

***In vitro* Versuche zu den Wirkungen von Kupferverbindungen,  
Calciumhydroxid, Kaliumcarbonat und dem Alkylpolyglycosid  
Glucopon 215 CSUP auf Konidien und frühe Entwicklungsstadien  
von *Venturia inaequalis***

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Jurith Montag**

aus

Itzehoe

Bonn 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Lukas Schreiber
2. Referent: Prof. Dr. Jörg Schönherr

Tag der Promotion: 08. Februar 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB-Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2006

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von November 2003 bis Dezember 2005 in der Abteilung Obstbau des Instituts für Gemüse- und Obstbau der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Lukas Schreiber und Prof. Dr. Jörg Schönherr durchgeführt.

Wesentliche Teile der hier vorgelegten Arbeit wurden entweder bereits veröffentlicht oder befinden sich noch im Druck:

**MONTAG, J; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J. (2005):** An *in vitro* study on the post-infection activities of hydrated lime and lime sulphur against apple scab (*Venturia inaequalis*). *Journal of Phytopathology* **153**, 485-491.

**MONTAG, J; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J. (2006):** An *in vitro* study on the post-infection activities of copper hydroxide and copper sulfate against conidia of *Venturia inaequalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, im Druck.

**MONTAG, J; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J. (2006):** An *in vitro* study of the nature of protective activities of copper sulphate, copper hydroxide and copper oxide against conidia of *Venturia inaequalis*. *Journal of Phytopathology*, im Druck.

„Die Apfel - und Pfirsichspritzungen wurden genau zur richtigen Zeit abgeschlossen - beim Spritzen ist der richtige Zeitpunkt entscheidend. Die neuen Blätter und wachsenden Früchte müssen mit Gift bedeckt sein, vor allem die McIntosh-Äpfel, deren Blätter und Früchte von einem widerlichen Pilz namens Apfelschorf befallen werden. Die Sporen sind überall und brauchen nur ein bisschen feuchtes Wetter oder Regen, um sich zu entwickeln. Wenn sie sich erst einmal als schmutzigbrauner Pelz auf einem ungeschützten Blatt festgesetzt haben, ist es fast unmöglich, zu verhindern, dass sie sich auch auf die unreifen Äpfel ausbreiten. Zur Erntezeit hat ein derart befallener Apfel im besten Fall mehrere schuppige Stellen, die ihn wertlos machen, und schlimmstenfalls hässliche schwarze Flecken, unter denen die Haut aufplatzt und die die Frucht faulen lassen.

Die Liste der Feinde war endlos, und jeder hatte seine eigene Saison. ...

Bei jeder Herausforderung musste ich mit dem entsprechenden Spritzmittel bereit sein, und jeder Mischung musste das böse ätzende Zeug beigemischt werden, Schwefelkalkpulver gegen Apfelschorf.“

ADELE CROCKETT ROBERTSON

Der Apfelgarten - Erinnerungen einer Glücklichen

*8. Auflage September 2003, Rowohlt Verlag, Reinbek*

# Inhalt

|                                                                                                    |             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Inhalt.....</b>                                                                                 | <b>I</b>    |
| <b>Abbildungen.....</b>                                                                            | <b>V</b>    |
| <b>Tabellen.....</b>                                                                               | <b>VIII</b> |
| <b>Abkürzungen.....</b>                                                                            | <b>IX</b>   |
| <b>1 Einleitung.....</b>                                                                           | <b>1</b>    |
| <b>2 Biologie des Erregers.....</b>                                                                | <b>3</b>    |
| 2.1 Klassifizierung.....                                                                           | 3           |
| 2.2 Lebenszyklus.....                                                                              | 3           |
| <b>3 Bekämpfungsstrategien.....</b>                                                                | <b>6</b>    |
| 3.1 Defensive Bekämpfungsstrategien.....                                                           | 8           |
| 3.2 Offensive Bekämpfungsstrategien.....                                                           | 9           |
| 3.3 Definition: Infektionsperiode.....                                                             | 9           |
| 3.4 Definition: Protektive und postinfektionelle Wirkung von Fungiziden.....                       | 11          |
| 3.5 Bekämpfung von <i>V. inaequalis</i> mit Fungiziden im ökologischen Obstbau.....                | 12          |
| 3.5.1 Kupferfungizide.....                                                                         | 12          |
| 3.5.1.1 Wirkungsweise der Kupferfungizide.....                                                     | 13          |
| 3.5.2 Schwefelfungizide.....                                                                       | 15          |
| 3.5.3 Alternativen zu Kupfer- und Schwefelfungiziden.....                                          | 15          |
| 3.5.3.1 Calciumhydroxid.....                                                                       | 16          |
| 3.5.3.2 Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP.....                                                  | 17          |
| <b>4 Das <i>in vitro</i> Testsystem.....</b>                                                       | <b>18</b>   |
| <b>5 Fluoreszenzfarbstoffe zur Untersuchung physiologischer Prozesse in pilzlichen Sporen.....</b> | <b>20</b>   |
| <b>6 Zielsetzungen der Arbeit.....</b>                                                             | <b>21</b>   |
| 6.1 Wirkungsweise von Kupferverbindungen.....                                                      | 21          |
| 6.2 Wirkungsweise von Calciumhydroxid.....                                                         | 22          |
| 6.3 Wirkungsweise von Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP.....                                    | 22          |
| <b>7 Material und Methoden.....</b>                                                                | <b>23</b>   |
| 7.1 Material.....                                                                                  | 23          |
| 7.1.1 Geräte.....                                                                                  | 23          |
| 7.1.2 Materialien.....                                                                             | 24          |
| 7.1.3 Chemikalien.....                                                                             | 24          |
| 7.1.4 pH-Werte verwendeter Lösungen und Suspensionen.....                                          | 26          |

|           |                                                                                                                               |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.2       | Methoden.....                                                                                                                 | 27 |
| 7.2.1     | Isolation der Kutikularmembranen.....                                                                                         | 27 |
| 7.2.2     | Produktion der <i>Venturia inaequalis</i> Konidien.....                                                                       | 27 |
| 7.2.3     | Inokulation der Kutikularmembranen.....                                                                                       | 28 |
| 7.2.4     | Inokulation der Blattscheiben.....                                                                                            | 28 |
| 7.2.5     | Experimentelles Design der Versuche auf Kutikularmembranen und Blattscheiben...                                               | 29 |
| 7.2.6     | Mikroskopische Auswertung der Versuche auf Kutikularmembranen.....                                                            | 29 |
| 7.2.6.1   | Herstellung der FDA- und CTC-Lösungen zur Vitalfärbung.....                                                                   | 29 |
| 7.2.6.2   | Ermittlung der Keimrate.....                                                                                                  | 30 |
| 7.2.6.3   | Auswertung der Effekte von Behandlungen auf physiologische Prozesse und die Keimung von Konidien.....                         | 30 |
| 7.2.6.4   | Auswertung der Effekte postinfektioneller Behandlungen auf Vitalität und Anzahl primärer Stromata.....                        | 31 |
| 7.2.7     | Mikroskopische Auswertung der Versuche auf Blattscheiben.....                                                                 | 32 |
| 7.2.8     | Fotografie.....                                                                                                               | 32 |
| 7.2.9     | Quantifizierung der Fluorescein-Fluoreszenz mittels Spektrofotometrie.....                                                    | 32 |
| 7.2.9.1   | Messungen bei Behandlungen vor Inokulation.....                                                                               | 33 |
| 7.2.9.2   | Messungen bei Behandlungen nach Inokulation.....                                                                              | 33 |
| 7.2.10    | Detektierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Chemilumineszenz.....                                                  | 34 |
| 7.2.11    | Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten.....                                                             | 34 |
| 7.3       | Versuchsbeschreibungen.....                                                                                                   | 36 |
| 7.3.1     | Abschnitt A: Versuche zur Wirkungsweise von Kupferverbindungen.....                                                           | 36 |
| 7.3.1.1   | Protektive Wirkung von Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid sowie den Filtraten von Kupferhydroxid und Kupferoxid..... | 36 |
| 7.3.1.2   | Postinfektionelle Wirkung von Kupfersulfat und Kupferhydroxid.....                                                            | 36 |
| 7.3.1.2.1 | Behandlungen auf Kutikularmembranen und Blattscheiben bei Inkubation in Wassertropfen.....                                    | 37 |
| 7.3.1.2.2 | Behandlungen auf Kutikularmembranen bei trockener Inkubation.....                                                             | 37 |
| 7.3.1.3   | Versuche zur Wirkung von Kupfersulfat und Kupferoxid bei Behandlungen auf Wasseragar.....                                     | 38 |
| 7.3.1.4   | Generierung von ROS in Suspensionen von Kupferhydroxid und Kupferoxid.....                                                    | 38 |
| 7.3.2     | Abschnitt B: Versuche zur Wirkungsweise von Calciumhydroxid.....                                                              | 39 |
| 7.3.2.1   | Postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid.....                                                                            | 39 |
| 7.3.2.2   | Effekt des pH-Wertes auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                | 39 |
| 7.3.3     | Abschnitt C: Versuche zur Wirkungsweise von Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP.....                                         | 41 |

