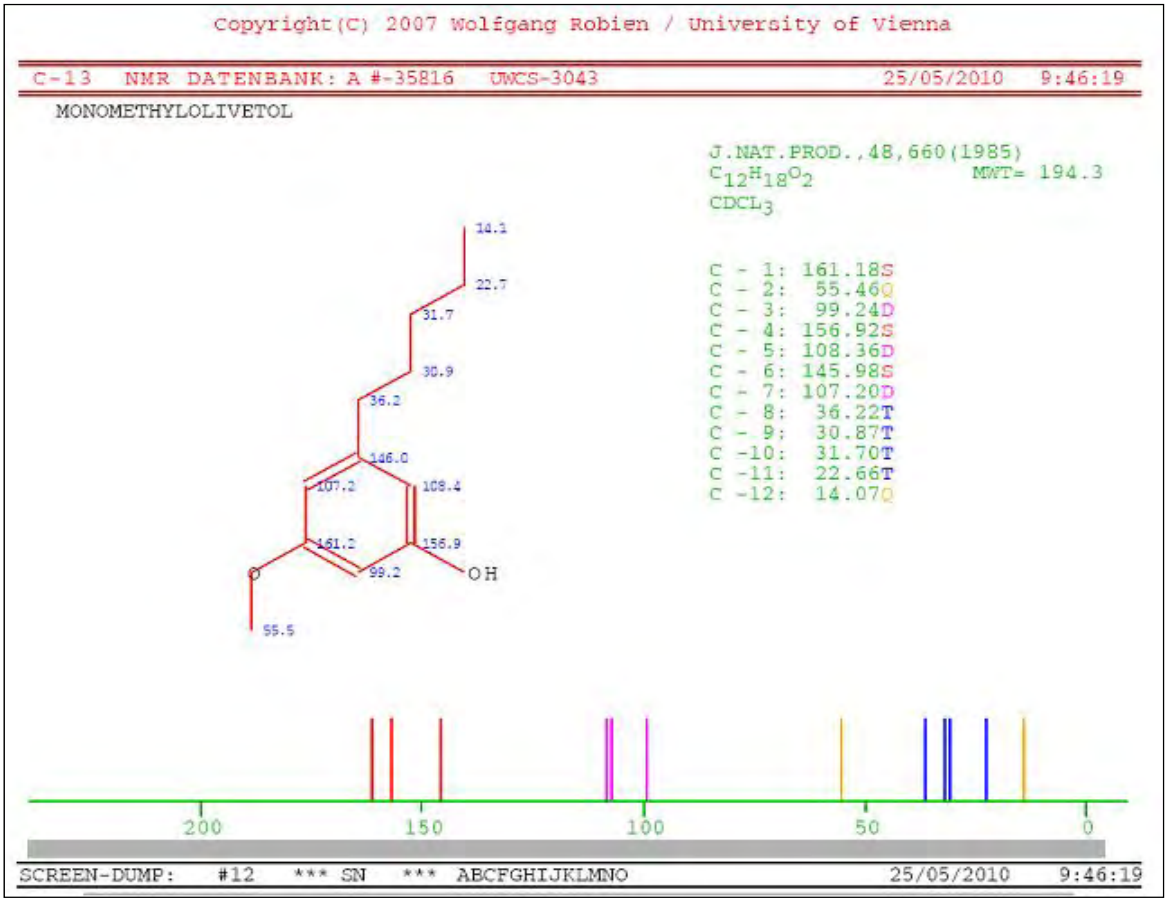

Abbildung 38: Strukturvorschlag

Bis auf die eindeutige Länge der Seitenkette konnte die Struktur auch massenspektroskopisch bestätigt werden. Die Tatsache, dass keine Reinsubstanz sondern ein Gemisch aus der abgebildeten Struktur mit einem Derivat mit einer kürzeren Seitenkette vorlag, das sich aufgrund der Ähnlichkeiten nicht weiter auftrennen ließ, erschwerte die vollständige Strukturaufklärung. Eine endgültige Abklärung könnte erst durch Spektrenvergleiche mit synthetischen Substanzen ermöglicht werden.

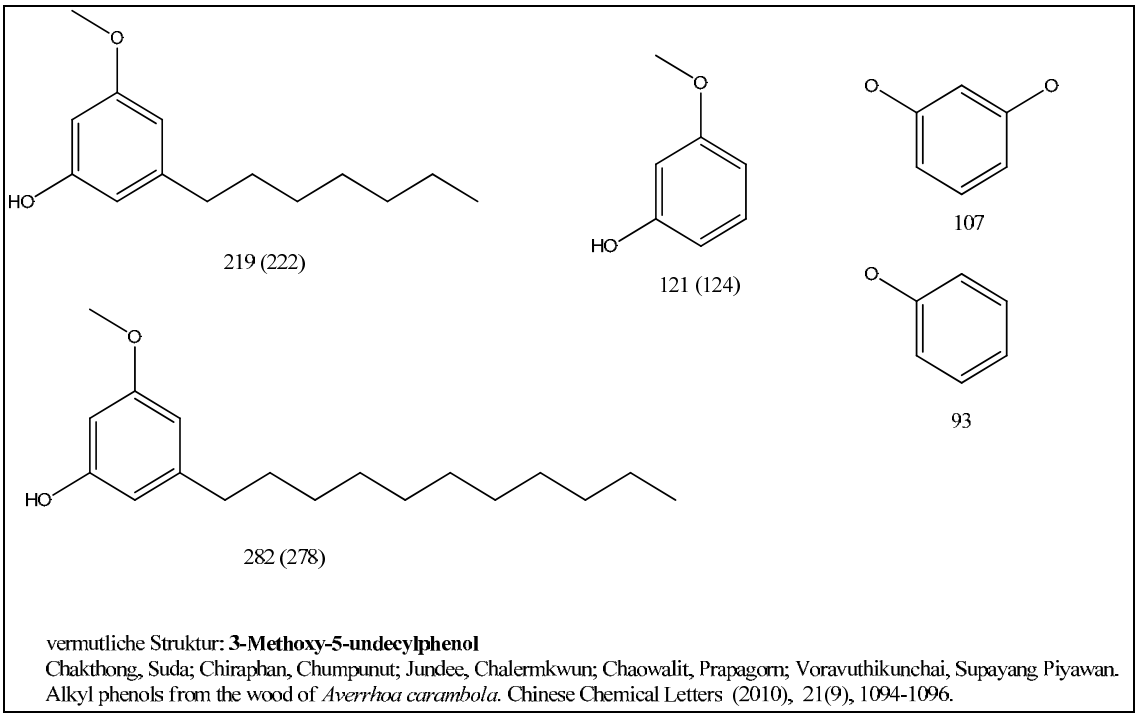

Abbildung 39: Mögliche Struktur der aktive Verbindung

Diese Struktur gehört zur Stoffklasse der Resorcinole und wurde erst kürzlich aus dem Holz des Karambolenbaums beschrieben. Der unpolare Charakter erlaubt anzunehmen, dass die Substanz leicht Membranen wie die Kutikeln von Raupen passieren kann. Die daraus resultierende oberflächenirritierende Wirkung könnte die in Laborexperimenten erhaltene repellente Wirkung auf Apfelwicklerlarven erklären.

Das Verhalten bei der Auftrennung weist auch auf eine relative hohe Instabilität der Verbindung hin, in der Mischung, wie sie in der Pflanze vorliegt, scheint jedoch eine gewisse Stabilität gegeben zu sein.

4.7 Spritzmittelformulierung

Spritzmittelformulierungen setzen sich aus Wirkstoffen und Beistoffen (Formulierungshilfsstoffe) zusammen. Beistoffe fungieren unter anderem als Netz- und Haftmittel, Emulgatoren, Frostschutzmittel, Verdickungsmittel, Stabilisatoren usw.. Eine definierte Zusammensetzung von Wirkstoffen und Beistoffen nennt man Formulierung.

Für die Entwicklung einer geeigneten Spritzmittelformulierung für den lipophilen Rainfarnextrakt wurde eine Vielzahl an Emulgatoren, die zum Teil auch Einsatz in naturkosmetischen Formulierungen finden, auf deren Emulgierfähigkeit getestet. In Bezug auf die Emulgierfähigkeit konnte im Vergleich zu synthetischen Emulgatoren noch kein gleichwertiger biologischer Emulgator gefunden werden. Es wurden jedoch bereits mögliche

Emulgatoren/Emulgatorengruppen gefunden, die in weiteren Tests in Bezug auf die Einsatzkonzentration sowie eine mögliche Mischung einzelner Emulgatoren zur Verbesserung der Emulgierfähigkeit untersucht wurden.
Als Lösungsmittel für den Pflanzenrohextrakt wurden Orangenterpene (Fraktion aus dem ätherischen Orangenöl) und fette Öle (high oleic Sonnenblumenöl, Rapsöl) ausgetestet. Beide Lösungsmitteltypen scheinen geeignet für die Lösung des lipophilen Wirkstoffes.

Ausgetestete Emulgatoren:

- Reinlecithin (Soja)

  Auf pflanzlichen Ölen basierender amphoterer Misch- und Wasser-in-Öl-Emulgator (W/O), HLB: 7, für die ökologische Landwirtschaft zugelassen, Reinlecithin hat sowohl eine emulgierende als auch eine fungizide Wirkung (abhängig von der Einsatzkonzentration)

  Der HLB-Wert (engl.: hydrophilic-lipophilic-balance) beschreibt den hydrophilen und lipophilen Anteil hauptsächlich von nichtionischen Tensiden.
- Genapol UD 080 (Undeceth-8, Fettalkoholpolyglykolether)

  Nichtionisches Tensid für Kaltanwendungen, HLB: 13, chemisch hergestellt, Fa. Clariant
- Tensoprot MS 2

  Proteinbasierender, natürlicher Öl-in-Wasser-Emulgator (O/W), HLB nicht bekannt, laut Hersteller für landwirtschaftliche Anwendungen geeignet, Fa. Novaprot
- Kaliseife (Schmierseife)

  Auf pflanzlichen Ölen basierendes natürliches Tensid, HLB nicht bekannt, für die ökologische Landwirtschaft zugelassen, Schmierseife hat sowohl eine emulgierende, als auch eine insektizide und fungizide Wirkung (abhängig von der Einsatzkonzentration).
- Tego Emulprot

  Milchbasierender, natürlicher O/W-Emulgator, HLB: ca. 9, für Naturkosmetik geeignet, Fa. Degussa
- Sisterna SP50-C (Sucrose Stearate)

  Auf natürlichen Rohstoffen basierender O/W-Emulgator, HLB: ca. 11, für Naturkosmetik geeignet, Fa. Sisterna
- Glucopon 650 EC

  Auf natürlichen Rohstoffen basierendes nichtionisches Zuckertensid, für Naturkosmetik geeignet, Fa. Cognis

Entwickelte Spritzmittelformulierung für die Freilandversuche:

Wirkstoff (Rainfarnextrakt)	15,0%
n-Hexan	2,5%
Rapsöl	32,5%
Glucopon 650 EC	5,0%
Schmierseife	10,0%
Glycerin	2,0%
1%-ige Tensoprot MS2 Lösung in Wasser	33,0%

Zusätzlich zur Formulierung mit Wirkstoff wurde eine Formulierung ohne Wirkstoff zur Bestimmung des Blindwertes für die Freilandversuche bereitgestellt.

Formulierung ohne Wirkstoff (Blindwert):

Wirkstoff (Rainfarnextrakt)	0,0%
n-Hexan	2,5%
Rapsöl	40,0%
Glucopon 650 EC	5,0%
Schmierseife	10,0%
Glycerin	2,0%
1%-ige Tensoprot MS2 Lösung in Wasser	40,5%

Abbildung 40: Spritzmittelformulierungen mit und ohne Wirkstoff

4.8 Präparative Isolierung der aktiven Hauptfraktionen im Grammbereich

Folgende Ausbeuten wurden von den einzelnen Fraktionen erhalten:

Fraktion 1: 4,49 g

Fraktion 2: 0,08 g

Fraktion 3: 12,54 g

Fraktion 4: 19,87 g

Fraktion 5: 17,20 g

Fraktion 6: 4,98 g

Fraktion 7: 3,38 g

Die Fraktionen 3 – 7 (Fraktion 1 war reines Fett und Fraktion 2 zu geringe Ausbeute) wurden zu Spritzmitteln formuliert und werden in weiteren diagnostischen Laborversuchen aufgrund des aufwändigen Versuchsaufbaus außerhalb des Projektrahmens getestet.