|           |                                                                                                                                  |           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 7.3.3.1   | Effekte auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                | 41        |
| 7.3.3.1.1 | Kaliumcarbonat.....                                                                                                              | 41        |
| 7.3.3.1.2 | Glucopon 215 CSUP.....                                                                                                           | 41        |
| 7.3.3.1.3 | Kaliumcarbonat + Glucopon 215 CSUP.....                                                                                          | 42        |
| 7.3.3.2   | Postinfektionelle Wirkung.....                                                                                                   | 42        |
| 7.3.3.2.1 | Kaliumcarbonat.....                                                                                                              | 42        |
| 7.3.3.2.2 | Glucopon 215 CSUP.....                                                                                                           | 42        |
| 7.3.3.2.3 | Kaliumcarbonat + Glucopon 215 CSUP.....                                                                                          | 43        |
| <b>8</b>  | <b>Ergebnisse.....</b>                                                                                                           | <b>44</b> |
| 8.1       | Abschnitt A: Wirkungsweise von Kupferverbindungen.....                                                                           | 44        |
| 8.1.1     | Protektive Wirkung von Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid sowie<br>den Filtraten von Kupferhydroxid und Kupferoxid..... | 44        |
| 8.1.2     | Postinfektionelle Wirkung von Kupfersulfat und Kupferhydroxid.....                                                               | 50        |
| 8.1.2.1   | Postinfektionelle Wirkung von Kupfersulfat und Kupferhydroxid bei Inkubation<br>in Wassertropfen auf Kutikularmembranen.....     | 50        |
| 8.1.2.2   | Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid bei Inkubation in Wassertropfen<br>auf Blattscheiben.....                           | 54        |
| 8.1.2.3   | Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid bei trockener Inkubation auf<br>Kutikularmembranen.....                             | 58        |
| 8.1.3     | Wirkung von Kupfersulfat und Kupferoxid bei Behandlungen auf Wasseragar.....                                                     | 59        |
| 8.1.3.1   | Wirkung bei Behandlungen vor Inokulation.....                                                                                    | 59        |
| 8.1.3.2   | Wirkung bei Behandlungen nach Inokulation.....                                                                                   | 62        |
| 8.1.4     | Generierung von ROS in Suspensionen von Kupferhydroxid und Kupferoxid.....                                                       | 65        |
| 8.2       | Abschnitt B: Wirkungsweise von Calciumhydroxid.....                                                                              | 66        |
| 8.2.1     | Postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid.....                                                                               | 66        |
| 8.2.2     | Effekte des pH-Wertes auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                  | 68        |
| 8.3       | Abschnitt C: Wirkungsweise von Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP.....                                                         | 70        |
| 8.3.1     | Effekte auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                | 70        |
| 8.3.1.1   | Kaliumcarbonat.....                                                                                                              | 70        |
| 8.3.1.2   | Glucopon 215 CSUP.....                                                                                                           | 73        |
| 8.3.1.3   | Kaliumcarbonat + Glucopon 215 CSUP.....                                                                                          | 75        |
| 8.3.2     | Postinfektionelle Wirkung.....                                                                                                   | 77        |
| 8.3.2.1   | Kaliumcarbonat.....                                                                                                              | 77        |
| 8.3.2.2   | Glucopon 215 CSUP.....                                                                                                           | 79        |
| 8.3.2.3   | Kaliumcarbonat + Glucopon 215 CSUP.....                                                                                          | 81        |

---

|           |                                                                                                                                                       |            |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>9</b>  | <b>Diskussion.....</b>                                                                                                                                | <b>83</b>  |
| 9.1       | Abschnitt A: Wirkungsweise von Kupferverbindungen.....                                                                                                | 83         |
| 9.1.1     | Protektive Wirkung von Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid sowie den Filtraten von Kupferhydroxid und Kupferoxid.....                         | 83         |
| 9.1.2     | Postinfektionelle Wirkung von Kupfersulfat und Kupferhydroxid.....                                                                                    | 85         |
| 9.1.2.1   | Postinfektionelle Wirkung von Kupfersulfat und Kupferhydroxid bei Inkubation in Wassertropfen auf Kutikularmembranen.....                             | 85         |
| 9.1.2.2   | Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid bei Inkubation in Wassertropfen auf Blattscheiben.....                                                   | 86         |
| 9.1.2.3   | Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid bei trockener Inkubation auf Kutikularmembranen.....                                                     | 87         |
| 9.1.3     | Wirkung von Kupfersulfat und Kupferoxid bei Behandlungen auf Wasseragar.....                                                                          | 88         |
| 9.1.4     | Vergleich der Versuche auf Kutikularmembranen, Blattscheiben und Wasseragar....                                                                       | 89         |
| 9.1.5     | Generierung von ROS in Suspensionen von Kupferhydroxid und Kupferoxid.....                                                                            | 90         |
| 9.1.6     | Zusammenfassende Diskussion von Abschnitt A: Auswirkungen auf die Schorfkontrolle mit Kupfer unter Feldbedingungen.....                               | 91         |
| 9.2       | Abschnitt B: Wirkungsweise von Calciumhydroxid.....                                                                                                   | 94         |
| 9.2.1     | Auswirkungen auf die Schorfkontrolle mit Calciumhydroxid unter Feldbedingungen.....                                                                   | 96         |
| 9.3       | Abschnitt C: Wirkungsweise von Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP.....                                                                              | 98         |
| 9.3.1     | Kaliumcarbonat.....                                                                                                                                   | 98         |
| 9.3.2     | Glucopon 215 CSUP.....                                                                                                                                | 98         |
| 9.3.3     | Kaliumcarbonat + Glucopon 215 CSUP.....                                                                                                               | 99         |
| 9.3.4     | Zusammenfassende Diskussion von Abschnitt C: Auswirkungen auf die Schorfkontrolle mit Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP unter Feldbedingungen..... | 100        |
| <b>10</b> | <b>Zusammenfassung.....</b>                                                                                                                           | <b>101</b> |
| <b>11</b> | <b>Literatur.....</b>                                                                                                                                 | <b>103</b> |



## Abbildungen

|                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 3-1.</b> Schorfläsion und CM-Testsystem.....                                                                                                                                                                       | 7  |
| <b>Abbildung 3-2.</b> Zusammenhang zwischen den Reproduktionsstrategien des Schorferregers <i>V. inaequalis</i> und den Strategien zu seiner Bekämpfung (verändert nach MACHARDY ET AL. 2001).....                              | 7  |
| <b>Abbildung 3-3.</b> Minimale Blatfeuchtedauer für Infektionen von Ascosporen und Konidien von <i>V. inaequalis</i> in Abhängigkeit der Temperatur (verändert nach STENSVAND ET AL. 1997).....                                 | 10 |
| <b>Abbildung 3-4.</b> Zusammenhang zwischen der Wirkung von Fungiziden und der Entwicklung des Schorferregers <i>V. inaequalis</i> (verändert nach SZKOLNIK 1981).....                                                          | 11 |
| <b>Abbildung 7-1.</b> Erläuterung eines Boxplots.....                                                                                                                                                                           | 35 |
| <b>Abbildung 8-1.</b> Gekeimte Konidien unbehandelter Kontrollen 24 Stunden nach Inokulation auf ‚Gloster‘-CM.....                                                                                                              | 47 |
| <b>Abbildung 8-2.</b> Gekeimte Konidien unbehandelter Kontrollen nach Anfärbung mit CTC sowie gekeimte und ungekeimte Konidien nach protektiven Behandlungen mit Kupferoxid und dem Filtrat von Kupferhydroxid.....             | 48 |
| <b>Abbildung 8-3.</b> Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid und Kupfersulfat auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation.....                                                  | 51 |
| <b>Abbildung 8-4.</b> Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid und Kupfersulfat auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 48 Stunden nach Inokulation.....                                                  | 51 |
| <b>Abbildung 8-5.</b> Primäre Stromata sowie gekeimte Konidien nach Behandlungen mit Kupferhydroxid, KOH und Glucopon 215 CSUP.....                                                                                             | 52 |
| <b>Abbildung 8-6.</b> Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid auf die Anzahl der Stromata bei einer Behandlung 24 Stunden nach Inokulation von ‚Elstar‘-Blattscheiben.....                                                 | 55 |
| <b>Abbildung 8-7.</b> Stromata 24 und 72 Stunden nach Inokulation von ‚Elstar‘-Blattscheiben...                                                                                                                                 | 56 |
| <b>Abbildung 8-8.</b> Stromata und Laufhyphen 72 und 96 Stunden nach Inokulation von ‚Elstar‘-Blattscheiben.....                                                                                                                | 57 |
| <b>Abbildung 8-9.</b> Vergleich der postinfektionellen Wirkung von Kupferhydroxid auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 48 Stunden nach Inokulation unter trockenen bzw. nassen Inkubationsbedingungen..... | 58 |
| <b>Abbildung 8-10.</b> Konidien unbehandelter Kontrollen auf Wasseragar sowie Konidien nach Behandlungen mit Kupfersulfat und Kupferoxid 24 Stunden vor Inokulation auf Wasseragar.....                                         | 60 |
| <b>Abbildung 8-11.</b> Wirkung von Behandlungen mit Kupfersulfat und Kupferoxid 24 Stunden vor Inokulation auf die Fluorescein-Fluoreszenz von Konidien auf Wasseragar.....                                                     | 61 |
| <b>Abbildung 8-12.</b> Konidien nach Behandlungen mit Kupfersulfat und Kupferoxid 22 Stunden nach Inokulation auf Wasseragar.....                                                                                               | 63 |
| <b>Abbildung 8-13.</b> Wirkung von Behandlungen mit Kupfersulfat und Kupferoxid 22 Stunden nach Inokulation auf die Fluorescein-Fluoreszenz von Konidien auf Wasseragar.....                                                    | 64 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abbildung 8-14.</b> Durch ROS induzierte Chemilumineszenz in Suspensionen von Kupferhydroxid, Kupferoxid sowie Zinkoxid.....                                                                                                                                           | 65 |
| <b>Abbildung 8-15.</b> Postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid, Calciumcarbonat, KOH-Lösungen verschiedener pH-Werte sowie Schwefelkalk auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation.....                                  | 67 |
| <b>Abbildung 8-16.</b> Postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid, Calciumcarbonat, KOH-Lösungen verschiedener pH-Werte sowie Schwefelkalk auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 48 Stunden nach Inokulation.....                                  | 67 |
| <b>Abbildung 8-17.</b> Einfluss des pH-Wertes auf die Wirkung von KOH-Lösungen auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                                                                                  | 69 |
| <b>Abbildung 8-18.</b> Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von KOH-Lösungen mit pH 12,4 auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                                                 | 69 |
| <b>Abbildung 8-19.</b> Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                                  | 71 |
| <b>Abbildung 8-20.</b> Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von Kaliumcarbonat ( $15 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                                 | 71 |
| <b>Abbildung 8-21.</b> Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von Kaliumcarbonat ( $35$ und $80 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                        | 72 |
| <b>Abbildung 8-22.</b> Einfluss des Behandlungszeitpunktes nach Inokulation auf die Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                         | 72 |
| <b>Abbildung 8-23.</b> Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von GP ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                                              | 73 |
| <b>Abbildung 8-24.</b> Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von GP ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                                              | 74 |
| <b>Abbildung 8-25.</b> Einfluss des Behandlungszeitpunktes nach Inokulation auf die Wirkung von GP ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien.....                                                                                                     | 74 |
| <b>Abbildung 8-26.</b> Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) + GP ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien im Vergleich zu Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ).....          | 75 |
| <b>Abbildung 8-27.</b> Einfluss des Behandlungszeitpunktes nach Inokulation auf die Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) + GP ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien im Vergleich zu Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ )..... | 76 |
| <b>Abbildung 8-28.</b> Einfluss der Konzentration auf die postinfektionelle Wirkung von Kaliumcarbonat auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation.....                                                                         | 78 |
| <b>Abbildung 8-29.</b> Einfluss des Behandlungszeitpunktes auf die postinfektionelle Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Anzahl vitaler primärer Stromata.....                                                                                    | 78 |
| <b>Abbildung 8-30.</b> Einfluss der Konzentration sowie der Inkubationszeit der Behandlung auf die postinfektionelle Wirkung von GP auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation.....                                            | 80 |
| <b>Abbildung 8-31.</b> Einfluss des Behandlungszeitpunktes auf die postinfektionelle Wirkung von GP ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Anzahl vitaler primärer Stromata.....                                                                                                | 80 |

- Abbildung 8-32.** Einfluss des Behandlungszeitpunktes auf die postinfektionelle Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) + GP ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Anzahl vitaler primärer Stromata.....81
- Abbildung 8-33.** Einfluss des Behandlungszeitpunktes auf die postinfektionelle Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) + GP ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei trockenen Inkubationsbedingungen.....82

**Tabellen**

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabelle 7-1.</b> pH-Werte verwendeter Lösungen und Suspensionen.....                                                                             | 26 |
| <b>Tabelle 8-1.</b> Protektive Wirkung von Discus sowie Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid auf die Keimung und Vitalität von Konidien..... | 45 |
| <b>Tabelle 8-2.</b> Protektive Wirkung der Filtrate von Kupferhydroxid und Kupferoxid auf die Keimung und Vitalität von Konidien.....               | 46 |

**Abkürzungen**

|           |                                                                     |
|-----------|---------------------------------------------------------------------|
| a.        | Appressorium                                                        |
| BP        | Bandpassfilter                                                      |
| BS        | Blattscheibe                                                        |
| C. I. Nr. | color index number = Farbindexnummer                                |
| CM        | cuticular membrane/s = Kutikularmembran/en                          |
| CTC       | Cyanoditolyltetrazoliumchlorid                                      |
| FDA       | Fluoresceindiacetat                                                 |
| GP        | Glucopon 215 CSUP                                                   |
| k.        | Konidie                                                             |
| k.p.      | Kupferpartikel                                                      |
| ks.       | Keimschlauch                                                        |
| l.h.      | Laufhyphe                                                           |
| LP        | Langpassfilter (Sperrfilter)                                        |
| MTT       | Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid                           |
| p. a.     | pro analysi = für analytische Zwecke                                |
| p.s.      | primäres Stroma                                                     |
| PAR       | photosynthetic active radiation = photosynthetisch aktive Strahlung |
| PDA       | Potato Dextrose Agar                                                |
| Ph. Eur.  | Europäisches Arzneibuch                                             |
| PMAC      | 10-Methyl-9-Phenoxycarbonyl-Acridinium Fluorosulfonat               |
| RLU       | relative light units                                                |
| ROS       | reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffspezies                |
| s.s.      | Sekundäres Stroma                                                   |
| UV        | Ultraviolett                                                        |

## 1 Einleitung

*Venturia inaequalis* (Cooke) Winter, der Erreger des Apfelschorfes, tritt in allen Apfelanbaugebieten der Welt auf. Unter ungünstigen klimatischen Bedingungen kann es zu großen Ertragsausfällen durch starken Schorfbefall kommen (MACHARDY 1996). In Deutschland zählt Schorf zu den wirtschaftlich bedeutendsten Krankheiten im Obstbau. Der jährliche Fungizidaufwand für die Schorfbekämpfung kann mehr als zwei Drittel des gesamten Pflanzenschutzaufwands im Obstbau betragen (Fischer 1996).

Im integrierten Apfelanbau ermöglichen moderne synthetische Fungizide eine zuverlässige Kontrolle des Apfelschorfes über die gesamte Vegetationsperiode. Im ökologischen Apfelanbau, dessen Bedeutung in Deutschland in den vergangenen Jahren stark zugenommen hat, stehen für eine zuverlässige Schorfkontrolle lediglich Kupfer- und Schwefelpräparate zur Verfügung. Bei Anwendung zur Zeit der Blüte und während der frühen Fruchtentwicklung können Kupferpräparate zu Berostungen an den Früchten führen. Zudem hat das schlechte ökotoxikologische Profil in einigen europäischen Ländern bereits zu einem Verbot von Kupferfungiziden geführt. Schwefelkalk, der aufgrund seiner kurativen (postinfektionellen) Wirkung die wichtigste Alternative zum Kupfer darstellt, verursacht insbesondere bei feuchter Witterung starke Schäden an Pflanzen und Früchten.

In den Versuchs- und Forschungseinrichtungen des ökologischen Obstbaus werden daher große Anstrengungen unternommen diese für die ökologisch wirtschaftenden Betriebe unbefriedigende Situation zu verbessern. In den Ländern, in denen Kupfer noch zugelassen ist, insbesondere in Deutschland und Italien, wird nach Möglichkeiten zur Minimierung der Kupferaufwandmengen gesucht, um damit die unerwünschten phyto- und ökotoxikologischen Nebeneffekte zu reduzieren. Daneben findet ein - teilweise willkürliches - Screening zahlreicher Substanzen statt, um Alternativen zu Kupfer und Schwefel zu finden.

Ein großes Problem dieser Bemühungen ist, dass die Entwicklung neuer Strategien und die Wirksamkeitsprüfung neuer Substanzen fast ausschließlich auf Ebene der sich ausbildenden Symptome stattfinden. Die genaueren Wirkungsmechanismen der Substanzen sind oder bleiben dabei unbekannt. Dies gilt auch für Kupferpräparate, über deren Wirkungsmechanismus trotz mehr als 100jähriger Forschung bis heute wenig bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit befasst sich deshalb speziell mit den Wirkungsmechanismen einiger ausgewählter fungizider Substanzen, die ein Potential für die biologische Bekämpfung haben.