Abbildung 41: Spritzmittelformulierungen der einzelnen Fraktionen (+ Blindwert)

4.9 Freilandversuche in einer Apfelkultur und diagnostische Laborversuche mit dem Gesamtextrakt

Freilandversuche:

Die erste Auswertung der Ergebnisse vom 12. Juli 2010 stellt das Resultat nach dem Befall der Apfelbestände mit der ersten Generation der Apfelwickler dar. Demnach lag die Wirkung des Rainfarnextraktes mit der höheren Dosierung „Rainfarn 400“ (0,4%) in einem ähnlichen Bereich wie die der herkömmlich verwendeten synthetischen oder biotechnologisch

hergestellten Spritzmittel. Bei der niedrigeren Dosierung „Rainfarn 100“ (0,1 %) war keine Wirkung festzustellen. Die Befallsrate war mit der unbehandelten Kontrolle vergleichbar. Die Spritzmittelformulierung ohne Extrakt (Versuchsprodukt) hat keine Wirkung gezeigt (Abbildung 42).

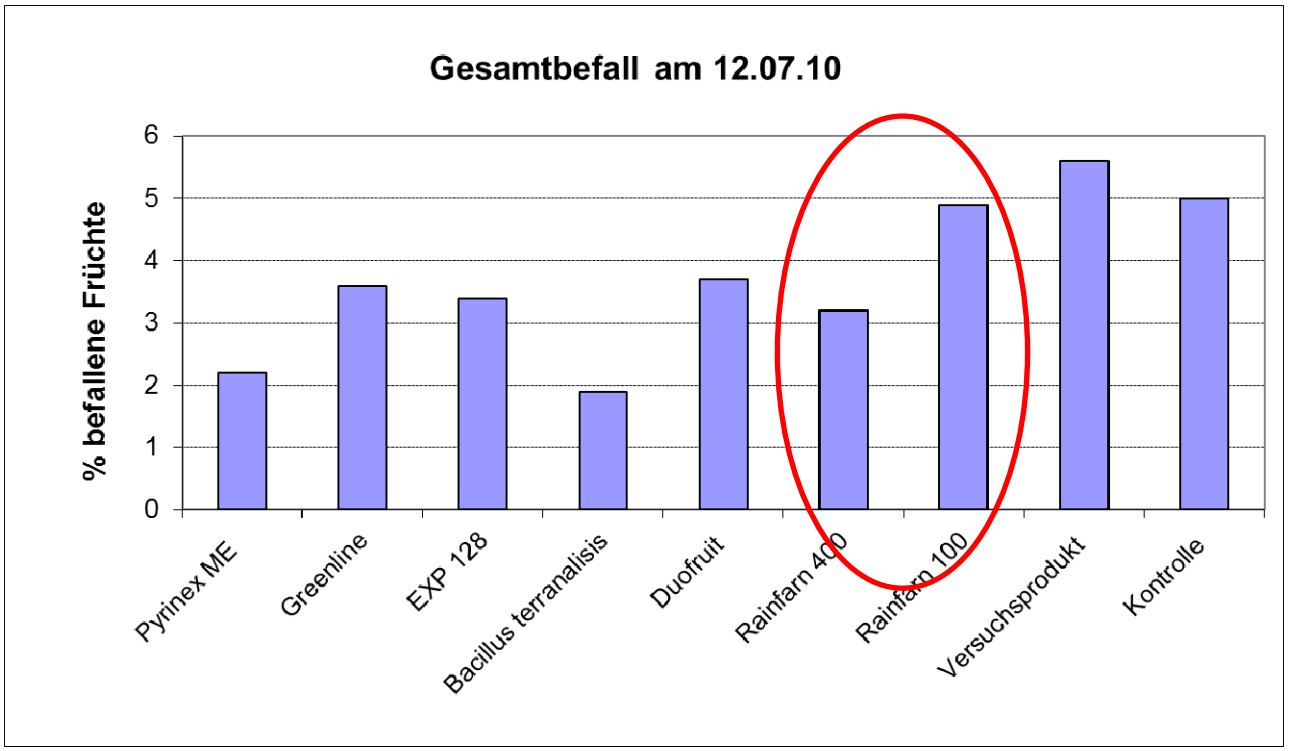

Abbildung 42: Vergleich der Spritzmittel im Gesamtbefall der Äpfel mit der Obstmade der 1. Generation

Die Endauswertung am Ende der Saison zeigte jedoch ein etwas anderes Bild. Die Anwendung des Rainfarnextraktes in der niedrigeren Dosis „Rainfarn 100“ wie auch die reine Spritzmittelformulierung ohne Extrakt bewirkte nur unwesentlich weniger Befall als die unbehandelte Kontrolle. Bei Anwendung der höheren Dosis „Rainfarn 400“ war die Wirkung etwas verbessert, aber noch immer zu gering (Abbildung 43).