Die Untersuchungen konzentrieren sich auf sehr frühe Stadien des Infektionsprozesses und nicht auf die Ausbildung von Läsionen und Sporen. Es wurde ein *in vitro* Testsystem auf der Basis isolierter Kutikularmembranen (CM) verwendet. Dieses Testsystem ermöglicht die Evaluierung sowohl protektiver als auch postinfektioneller Wirkungen auf Konidien von *V. inaequalis*. Mit Hilfe von Vitalfarbstoffen sollten darüber hinaus auch Aussagen über physiologische Reaktionen der Sporen, Keimhyphen, Appressorien sowie Penetrationsstrukturen getroffen werden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen Kupferverbindungen mit unterschiedlichen Wasserlöslichkeiten sowie Calciumhydroxid, Kaliumcarbonat und das Tensid Glucopon 215 CSUP.

## 2 Biologie des Erregers

### 2.1 Klassifizierung

Nach der von AINSWORTH (1971) vorgeschlagenen Klassifizierung gehört *Venturia inaequalis* (Cooke) Winter in die Abteilung der *Ascomycotina*, Klasse *Loculoascomycetes*, Ordnung *Pleosporales* und Familie *Venturiaceae*. Die parasitische Nebenfruchtform wird auch als *Spilocaea pomi* Fries bezeichnet. *V. inaequalis* befällt in erster Linie Pflanzen der Gattung *Malus*. Von wirtschaftlicher Bedeutung ist *V. inaequalis* besonders auf *Malus × domestica* Borkh., dem Kulturapfel (MACHARDY 1996).

### 2.2 Lebenszyklus

Die saprophytische Hauptfruchtform (perfektes Stadium) findet sich vom Herbst bis zum Frühjahr auf den abgefallenen toten Blättern des Wirtes. Da *V. inaequalis* zur Klasse der *Loculoascomycetes* gehört, wird sein Ascokarp als Pseudothecium bezeichnet. Das Pseudothecium stellt die Überwinterungsform des Pilzes dar. Gegen Ende der Vegetationszeit bilden sich im abgefallenen Laub geschlechtlich determinierte Antheridien (männlich) und Ascogonien (weiblich). Beide finden ihren Ursprung in der Spitze von Hyphen, welche von vegetativen nicht zu unterscheiden sind. Die sich zum Ascogonium entwickelnde Hyphe ist von einer pseudothecischen Zellwand umgeben. Aus dem Pseudothecium heraus wächst eine Trichogyne. Gerät die Trichogyne in Kontakt mit einem vielkernigen Antheridium, so bildet sich in den Zellwänden eine Pore aus, über die männliche Zellkerne vom Antheridium über die Trichogyne in das Ascogon wandern. Aus dem Ascogon entwickeln sich die sogenannten ascogenen Hyphen, die einen weiblichen und einen männlichen Kern enthalten (Dikaryophase). Aus den Endzellen dieser Hyphen entwickeln sich die Asci, in denen die Karyogamie mit anschließender Meiose stattfindet. Es schließen sich zwei mitotische Teilungen an, so dass im Ascus acht haploide Ascosporen entstehen. Die Ascosporen bestehen aus zwei unterschiedlich großen Zellen, auf die sich der Terminus „*inaequalis*“ bezieht (MACHARDY 1996).

Die Ascosporen stellen das primäre Inokulum des Pathogens dar. Obwohl der Zeitraum vom Blattfall bis zur Blüte von Jahr zu Jahr stark variiert, sind die ersten Ascosporen immer ein paar Tage nach dem Aufbrechen der Blütenknospen reif (FALK ET AL. 1995, MACHARDY ET AL. 2001). Durch Feuchtigkeit baut sich in den Pseudothecien ein hydrostatischer Druck auf. Wenn es regnet, werden so die Ascosporen aus den negativ geotropen Pseudothecien über die überwinterte Blattoberfläche ausgeschleudert (GADOURY UND MACHARDY 1985; AYLOR UND



ANAGNOSTAKIS 1991, AYLOR 1998). Durch Wind und Thermik werden sie in die Baumkronen getragen und breiten sich horizontal in der Anlage aus, bis sie entweder wieder zu Boden sinken, auf den jungen Blättern haften bleiben oder die Anlage verlassen (GADOURY ET AL. 1994). Die Masse der Sporen wird exakt zu dem Zeitpunkt ausgeschleudert, an dem die Wahrscheinlichkeit für eine Infektion aufgrund des phänologischen Stadiums des Wirtes am größten ist. Dunkelheit, speziell das Fehlen von rotem Licht im Bereich von 710 bis 730 nm, unterdrückt das Ausschleudern der Ascosporen (BROOK 1969, GADOURY ET AL. 1998). Es wird vermutet, dass dieser Rotlichteffekt das Ausschleudern von Ascosporen bei ungünstigen Infektionsbedingungen, wie bei nächtlicher Taubildung, verhindern soll (MACHARDY ET AL. 2001).

Mit dem Auftreffen der Ascospore auf empfänglichem Wirtsgewebe beginnt die parasitische Phase im Zyklus von *V. inaequalis*, die bis zum Ende der Vegetationsperiode andauert. Durch die Ausbildung einer Schleimhülle haften die Sporen schnell auf der feuchten aber hydrophoben Wachsschicht des Apfelblattes (KEITT UND JONES 1926, SMEREKA ET AL. 1987, YEPES UND ALDWINCKLE 1993). Solange tropfbares Wasser zur Verfügung steht, kann die Spore auf der Wirtsoberfläche keimen (KEITT UND JONES 1926, MAC HARDY 1996). Kurz nach erfolgter Keimung entwickelt sich ein Appressorium. Ausgehend davon wird die Kutikula penetriert (KEITT UND JONES 1926, TURNER ET AL. 1986, SMEREKA ET AL. 1987). In seiner saprophytischen Phase bleibt der Pilz allein auf den subkutikularen Raum beschränkt und somit vollständig außerhalb der Epidermiszellen des Wirtes. Wie der Parasit die für ihn notwendigen Nährstoffe vom Wirt bezieht, ist weitestgehend ungeklärt. Das septierte Myzel breitet sich strahlenförmig aus und bildet Konidiophoren, die die Kutikula durchbrechen. Die Konidiophoren werden in Form von kleinen, oliv gefärbten, samtartigen Flecken als erste Symptome an den Unter- und Oberseiten der Blätter sichtbar (Abbildung 3-1 A) (MACHARDY 1996).

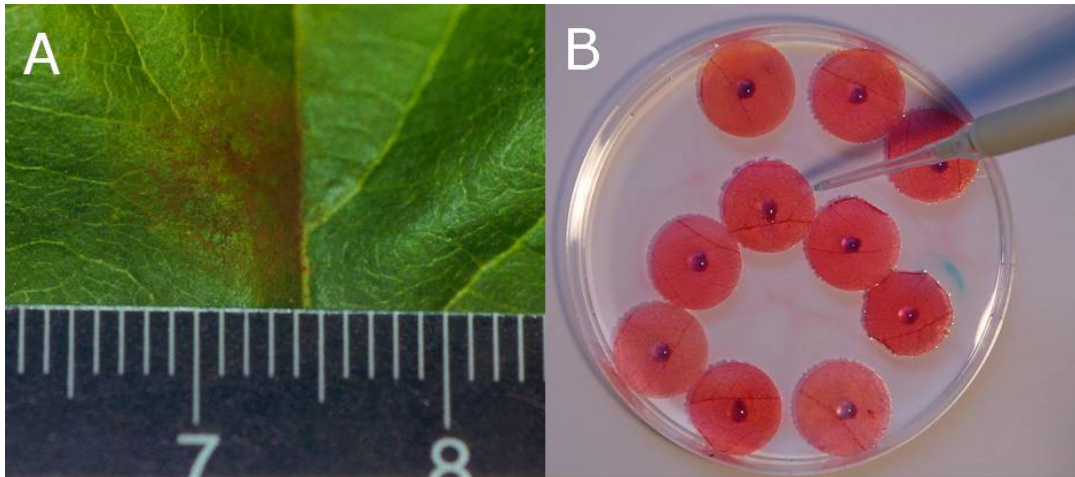
An der Spitze jeder Konidiophore entwickelt sich eine Konidie (asexueller Entwicklungsgang, perfektes Stadium). Werden die Konidenträger von einem Wasserfilm bedeckt, kommt es zum Ablösen der Konidien. Bei einem Taufilm verteilen sich die einzelligen, birnenförmigen Konidien auf demselben Blatt und verstärken die Infektion auf diesem. Bei Regen werden die Konidien durch Tropf- und Spritzwasser innerhalb der Baumkrone von oben nach unten verbreitet. Konidien erfüllen hauptsächlich die Funktion, die Menge an mit Myzel kolonisierter Blattmasse zu vergrößern, um die Wahrscheinlichkeit für das Aufeinandertreffen kompatibler Paarungstypen in einem Blatt zu erhöhen. Die durch Konidien verursachten

Sekundärinfektionen dienen somit dem Aufbau erfolgreicher Genotypen. Während der saprophytischen Phase sorgt der sexuelle Entwicklungsgang für die Neukombination dieser Genotypen (MACHARDY 1996, MACHARDY ET AL. 2001).