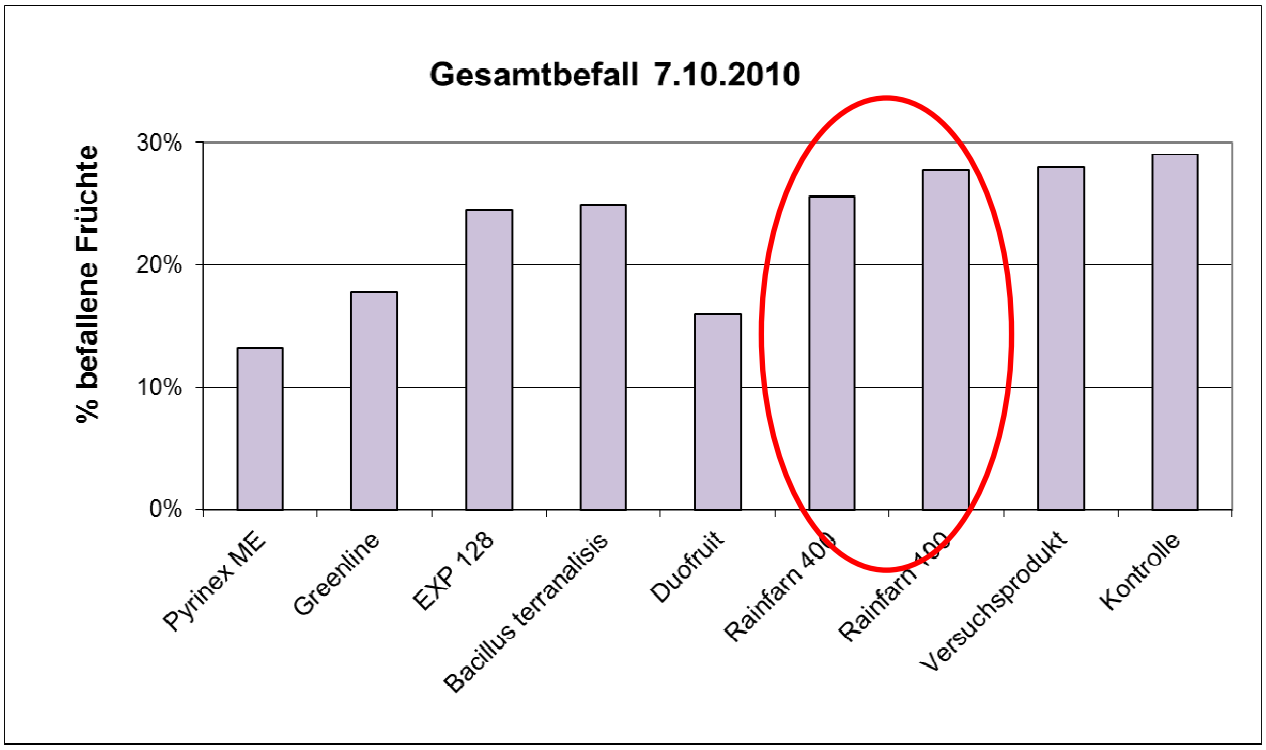

Abbildung 43: Vergleich der Spritzmittel im Gesamtbefall der Äpfel mit der Obstmade des gesamten Beobachtungszeitraumes

Betrachtet man den Anteil der abgestoppten Obstmaden, d.h. die Larven haben sich eingebohrt jedoch nicht weiterentwickelt, lag der Rainfarnextrakt mit der höheren Dosierung „Rainfarn 400“ im Bereich der Kontrolle, die niedrige Dosierung „Rainfarn 100“ in der Wirkung etwas darunter (Abbildung 44). Der Schädlingsdruck vermindert sich somit für die nächste Generation. Auch die Auswertung der ausgewanderten Larven verhält sich ähnlich, wobei beide Dosierungen unter der Kontrollvariante lagen (Abbildung 45). Dies bedeutet, dass die Äpfel verwurmt waren und die Larven sich weiterentwickeln konnten.

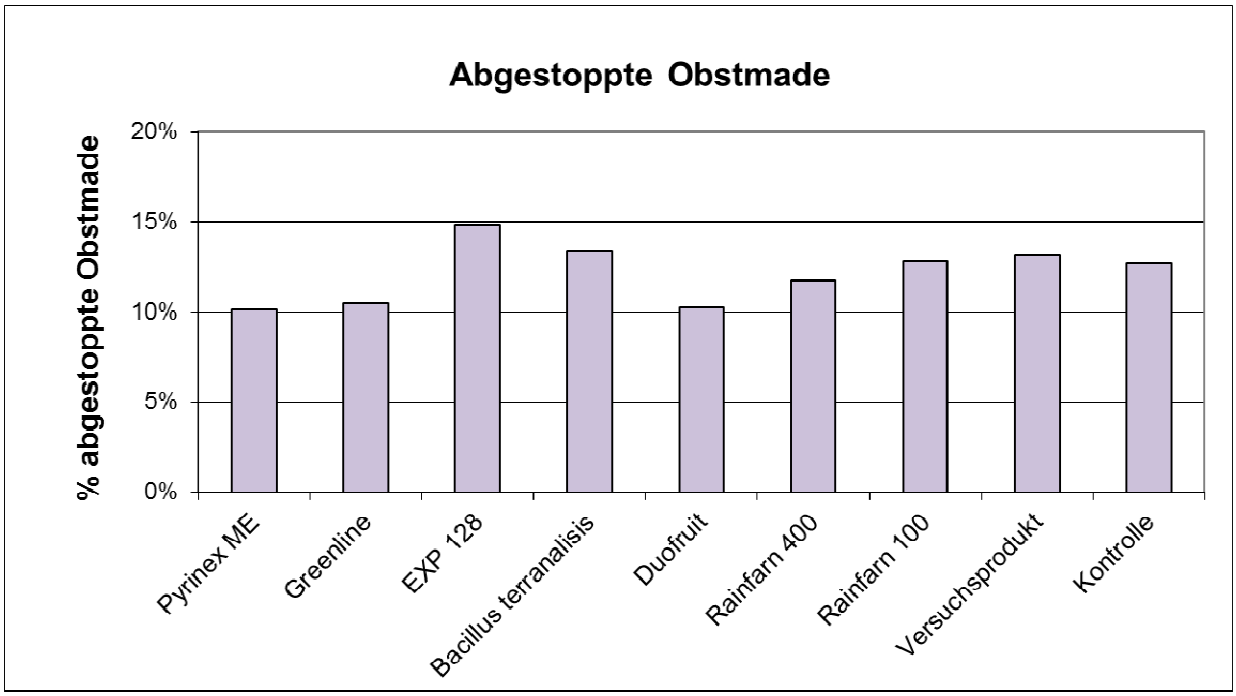

Abbildung 44: Prozentueller Anteil der abgestoppten Obstmaden bei den unterschiedlichen Anwendungen

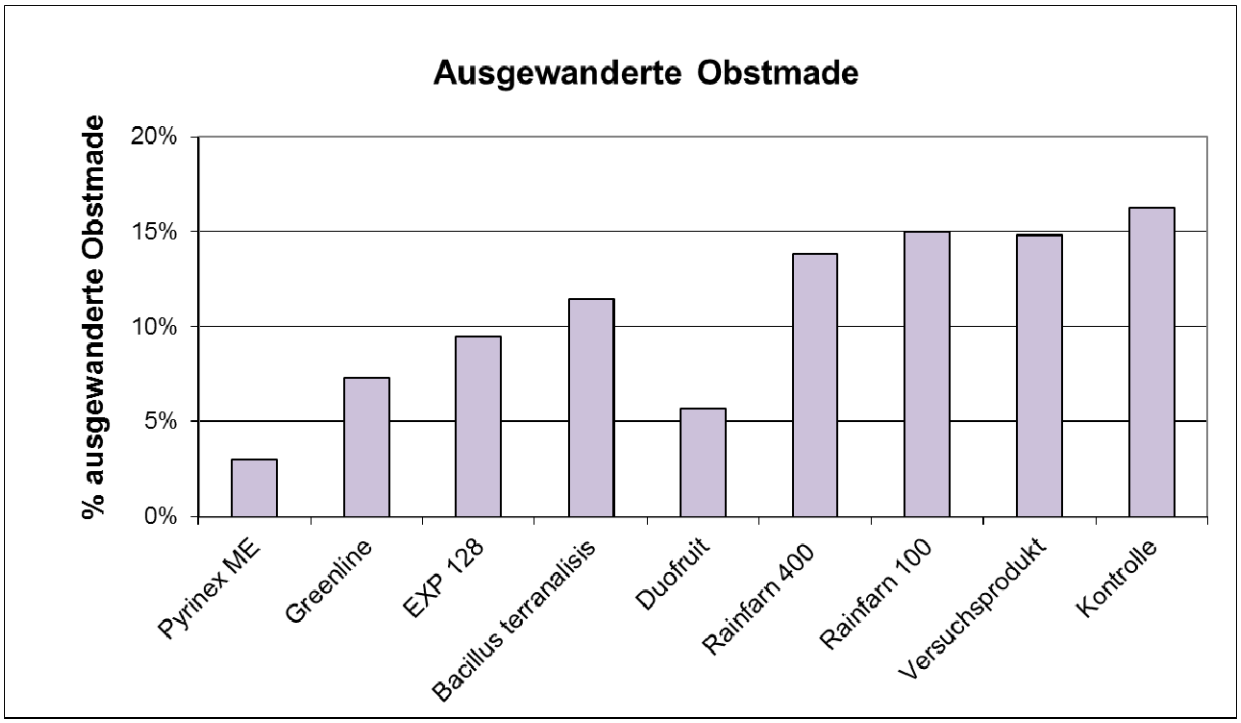

Abbildung 45: Prozentueller Anteil der ausgewanderten Obstmaden bei den unterschiedlichen Anwendungen

Für die Rainfarnextrakte konnte eine Wirkung gegen den Apfelwickler nachgewiesen werden, wobei die höhere Dosierung (0,4%) zu besseren Resultaten führte als die niedrigere Konzentration (0,1 %). Bei der Auswertung des Befallsgrades der Äpfel im Sommer nach der 1. Apfelwicklergeneration wurden Ergebnisse, die im Bereich der konventionellen Spritzmittel

liegen, erreicht. Die Gesamtwirkung bis zum Ende der Saison hat aber abgenommen, sodass im Herbst ein zu großer Apfelwicklerbefall vorlag und die Wirkung in den angewandten Dosierungen als zu gering bezeichnet werden muss.
Die genauen Ursachen der Abnahme der Aktivität müssen noch näher untersucht werden, möglicherweise sind kürzere Anwendungsintervalle des Spritzmittels anzusetzen.

Diagnostische Laborversuche:

Auch in den diagnostischen Laborversuchen zeigte die höchste Extraktkonzentration die besten Ergebnisse in Bezug auf die Einbohrungen der Apfelwicklerlarven. Dies gilt sowohl für den Versuch im Glashaus mit behandelten und unbehandelten Apfelhälften als auch im Feldversuch beim Vergleich ganzer behandelter und unbehandelter Äpfel. Bei 0,1% Konzentration konnte nur mehr im Glashaus, bei einer Konzentration von 0,04% keine Wirkung mehr beobachtet werden.

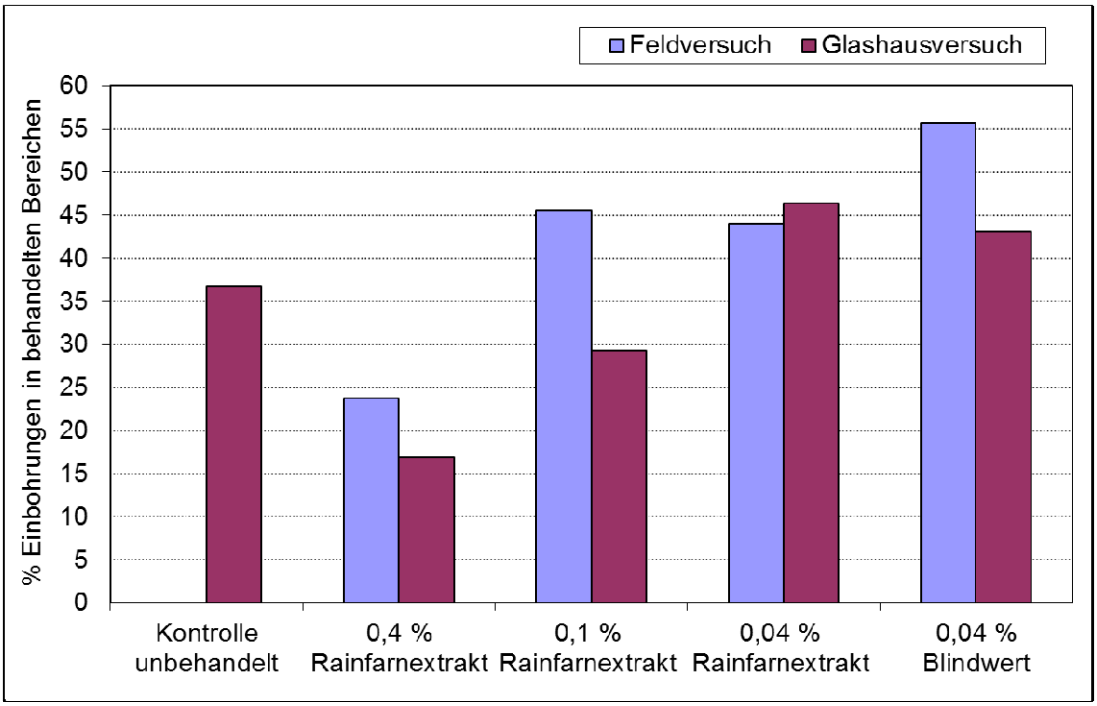

Abbildung 46: Wirkung verschiedener Konzentrationen des Rainfarnextraktes in den diagnostischen Laborversuchen im Feldversuch und Glashaus

5 Detailangaben in Bezug auf die Ziele der Programmlinie

5.1 Einpassung in die Programmlinie und Beiträge zu den Gesamtzielen

Die Aufgabenstellungen und Ergebnisse im Projekt entsprechen in ihrer grundlegenden Ausrichtung dem Förderprogramm „Fabrik der Zukunft“ des BMVIT und decken mit ihren Inhalten das Themenfeld 1 „Nutzung nachwachsender Rohstoffe“ gut ab. Die im Projekt durchgeführten Untersuchungen zum Einsatz eines nachwachsenden Rohstoffes als Repellent in der Landwirtschaft gegen den Apfelwickler entsprechen den Zielen einer nachhaltigen Entwicklung und stellen einen Beitrag zu den in der Programmlinie „Fabrik der Zukunft“ angestrebten Innovationssprüngen im Bereich der Nutzung nachwachsender Rohstoffe dar.