### 3 Bekämpfungsstrategien

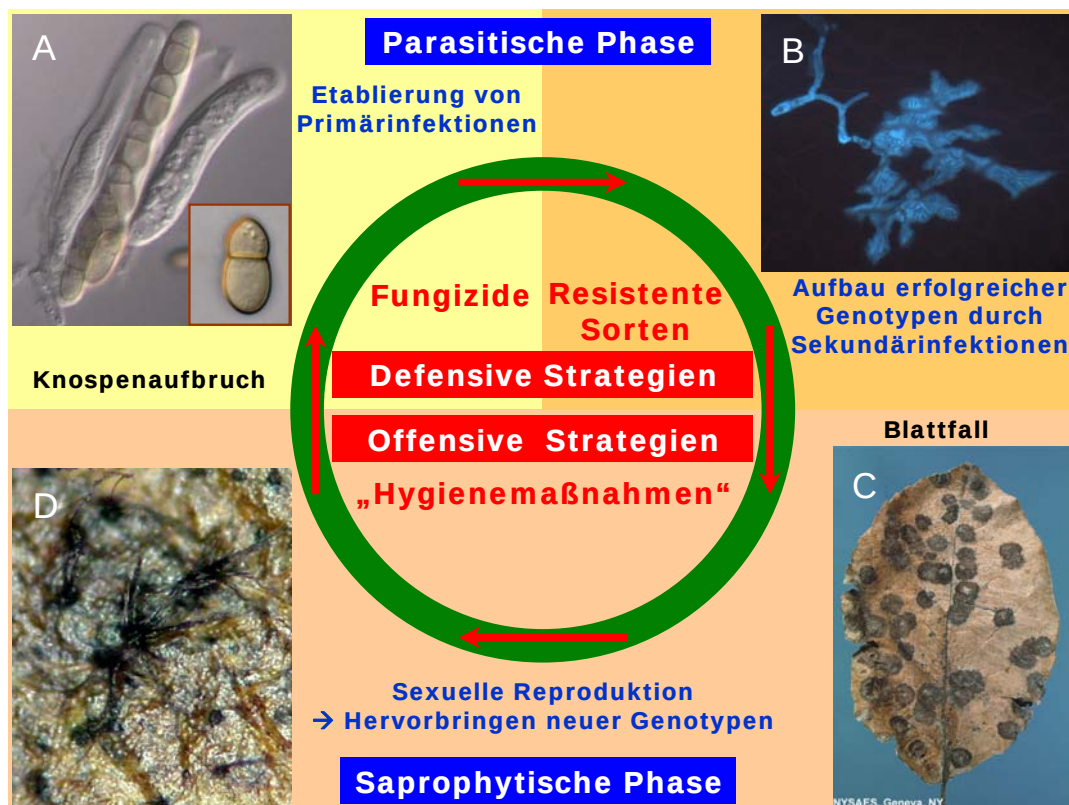
Der Lebenszyklus von *V. inaequalis* zeigt eine sehr gute Anpassung an seinen Wirt. Die modernen Produktionsmethoden des Apfelanbaus bieten günstige Bedingungen für die Entwicklung des Pathogens und fördern in weiten Teilen seine biologische Fitness. So werden die Apfelsorten ausschließlich vegetativ vermehrt, wodurch eine Neukombination von Resistenzgenen des Wirtes ausbleibt. Demgegenüber steht die jährliche sexuelle Reproduktion des Pathogens, das auf diese Weise denselben Wirt mit immer neuen Genotypen und verbesserter parasitischer Fitness reinfizieren kann. Eine Folge davon ist, dass Isolate die Sorte, von der sie gewonnen wurden, erfolgreicher infizieren als andere Sorten (KELLERHAS ET AL. 1993, SIEROTZKI ET AL. 1994). Kulturtechnische Maßnahmen wie der gemähte, unkrautfreie Baumstreifen unter den Bäumen erleichtern es den ausgestoßenen Ascosporen die Baumkrone zu erreichen. Schwachwachsende Unterlagen verringern zudem den Abstand zwischen empfänglichem Wirtsgewebe und der Inokulumquelle (MACHARDY ET AL. 2001).

Der Fortpflanzungserfolg ist ein Maß für die biologische Fitness eines Parasiten (NELSON 1979). *V. inaequalis* verfügt über drei Reproduktionsstrategien, die einen erfolgreichen Fortbestand sichern sollen (Abschnitt 2.2). Die verschiedenen Bekämpfungsmethoden versuchen diese Strategien zu unterbinden (Abbildung 3-2) (MACHARDY ET AL. 2001). Es wird dabei zwischen defensiven und offensiven Bekämpfungsstrategien unterschieden.



**Abbildung 3-1. Schorfläsion und CM-Testsystem.**

(A) Junge Läsion von *V. inaequalis* auf der Oberseite eines Blattes der Sorte ‚Gloster‘. (B) Pipettieren von Konidiensuspension auf enzymatisch isolierte CM, die auf  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  schwimmen. Zur besseren Visualisierung wurden die CM und die Suspension eingefärbt.



**Abbildung 3-2. Zusammenhang zwischen den Reproduktionsstrategien des Schorferregers *V. inaequalis* und den Strategien zu seiner Bekämpfung (verändert nach MACHARDY ET AL. 2001).**

(A) Ascospore und Asci in verschiedenen Reifestadien mit Ascosporen. (B) Gekeimte Konidie mit ausgebildetem sekundärem Stroma. (C) Altes Apfelblatt mit Schorfläsionen. (D) Pseudothecien von *V. inaequalis*.

### 3.1 Defensive Bekämpfungsstrategien

Mit defensiven Bekämpfungsstrategien wird während der parasitischen Phase des Erregers versucht, zum Einen die Etablierung von Primärinfektionen und zum Anderen den Aufbau erfolgreicher Genotypen durch Sekundärinfektionen zu verhindern. Die Etablierung von Primärinfektionen soll durch das Ausbringen von Fungiziden (in der Regel protektive Belagsfungizide) verhindert werden. Hierbei handelt es sich um die klassische und in der Praxis am weitesten verbreitete Bekämpfungsstrategie, auf die im Folgenden für die Situation im ökologischen Obstbau noch näher eingegangen wird (Abschnitt 3.3).

Der Aufbau erfolgreicher Genotypen durch Sekundärinfektionen soll durch die Pflanzung resistenter Sorten verhindert werden. Durch die Resistenz werden Sekundärinfektionen durch Konidien unterbunden. Eine Primärinfektion wird bei schorfresistenten Sorten nicht verhindert (GESSLER UND STUMM 1984, VALSANGIACOMO UND GESSLER 1988, MACHARDY ET AL. 2001). Die Züchtung schorfresistenter Sorten wird bereits seit Beginn des 20. Jahrhunderts durch die klassische Kreuzungszüchtung betrieben (WILLIAMS UND KUC 1969, KUMAR UND SHARMA 1999). Neue Perspektiven für die klassische Resistenzzüchtung eröffnet der Einsatz molekularbiologischer Methoden (MACHARDY ET AL. 2001; CARISSE UND DEWDNEY 2002). Zurzeit sind sieben Resistenzgene bekannt, die aus Wildsorten in Kultursorten eingekreuzt wurden (CARISSE UND DEWDNEY 2002). Die Resistenz der meisten Sorten beruht auf dem aus *Malus × floribunda* stammenden  $V_F$ -Gen. Mittlerweile wurden aber für jedes bekannte Resistenzgen resistenzbrechende Rassen von *V. inaequalis* entdeckt (CARISSE UND DEWDNEY 2002). Um einer möglichen Anpassung des Pilzes vorzubeugen wird daher auch bei Anlagen mit resistenten Sorten empfohlen, Fungizidbehandlungen zur Abwehr von Primärinfektionen durchzuführen (FISCHER 2000). Obwohl sich seit längerem einige resistente Sorten mit sowohl guten Produktions- als auch Qualitätseigenschaften auf dem Markt befinden, ist ihre Verbreitung sowohl im konventionellen als auch im ökologischen Anbau sehr gering. Hauptursache der geringen Verbreitung ist dabei die Schwierigkeit, neue Sorten am Markt zu etablieren (DIEREND UND TENHUMBERG 2000). Verschiedene Sorten die durch Transformation fremder Gene eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Schorf haben gibt es zwar bereits (BOLAR ET AL. 2000; SZANKOWSKI ET AL. 2003), diese sind aber aufgrund der geringen Akzeptanz durch Verbraucher und Politik noch weit von einer Zulassung bzw. einer Markteinführung entfernt. Insbesondere für den ökologischen Obstbau würden solche Pflanzen keine Alternative darstellen.