Das Projekt leistet folgende Beiträge an die Leitprinzipien einer Nachhaltigen Technologieentwicklung:

- Prinzip der Dienstleistungs-, Service- und Nutzenorientierung

  Die Inhalte und Ziele des Projektes entsprechen in ihrer grundsätzlichen Ausrichtung dem Prinzip der Dienstleistungs-, Service- und Nutzenorientierung, wobei hier insbesondere die Nutzenorientierung argumentiert wird. Im Vordergrund der Projektentwicklungen stehen nicht primär Vermarktungsüberlegungen, sondern die Zielsetzung durch den Ersatz synthetisch hergestellter Repellents oder Insektizide in der Landwirtschaft zu einer ökologisch verträglicheren Wirtschaftsweise sowohl im biologischem als auch im konventionellen Landbau zu finden. Der nachwachsende Rohstoff bzw. seine Inhaltsstoffe soll als Rohstoffersatz des derzeit eingesetzten Rohstoffes unter Berücksichtigung ökologischer und umweltverträglicher Parameter dienen.

- Prinzip der Nutzung erneuerbarer Ressourcen

  Im Mittelpunkt des Projektes steht die Nutzung von Rainfarn - einer erneuerbaren Ressource. Rainfarn bzw. seine Inhaltsstoffe werden als Pflanzenschutzmittel noch nicht eingesetzt. Die Erkenntnisse aus dem Projekt stellen somit einen weiteren Impuls für eine neue innovative stoffliche Anwendung im Gegensatz zu den bereits „etablierten“ nachwachsenden Rohstoffen wie Holz, Stärke, Fette etc. dar.

- Effizienzprinzip

Neben den zuvor bereits erwähnten ökologischen Effizienzparametern der Projektinhalte, welche natürlich auch Energie- und Materialeffizienz in der Gewinnung des Repellents zum Ziel haben, zielen die Entwicklungen im Rahmen des Projektes darauf ab, möglichst kosteneffizient zu sein. Sowohl seitens der Hersteller des Rohstoffs Rainfarn (Landwirte) als auch der Anwender der Insektizide (Landwirte) kann dies als Erfolgsfaktor für künftige neue Produktlinien in diesem Bereich gesehen werden. Durch deren Einbindung in das Projekt, war von Anfang an gewährleistet, dass sich dieses Effizienzprinzip in allen Bereichen wiederfindet.

- Prinzip der Rezyklierungsfähigkeit

  Die Nutzung des nachwachsenden Rohstoffs Rainfarn als Ersatz für synthetische Insektizide entspricht dem Gedanken der Nachhaltigkeit und Kreislaufwirtschaft. Eine Rezyklierungsfähigkeit für Repellents bzw. Insektizide im Zusammenhang mit der üblichen Anwendungsform ist in dieser Form nicht argumentierbar.

- Prinzip der Einpassung, Flexibilität, Adaptionsfähigkeit und Lernfähigkeit

  Die regionale Verfügbarkeit des verwendeten nachwachsenden Rohstoffs und dessen Einsatz im Obstbau stellen eine perfekte Einpassung an regionale Rahmenbedingungen dar. Gleichzeitig knüpft die Nutzung von Pflanzenextrakten als Pflanzenschutzmittel im Obstbau an neue Entwicklungen im Bereich des Pflanzenschutzes an.

- Prinzip der Fehlertoleranz und Risikovorsorge

  Bezugnehmend auf die Definition dieses Prinzips im Leitfaden der 5. Ausschreibung der Programmlinie „Fabrik der Zukunft“ wird die Fehlertoleranz durch die Berücksichtigung ökologischer und umweltverträglicher Parameter in der Produktion des Rohextraktes so weit wie möglich sichergestellt.

- Prinzip der Sicherung von Arbeit, Einkommen und Lebensqualität

  Die Ergebnisse aus dem Projekt könnten nach einer erfolgten Vermarktung und Zulassung insbesondere von Landwirten zum Ersatz synthetischer Insektizide genutzt werden. Vor allem im Biolandbau wäre ein Einsatz eines Insektizids auf pflanzlicher Basis leichter argumentierbar. Dies entspricht auch der ständig steigenden Nachfrage der Konsumenten an biologischen Lebensmitteln und ihrer möglichst schadstofffreien Herstellung und Bearbeitung. Darüber hinaus bietet der Anbau von Rainfarn mit einer nachfolgenden Anwendung als Repellent neue Perspektiven für landwirtschaftliche Betriebe. Damit verbunden ist eine wirtschaftliche Stärkung strukturarmer ländlicher Regionen. Insgesamt gesehen ist die verstärkte Nutzung nachwachsender Rohstoffe primäres Anliegen der Energie-, Wirtschafts- und Umweltpolitik Österreichs. Mit dem

verstärkten Einsatz nachwachsender Rohstoffe in unterschiedlichsten Bereichen, werden Chancen für die heimische Wirtschaft geschaffen, da bei der Nutzung erneuerbarer Ressourcen vor allem in der Region ansässige Betriebe tätig sein können. Dies bedeutet eine Stärkung der regionalen Wirtschaftskraft durch Sicherung regionaler Arbeitsplätze und damit verbunden der Lebensqualität.

5.2 Einbeziehung der Zielgruppen

Die intensive Zusammenarbeit mit VertreterInnen aus der Landwirtschaft und dem landwirtschaftlichen Versuchszentrum in Laimburg (Südtirol) führte zu einem hohen Innovationsgehalt der Projektinhalte.

Die Detailergebnisse des Projekts wurden einerseits in einem Vortrag vor Fachpublikum (Arznei- und Gewürzpflanzenanbau) disseminiert, anderseits flossen diese in die Erstellung der „Anbauanleitung Rainfarn“ eines mehrbändigen deutschsprachigen Standardwerks ein.

Die gelungene Dissemination der Projektergebnisse manifestiert sich auch durch zahlreiche Kontaktaufnahmen seitens interessierter Akteure bzw. von Interessensverbänden, vorwiegend aus dem landwirtschaftlichen Bereich. Es spiegelt das grundsätzliche Interesse an der Pflanze Rainfarn wider, da diese Kultur auf allen ackerbaulich nutzbaren Standorten in unseren klimatischen Breiten gedeiht und keine besonderen Ansprüche an den Boden sowie an die Vorfrucht stellt.

5.3 Beschreibung der Umsetzungspotentiale

Für die Landwirtschaft ergibt sich die Chance zum Anbau einer neuen Pflanze, die relativ einfach zu kultivieren ist.

Für eine Markteinführung des Endproduktes müssten in dieser Phase hingegen noch weitere Freilandversuche und diagnostische Laborversuche mit breiterem Konzentrationsbereich eventuell in Verbindung mit einem weiteren pflanzlichen Wirkstoff, durchgeführt werden. Die Ergebnisse mit den beiden eingesetzten Konzentrationen lassen darauf schließen, dass die Wirkung des Extraktes mit der höheren Konzentration mit herkömmlichen konventionellen Pflanzenschutzmitteln aus synthetischen oder biotechnologischen Quellen vergleichbar ist, jedoch sind noch keine Trendabbildungen bezüglich einzusetzender Konzentration und Stabilität des Produktes zulässig. Deshalb wäre eine erfolgreiche Anwendung inklusive Produktentwicklung und Zulassungsverfahren nur unter eingehender Berücksichtigung der richtigen Konzentrationseinstellung des Rainfarnextraktes möglich. Hier könnten auch die gewonnenen Ergebnisse zu den wirksamen Inhaltsstoffen des Rainfarnextraktes einfließen. Für die weiteren Untersuchungen und die Realisierung des Projektes als

Demonstrationsvorhaben muss ein Firmenpartner im Bereich der Herstellung von Pflanzenschutzmitteln gewonnen werden.

Die Hauptziele der Extraktherstellung aus Rainfarn im Technikumsmaßstab und dessen Einsatz in Freilandversuchen sowie die Identifizierung der aktiven Substanzen konnten erfolgreich abgeschlossen werden. Um die Extraktion wirtschaftlich effizient durchführen zu können, müsste allerdings eine Extraktionsanlage mit größeren Dimensionen verwendet werden, da der Extraktgehalt relativ gering ist. Die Wirksamkeit des formulierten Pflanzenschutzmittels wurde sowohl in den Freiland- als auch in den diagnostischen Laborversuchen nachgewiesen. Die Wirkung des Extraktes hat allerdings über die Entwicklungsperiode des Apfelwicklers nachgelassen. Die Ursachen dafür sind allerdings noch abzuklären.

Damit wurde die Basis für die Weiterentwicklung des Rainfarnextraktes als Pflanzenschutzmittel bis zur Marktreife gelegt. Die Methodik könnte in Zukunft auf weitere Entwicklungen von Pflanzenschutzmitteln aus Pflanzenextrakten umgelegt werden.

6 Schlussfolgerungen zu den Projektergebnissen

Die Randbedingungen für den Rainfarnanbau konnten im Rahmen des Projektes abgeklärt und der optimale Erntezeitpunkt für die maximale Extraktausbeute durch mehrfaches Monitoring ermittelt werden. Bei der Extraktion des Pflanzenmaterials wurde eine gewisse Routine erreicht und eine praktikable Spritzmittelformulierung entwickelt.

Aus den Ergebnissen der Freilandversuche und Laborversuche lässt sich jedoch schließen, dass für eine Vermarktung des Produktes und dem damit verbundenen Zulassungsverfahren noch weitere Dosierungsversuche des Extraktes im Freiland notwendig sind. Die Wirkung des Extraktes mit der höheren Konzentration ist mit herkömmlichen konventionellen Pflanzenschutzmitteln aus synthetischen oder biotechnologischen Quellen vergleichbar, jedoch sind derzeit noch keine Trendabbildungen bezüglich einzusetzender Konzentration und Aktivität zulässig. Auch die Abnahme der Wirksamkeit des Produktes über die Entwicklungsperiode des Apfelwicklers muss durch weitere diagnostische Laborversuche genauer untersucht werden. Möglicherweise muss das Anwendungsintervall des Produktes in den Freilandversuchen verkürzt oder die Konzentration erhöht werden.

Eine mögliche Erklärung für die abnehmende Repellent -Wirkung wäre eine unzureichende Langzeitstabilität des gewonnenen Rainfarnextraktes z.B. durch Abbau einer Wirkstoffkomponente. Auch wären Gewöhnungseffekte des Apfelwicklers vorstellbar, die noch auszutesten wären. Eventuell sollte auch eine Produktentwicklung in Verbindung mit

einem zweiten pflanzlichen oder bereits kommerziell eingesetzten Wirkstoff angestrebt werden.

Die Methodik selbst könnte auf viele weitere Pflanzenextrakte mit potentiell abwehrenden Wirkungen von Schädlingen umgelegt werden. Das Projektteam beabsichtigt mit den gewonnenen Ergebnissen einen Firmenpartner für die Durchführung von weiteren Freiland- und diagnostischen Laborversuchen zu gewinnen ev. auch mit einer anderen Pflanze. Weiters soll auch die Kooperation mit dem im Laufe des Projektes gewonnenen neuen Forschungspartner mit großer Expertise im Bereich der biologischen Schädlingsbekämpfung, dem Versuchszentrum Laimburg in Südtirol, weiter ausgebaut werden. Die diagnostischen Untersuchungen im Feldversuch und Glashaus im Versuchszentrum werden auch in den kommenden Monaten mit dem im Projekt produzierten Gesamtextrakt und den einzelnen Fraktionen im Grammmaßstab weitergeführt werden um mehrere Phasen der Apfelwicklerentwicklung gezielt untersuchen zu können.

7 Ausblick und Empfehlungen

Mit dem vorliegenden Projekt wurde die aus alten überlieferten Quellen lang bekannte repellente Wirkung einer regionalen Pflanze für eine neue stoffliche Anwendung genutzt.