### 3.2 Offensive Bekämpfungsstrategien

Die Idee offensiver Bekämpfungsstrategien besteht in der Reduktion des primären Inokulums und greift somit bei der Bekämpfung des Pilzes während seiner saprophytischen Phase im Falllaub an. Die offensiven Strategien lassen sich unter dem Begriff „Hygienemaßnahmen“ zusammenfassen. Dabei lassen sich zwei Methoden unterscheiden. Zum Einen ist dies die Reduzierung beziehungsweise Beseitigung des Laubes selbst (indirekte Bekämpfung) und zum Anderen die direkte Bekämpfung von *V. inaequalis* im Falllaub.

Die Reduzierung beziehungsweise Beseitigung des Laubes als Lebensraum und Nährstoffquelle für *V. inaequalis* kann durch das vollständige Entfernen des Laubes aus der Anlage geschehen oder durch Maßnahmen, die die Zersetzung des Laubes fördern. Zu nennen sind hierbei das Häckseln des Falllaubes in der Anlage, die Förderung des Bodenlebens, insbesondere das von Regenwürmern, sowie die Applikation von Harnstoff vor dem Blattfall (RAW 1962, MAC HARDY 1996, KRÜGER ET AL. 2000, SUTTON ET AL. 2000, MAC HARDY ET AL. 2001). Bei der direkten Bekämpfung von *V. inaequalis* während seiner saprophytischen Phase setzt man dagegen zum Einen auf den Einsatz von Fungiziden und Chemikalien und zum Anderen auf den Einsatz pilzlicher Antagonisten (CARISSE ET AL. 2000). Die wirkungsvollste und wirtschaftlichste Maßnahme zur Reduzierung des primären Inokulums ist das Ausbringen von Harnstoff (BURCHILL 1968, KRÜGER ET AL. 2000, SUTTON ET AL. 2000, MONDAL UND TIMMER 2003). Diese Maßnahme ist im ökologischen Anbau jedoch nicht zugelassen (KRÜGER ET AL. 2000). Hier setzt man in erster Linie auf mechanische Maßnahmen zum Zerkleinern oder Entfernen des Laubes, die allerdings mit unverhältnismäßig hohen Kosten verbunden sind (KRÜGER ET AL. 2000, KELDERER ET AL. 2004, CURRY ET AL. 2005). Insgesamt wird der Bekämpfung von *V. inaequalis* während seiner saprophytischen Phase in der obstbaulichen Praxis nur wenig Bedeutung beigemessen, da in der Regel auch bei vermindertem Infektionspotential Spritzungen notwendig sind und der Anbauer Primärinfektionen auf jeden Fall verhindern will.

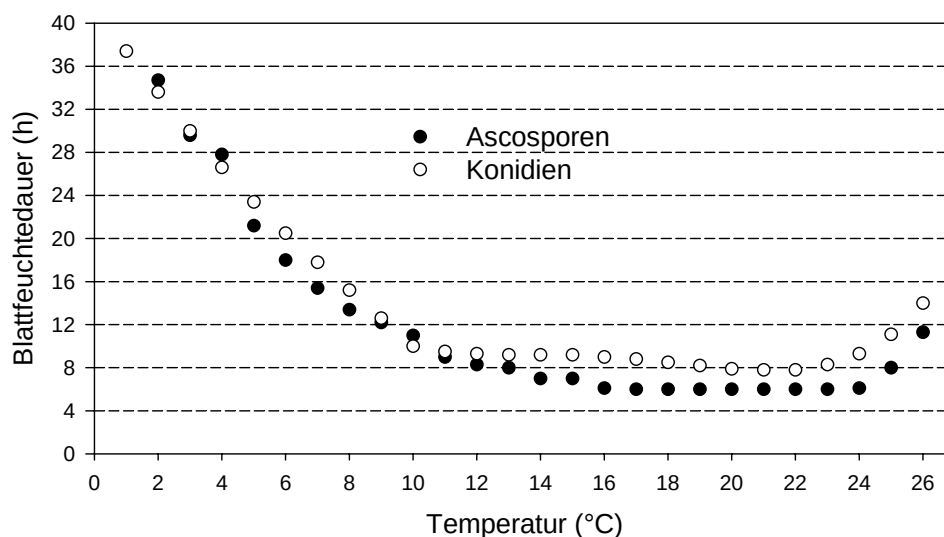
### 3.3 Definition: Infektionsperiode

Die Ermittlung von Infektionsperioden für Ascosporen bzw. Konidien von *V. inaequalis* beruht auf der Tatsache, dass beide Sporenformen nur dann auskeimen und eine Infektion auslösen können, wenn tropfbares Wasser zur Verfügung steht. Der Erfolg und die Stärke der Infektion sind dabei von der Dauer der Benetzung und der Temperatur während der Benetzung abhängig. Eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre reicht nicht aus, um eine

Schorfspore zum Keimen zu bringen (KEIT UND JONES 1926, BECKER UND BURR 1994, MACHARDY 1996).

Die Ermittlung der bis heute verwendeten Mills'schen Infektionsperioden, die 1944 in Form von so genannten Infektionskurven (MILLS 1944) und 1951 in Form einer Tabelle (MILLS UND LAPLANTE 1951) veröffentlicht wurden, geht auf Versuche zurück, die Keitt und Jones in Wisconsin bereits Anfang der 20er Jahre durchführten (KEITT UND JONES 1926). Seitdem sind zahlreiche Feld- und Laborversuche durchgeführt worden, die die Mills'schen Infektionskriterien bestätigen und solche, die Abweichungen festgestellt haben (MACHARDY UND GADOURY 1989). Trotzdem werden die von Mills erstellten Infektionsperioden noch heute in der Praxis angewendet und finden sich in fast jedem obstbaulichen und phytomedizinischen Lehrbuch. Durch die Einbeziehung anderer biologischer Parameter kann die Anwendung von Infektionsperioden weiter verbessert werden. Eine solche Verbesserung stellt die Entwicklung von Simulationsprogrammen dar, die neben den rein meteorologischen Bedingungen auch die Reife und den potentiellen Ausstoß von Ascosporen berücksichtigen (TRAPMAN 1995; HARZER UND ORTH 1997, 1999; SCHELL 1999; BATZER ET AL. 2000).

Alle Angaben über Infektionsperioden in der vorliegenden Arbeit beziehen sich auf die von STENSVAND ET AL. (1997) ermittelten Infektionsperioden. Nach diesen benötigt eine Konidie bei 20°C 8 Stunden und eine Ascospore 6 Stunden, um eine Infektion auszulösen (Abbildung 3-3).



**Abbildung 3-3. Minimale Blattfeuchtedauer für Infektionen von Ascosporen und Konidien von *V. inaequalis* in Abhängigkeit der Temperatur (verändert nach STENSVAND ET AL. 1997).**

### 3.4 Definition: Protektive und postinfektionelle Wirkung von Fungiziden

Der Zusammenhang zwischen der Wirkung eines Fungizids und der Entwicklung eines pilzlichen Pathogens wurde von SZKOLNIK (1981) anhand des Erregers *V. inaequalis* wie folgt definiert (Abbildung 3-4):

Die protektive Wirkung eines Fungizids bezeichnet die chemische Wirkung, die eine Infektion verhindert. Der Pilz wird dabei gestoppt, bevor er die Kutikula penetrieren bzw. bevor er Infektionsstrukturen unter der Kutikula ausbilden kann.

Die postinfektionelle (kurative) Wirkung eines Fungizids bezeichnet die chemische Wirkung, die eine Weiterentwicklung des Pilzes nach erfolgter Infektion bzw. nach Abschluss einer Infektionsperiode verhindert.

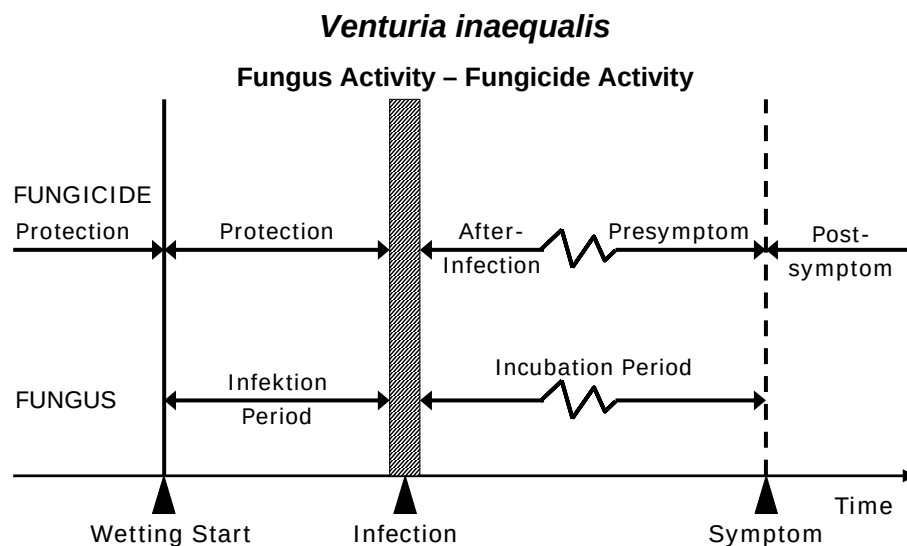


Abbildung 3-4. Zusammenhang zwischen der Wirkung von Fungiziden und der Entwicklung des Schorferregers *V. inaequalis* (verändert nach SZKOLNIK 1981).



### 3.5 Bekämpfung von *V. inaequalis* mit Fungiziden im ökologischen Obstbau

Ein Grundgedanke des ökologischen Pflanzenbaus ist der Verzicht auf den Einsatz von Pestiziden. Daher sind auch moderne synthetische Fungizide im ökologischen Obstbau nicht zugelassen. Ein gänzlicher Verzicht auf Fungizide ist jedoch selbst bei Anlagen mit resistenten Sorten und der Durchführung von Hygiene-Maßnahmen nicht möglich (Abschnitt 3.1 und Abschnitt 3.2). Um Äpfel zu produzieren, die den gestiegenen Qualitätsansprüchen der „Bio-Kunden“ entsprechen, ist der Kostenaufwand für Fungizide sogar höher als beim Einsatz selektiver konventioneller Wirkstoffe (BELZ UND RUESS 2001). Als Schorffungizide, die den größten Anteil der im Apfelanbau eingesetzten Fungizide ausmachen, stehen dem ökologischen Obstbau nur Kupfer- und Schwefelpräparate zur Verfügung.

#### 3.5.1 Kupferfungizide

Zur Abwehr von Primärinfektionen im Frühjahr werden insbesondere in Regionen mit feuchtkaltem Klima, wie das beim Apfelanbau an der Niederelbe der Fall ist, protektive Belagsfungizide auf Kupferbasis eingesetzt (PALM 1995, STENSVAND UND AMUNDSEN 2000, PALM ET AL. 2002). Kupferfungizide können aber phytotoxisch sein und insbesondere bei Applikationen zum Zeitpunkt der Blüte und der frühen Fruchtentwicklung zur Berostung der Früchte führen (COOLEY ET AL. 1991, KIENZLE ET AL. 1995, PALM 1995, KELDERER ET AL. 1997, STENSVAND UND AMUNDSEN 2000, PALM 2002). Zudem akkumuliert Kupfer im Boden und wirkt toxisch auf Bodenmikroorganismen und Regenwürmer (RAW 1962, VAN RHEE 1977, HOLMSTRUP ET AL. 1998, PAOLETTI ET AL. 1998, FRIIS ET AL. 2004). Dieses schlechte ökotoxikologische Profil hat zum Verbot von Kupfer in verschiedenen europäischen Ländern wie Dänemark und den Niederlanden geführt (HOLB ET AL. 2003). In Deutschland finden sich in den Richtlinien der ökologischen Verbände strenge Höchstmengenbegrenzungen (GOLBA 2002) und es wird nach Strategien gesucht, um die jährlich ausgebrachte Menge an Kupfer zu minimieren (KIENZLE ET AL. 1995, PALM 1995, STEFFEK 1999, STENSVAND UND AMUNDSEN 2000, PALM ET AL. 2002).

Bei protektiven Spritzplänen wird hierbei versucht, die Aufwandmengen einzelner Applikationen zu reduzieren (PALM 1995, STENSVAND UND AMUNDSEN 2000, PALM ET AL. 2002). Mit dieser Strategie steigt allerdings die Anzahl der Applikationen, da zum Einen der Neuzuwachs durch den Belag geschützt werden muss und zum Anderen die Haltbarkeit des Belages abnimmt, die durch Niederschlag und künstliche Beregnung begrenzt ist.

Eine andere Strategie setzt auf den „gezielten“ Einsatz von Kupferfungiziden und somit auf eine Reduzierung der Anzahl an Applikationen (KELDERER ET AL. 1997, 2000; STEFFEK 1999). „Gezielt“ meint dabei, dass eine Applikation erst dann erfolgt, wenn (I) davon auszugehen ist, dass es zu einer Infektion kommen kann (bei vorhergesagtem Regen) oder wenn (II) die Bedingungen zum Zustandekommen einer Infektion bereits erfüllt sind (Regen hat bereits eingesetzt und Inokulum wird freigesetzt). Der Erfolg der zweiten Methode setzt voraus, dass Kupfer nicht nur protektiv sondern auch begrenzt postinfektionell wirksam ist. Der einzige Hinweis auf eine postinfektionelle Wirkung eines Kupferfungizids findet sich in einer Studie von HAMILTON (1931), in der er zu der Aussage kommt: „Bordeaux mixture, applied after infection periods ..., gave more consistent and better control than certain sulphur dusts and finely divided sulphur sprays.“ Eine rein protektive Wirksamkeit hätte zur Folge, dass Kupferpräparate auf jeden Fall vor erfolgter Infektion und somit vor Abschluss einer Infektionsperiode appliziert werden müssen. Dadurch würde das Zeitfenster, das einem Anbauer zur Durchführung einer gezielten Bekämpfungsmaßnahme zur Verfügung steht, sehr eng werden.

#### 3.5.1.1 Wirkungsweise der Kupferfungizide

Kupfer ist fungizider Bestandteil der Bordeaux-Brühe (Kupferkalkbrühe) und somit einer der ältesten fungiziden Wirkstoffe überhaupt. Ende des 19. Jahrhunderts wird die Bordeaux-Brühe zur Bekämpfung des Falschen Mehltaus der Weinrebe (*Plasmopara viticola*) in Frankreich entdeckt und auch schnell für die Kontrolle des Apfelschorfs getestet. Der Erfolg der Bordeaux-Brühe war mit ausschlaggebend für die Etablierung von Fungiziden als wichtigste Bekämpfungsstrategie für das 20. Jahrhundert und bis heute (MACHARDY 1996). Über den genauen Wirkungsmechanismus von Kupfer ist trotzdem immer noch wenig bekannt. Seine Erforschung endete mit dem Aufkommen der organischen Fungizide zum Ende der 40er Jahre (MACHARDY 1996). Im ökologischen Obstbau ist Kupfer heute wieder von großer Bedeutung und die mangelnde Kenntnis über die Wirkungsweise der verschiedenen Kupferverbindungen behindert die Entwicklung der beschriebenen Strategien zur Kupferminimierung (Abschnitt 3.5.1).

In den aktuelleren phytomedizinischen und themenverwandten Lehrbüchern beschränken sich Angaben zur Wirkung auf den Pilz meist auf wenige Sätze. Es wird davon ausgegangen, dass  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen in die pilzliche Spore aufgenommen werden und dort Proteine denaturieren und verschiedene Enzymreaktionen blockieren (HOFFMANN ET AL. 1994, HOCK UND ELSTNER 1995, BÖRNER 1997, HEITEFUSS 2000).

Für Hefen liegen Untersuchungen darüber vor, dass  $\text{Cu}^{2+}$ - und andere Metallionen oxidativen Stress in der Zelle auslösen (MORADES-FERREIRA ET AL. 1996; FUJS ET AL. 2005). Als redoxaktives Metall katalysiert Kupfer die so genannte Fenton-Reaktion und beschleunigt dadurch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS = reactive oxygen species) (HALLIWELL UND CUTTERIDGE 1998). Bei der Fenton-Reaktion dient Kupfer als Übergangsmetallion und wird durch ROS (vor allem das Superoxidanion und Wasserstoffperoxyd) reduziert, die im normalen Zellstoffwechsel generiert werden (z. B. in der Atmungskette der Mitochondrien). Im normalen Zellstoffwechsel befinden sich Radikalbildung und Radikalentgiftung im Gleichgewicht. Oxidativer Stress bezeichnet das zeitweilige Überwiegen von ROS durch zunehmende Generierung. ROS schädigen die Zelle durch die Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren (HALLIWELL UND CUTTERIDGE 1998). Zwar liegen keine Untersuchungen für filamentöse Pilze vor, aber es ist wahrscheinlich, dass  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen auch in pilzlichen Sporen oxidativen Stress induzieren.