Die Wirksamkeit des Extraktes wurde bewiesen, allerdings wäre die Durchführung weiterer Freilandversuche in mehreren unterschiedlichen Konzentrationsbereichen neben Untersuchungen der Extraktstabilität und Toxizität für ein Zulassungsverfahren und die darauf folgende Vermarktung des Produktes notwendig, um die Aktivität der Formulierung auch über den gesamten Entwicklungszeitraum des Schädlings sicherzustellen. Dafür sind noch weitere diagnostische Laborversuche und sogenannte Stabilitätstests in simulierten Umgebungen notwendig. Für deren Durchführung sollte auch ein Firmenpartner im Bereich des Pflanzenschutzes für eine Kooperation gewonnen werden um auf Expertise im Bereich von bestehenden Zulassungsverfahren aufbauen zu können. Dabei könnte auch eine Produktentwicklung in Verbindung mit einem zweiten pflanzlichen oder bereits kommerziell eingesetzten Wirkstoff angestrebt werden. Diese Repellents aus Pflanzen könnten, nach einem erfolgreichen Zulassungsverfahren, vor allem in der biologischen Landwirtschaft eingesetzt werden. Dies würde die Apfelwickler-Bekämpfungsmöglichkeiten und anderer Wicklerarten (Trauben- oder Pflaumenwickler) im Biolandbau erheblich verbessern.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus des Apfelwicklers, *Cydia pomonella* 9
Abbildung 2: Entwicklungshemmende Wirkung der Gesamtextrakte 10
Abbildung 3: Funktionsprinzip ASE 13
Abbildung 4: Feststoffextraktionsanlage DIG-MAZ 10 V 15
Abbildung 5: Fraktionierung des Rainfarnextrakts im Milligrammbereich. 18
Abbildung 6: Fraktionierung des Rainfarnextrakts im Grammbereich 20
Abbildung 7: Versuchsdesign der Mittelprüfung gegen den Apfelwickler 21
Abbildung 8: Vollständig eingetauchte Frucht 23
Abbildung 9: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einbohrungsverhaltens der Apfelwicklerlarven 25
Abbildung 10: Verlauf der Pflanzenentwicklung von der Anpflanzung bis zur Vollblüte am Biohof Oswald 27
Abbildung 11: Ernte, Transport, Zerkleinerung und Lagerung der getrockneten Rainfarndroge am Biohof Oswald 28
Abbildung 12: Rainfarnbestand Oswald am 17. Juni 2009 29
Abbildung 13: Rainfarnbestand Oswald am 20. April 2010 30
Abbildung 14: Rainfarnbestand Oswald am 17. Mai 2010 31
Abbildung 15: Rainfarnbestand Oswald am 26. Mai 2010 31
Abbildung 16: Mehltaubefall im dreijährigen Bestand am 26. Mai 2010 32
Abbildung 17: Rainfarnbestand Oswald am 28. 6. 2010 32
Abbildung 18: Rainfarnbestand Wressnig am 20. April 2010 33
Abbildung 19: Rainfarnbestand Wressnig am 16. Juni 2010 34
Abbildung 20: Rainfarnbestand Wressnig am 28. Juni 2010 34
Abbildung 21: Extraktgehalte im Verlauf der Pflanzenentwicklung bezogen auf Frischmasse bei Rainfarn im ersten Bestandsjahr 36
Abbildung 22: Extraktgehalte im Verlauf der Pflanzenentwicklung bezogen auf Frischmasse bei Rainfarn im zweiten Bestandsjahr 36
Abbildung 23: Extraktgehalte 2009 der Rainfarnbestände im 1. Bestandsjahr an den Standorten Biohof Oswald und Biogemüsehof Wressnig 37
Abbildung 24: CO_2 – Forschungsextraktionsanlage 5l/1000 bar der Firma Natex 40
Abbildung 25: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm der Probe II/b/1 2008 (zweijähriger Bestand/Probepunkt) 40
Abbildung 26: Vergleich der beiden HPLC/UV-DAD – Chromatogramme der beiden Proben II/b/1 (untere Kurve) und II/c/1 (obere Kurve) zu unterschiedlichen Erntezeitpunkten 2008 41
Abbildung 27: Vergleich der beiden HPLC/UV-DAD – Chromatogramme der beiden Proben II/b/1(zweijährig, untere Kurve) und I/b/8 (einjährig, obere Kurve) 2008 41
Abbildung 28: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm - Vergleich von unterschiedlichen Probennahmepunkten desselben Standortes und Erntezeitpunktes 2008 41
Abbildung 29: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm - Vergleich des einjährigen Bestandes am Biogemüsehof Wressnig am 07.08.2009 an unterschiedlichen Probennahmepunkten 42
Abbildung 30: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm – Vergleich des einjährigen Bestandes am Biogemüsehof Wressnig und Biohof Oswald am 20.07.2009 an unterschiedlichen Probepunkten 42
Abbildung 31: Chromatogramm des CO_2 - Extraktes 43

Abbildung 32: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm der Fraktion IV/2 44
Abbildung 33: MPLC - Auftrennung der Fraktion IV/2 45
Abbildung 34: Dünnschichtchromatogramm der Fraktionen 30 - 43 45
Abbildung 35: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm der Fraktion 38 46
Abbildung 36: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm der Fraktion 39 46
Abbildung 37: HPLC/UV-DAD – Chromatogramm der Fraktion 40 46
Abbildung 38: Strukturvorschlag 47
Abbildung 39: Mögliche Struktur der aktive Verbindung 48
Abbildung 40: Spritzmittelformulierungen mit und ohne Wirkstoff 50
Abbildung 41: Spritzmittelformulierungen der einzelnen Fraktionen (+ Blindwert) 51
Abbildung 42: Vergleich der Spritzmittel im Gesamtbefall der Äpfel mit der Obstmade der 1. Generation 52
Abbildung 43: Vergleich der Spritzmittel im Gesamtbefall der Äpfel mit der Obstmade des gesamten Beobachtungszeitraumes 53
Abbildung 44: Prozentueller Anteil der abgestoppten Obstmaden bei den unterschiedlichen Anwendungen 54
Abbildung 45: Prozentueller Anteil der ausgewanderten Obstmaden bei den unterschiedlichen Anwendungen 54
Abbildung 46: Wirkung verschiedener Konzentrationen des Rainfarnextraktes in den diagnostischen Laborversuchen im Feldversuch und Glashaus 55

9 Literaturverzeichnis

[i] Hambammer A (2010) Monitoring der Bestandesentwicklung von Rainfarn (*Tanacetum vulgare*) und Analyse der inhaltsstofflichen Zusammensetzung des Rainfarnextraktes im Verlauf der Pflanzenentwicklung. Dipl.Arb. am Inst. f. Pflanzenwissenschaften der KF-Uni Graz

[ii] Meier U. (2001) Herausgeber: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft - Entwicklungsstadien mono- und dikotyler Pflanzen. BBCH Monografie. 2. Aufl. Braunschweig

[iii] Hadacek F., Berghold H. (2007) Pflanzenschutz Innovativ – Alternative Strategien gegen Obstschädlinge auf Basis nachwachsender Rohstoffe aus heimischen Pflanzen, interner Projektendbericht

[iv] Copping L. G. and Duke S.O. (2007) Natural products that have been used commercially as crop protection agents. Pest Management Science 63(6), 524-554

[v] Dragland S., Rohloff J., Mordal R. and Iversen T. H. (2005) Harvest regimen optimization and essential oil production in five tansy (*Tanacetum vulgare* L.) genotypes under a northern climate. J. Agric. Food Chem. 53(12): 4946-4953.

[v] Stebbing A.R.D., (1982) Hormesis – the stimulation of growth by low levels of inhibitors. The Science of the Total Environment 22, 213-234.

[vi] Thieme Chemistry (Hrsg.) Römpp Online. Version 3.1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008.

[vii] Bravo A, Gill S, Soberón M (2007) Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49 (4), 423-35.