Wenn, wie angenommen,  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen die eigentliche fungizide Komponente der verschiedenen Kupferverbindungen sind, so sollte die Wasserlöslichkeit der Verbindungen von entscheidender Bedeutung sein. Auf diesen Gedanken aufbauend entwickelte PICKERING (1912) eine Theorie nach der die Spore solange kleinste Mengen von Kupfer akkumuliert bis eine toxische Konzentration erreicht ist. Trotzdem lässt sich die Wirksamkeit nicht allein durch die Menge gelöster  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen erklären, da u. a. auch schwer lösliches Kupferhydroxid und unlösliches Kupferoxid, das man bei der Herstellung von Bordeaux-Brühe erhält, wirksam sind (RÖMPP 1995). Daher wurden drei Hypothesen entwickelt, die erklären sollen wie die Löslichkeit und die Verfügbarkeit des Kupfers in der Bordeaux-Brühe erhöht werden könnte. Die Bildung löslichen Kupfers könnte demnach (I) durch in Regenwasser und Tau gelöstes  $\text{CO}_2$  und Ammoniumsalze (PICKERING 1912, RECKENDORFER 1936), (II) durch Exsudate der Wirtspflanze (DELONG ET AL. 1930) oder (III) durch die Ausscheidung von Säuren und Komplexbildnern der Spore (ADERHOLD 1899, BARKER UND GIMINGHAM 1911, MCCALLAN UND WILCOXON 1936, MARTIN ET AL. 1942, WAIN UND WILKINSON 1943) erhöht werden. In einem Review schlussfolgerte MCCALLAN (1949), dass die Ausscheidung von Exsudaten der Spore der entscheidende der drei genannten Faktoren sei. In Exsudaten von Sporen von *Neurospora sitophila* wurden u. a. Aminosäuren und Malat nachgewiesen (MCCALLAN UND WILCOXON 1936). Es konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen in der Lage waren Kupfer aus Bordeaux-Ablagerungen zu lösen und toxische, lösliche Kupferkomplexe zu bilden (WAIN UND WILKINSON 1943). MARTIN ET AL. (1942) erstellten eine Reihe von Dosis-Wirkungs-Kurven für verschiedene anorganische und organische

Kupferverbindungen. Kupfermalat erwies sich dabei als der toxischste Kupferkomplex und war sogar toxischer als das  $\text{Cu}^{2+}$ -Ion selbst.

Andere Faktoren könnten aber ebenso zur Wirkung unlöslicher Kupferverbindungen beitragen. So wurde jüngst die Generierung von ROS an den Oberflächen verschiedener Metallsalze in wässrigen Suspensionen festgestellt (SAWAI ET AL. 1998, SAWAI 2003, SAWAI UND YOSHIKAWA 2004). Dabei stellten sich aktiver Sauerstoff und Wasserstoffperoxyd als die primären Faktoren der antifungalen und antibakteriellen Wirkung von Magnesiumoxid und Zinkoxid heraus. Ein ähnlicher Prozess könnte auch in Suspensionen unlöslicher Kupferverbindungen vorliegen.

### 3.5.2 Schwefelfungizide

Bei der Kontrolle des Apfelschorfes im ökologischen Obstbau ist Schwefel zurzeit die einzige Alternative zu Kupfer. Elementarer Schwefel hat dabei nur eine schwache protektive Wirkung und ermöglicht nur eine unbefriedigende Kontrolle während der primären Infektionsphase (HAMILTON 1931, LEWIS UND HICKEY 1972, COOLEY ET AL. 1991, ELLIS ET AL. 1998, HOLB UND HEIJNE 2001, HOLB ET AL. 2003). Besonderes in Ländern in denen Kupfer verboten ist besteht aus diesem Grund ein neuerliches, großes Interesse an Schwefelkalk, der über eine begrenzte postinfektionelle Wirksamkeit verfügt (HAMILTON UND KEITT 1928, HAMILTON 1931, MILLS 1944, HOLB UND HEIJNE 2001, HOLB ET AL. 2003). Die postinfektionelle Wirkung des Schwefelkalks ist bereits seit Ende der 20er Jahre bekannt (HAMILTON UND KEITT 1928, HAMILTON 1931). Die Mills'schen Infektionsperioden wurden mit dem Ziel entwickelt u. a. die Applikation von Schwefelkalk möglichst exakt zu terminieren, um deren Effektivität zu erhöhen (MACHARDY 1996).

Schwefelkalk ist sehr phytotoxisch. Unglücklicherweise erhöht sich seine Phytotoxizität unter feuchten Bedingungen (KELDERER ET AL. 1997, TATE ET AL. 2000, HOLB UND HEIJNE 2001, TRAPMAN 2002, ZIMMER 2002, HOLB ET AL. 2003). Daher ist Schwefelkalk bei feucht-kaltem Klima kein geeigneter Ersatz für Kupferfungizide. Ohne Kupfer wäre eine ausreichende Schorfbekämpfung im ökologischen Obstbau an der Niederelbe derzeit nicht möglich (PALM 2005).

### 3.5.3 Alternativen zu Kupfer- und Schwefelfungiziden

Seit längerem ist man im ökologischen Obstbau bemüht Alternativen für die zuvor beschriebenen Kupfer- und Schwefelfungizide zu finden. Auf die zahlreichen, in der Regel erfolglos getesteten Substanzen (u. a. Gesteinsmehle, Tonerden, Algenpräparate,

Pflanzenaufgüsse, -extrakte, -öle, Kompost- und Humuspräparate) wird in dieser Arbeit nicht eingegangen. Einen Überblick hierzu gibt ein Bericht der BBA (GOLBA 2002).

Aufgrund der Literaturhinweise sowie den am Institut geleisteten, viel versprechenden Vorarbeiten (SCHULZE UND SCHÖNHERR 2003) wurden für die Untersuchungen in der vorliegende Arbeit nur Calciumhydroxid, Kaliumcarbonat sowie das Tensid Glucopon 215 CSUP in Betracht gezogen. Alle drei Substanzen sind umweltfreundlich und somit für eine mögliche Schorffkontrolle im ökologischen Anbau geeignet. Calcium- und Kaliumsalze finden im integrierten, aber auch im ökologischen Anbau als Blatt- und Bodendünger Verwendung. Tenside wie das Alkylpolyglycosid Glucopon 215 CSUP werden benötigt, um die Retentions- und Spreitungseigenschaften von Spritzflüssigkeiten zu verbessern. Kommerzielle Kupfer- und Schwefelpräparate, wie sie im ökologischen Obstbau verwendet werden, sind ebenfalls formuliert und enthalten Tenside. Alkylpolyglycoside sind Tenside auf Zuckerbasis, die u. a. in Kosmetikprodukten enthalten sind und über sehr gute ökotoxikologische Eigenschaften verfügen (STEBER ET AL. 1996, HILL UND RHODE 1999). Zudem sind Alkylpolyglycoside nicht phytotoxisch (GARST 1996, STEBER ET AL. 1996).

#### 3.5.3.1 Calciumhydroxid

Calciumhydroxid war bereits Bestandteil der umfangreichen Studie von HAMILTON (1931). Er beobachtete, dass die Ausbringung von Calciumhydroxid vor erfolgter Inokulation nur wenig effektiv war. Bei Sprüh-Applikationen 16 bzw. 90 Stunden nach Inokulation bei Temperaturen von 12 bzw. 16°C konnte die Anzahl der Läsionen gegenüber der Kontrolle auf 27 bzw. 58 % reduziert werden. Hamilton kommentierte die Ergebnisse folgendermaßen: „Hydrated or stone lime 3-50, applied as spray, ..., may exhibit some fungicidal properties of their own under certain conditions.“

Erst knapp 70 Jahre später wurde in Australien wieder ein Versuch unternommen Birnenschorf (*Venturia pirinia* Aderhold) mit Calciumhydroxid zu bekämpfen (WASHINGTON ET AL. 1998). Die protektiven Spritzungen konnten die Befallsrate zwar reduzieren, waren jedoch sehr viel weniger effektiv als Spritzungen mit konventionellen Vergleichsfungiziden.

SCHULZE UND SCHÖNHERR (2003) beobachteten, dass eine Behandlung mit einer Calciumhydroxid-Suspension 24 Stunden nach erfolgter Inokulation die Konidien und Keimschläuche von *V. inaequalis* schnell abtötete und der weitere Keimverlauf dadurch gestoppt wurde. Erfolgte die Behandlung jedoch vor erfolgter Inokulation hatte die Suspension keinen Effekt. Die Unwirksamkeit der Behandlung vor Inokulation erklärt sich dadurch, dass Calciumhydroxid durch die Reaktion mit dem CO<sub>2</sub> der Luft sehr schnell in das

unwirksame Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) und Calciumbicarbonat ( $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ ) umgewandelt wird (RÖMPP 1995). Die Autoren stellten daher die Hypothese auf, dass die Wirksamkeit von Calciumhydroxid auf dem hohen pH-Wert von 12,4 beruht. Alle drei Studien stimmen jedenfalls darin überein, dass Calciumhydroxid als protektives Fungizid ungeeignet ist.

### 3.5.3.2 Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP

SCHULZE UND SCHÖNHERR (2003) konnten zeigen, dass Kaliumcarbonat ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) sowie die Alkylpolyglycoside Plantacare 1200 UP und Glucopon 215 CSUP (GP) die Sporenkeimung von Konidien von *V. inaequalis* verhinderten und die Keimschläuche abtöteten. Bei Behandlungen vor Inokulation verhinderte Kaliumcarbonat ab einer Konzentration von  $4,3 \text{ g l}^{-1}$  die Keimung völlig. Die Tenside verringerten die Keimrate. Bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation tötete Kaliumcarbonat ( $\geq 35 \text{ g l}^{-1}$ ) alle Konidien und Keimschläuche. GP hemmte das Keimschlauchwachstum bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation ab einer Konzentration von  $1,0 \text{ g l}^{-1}$  vollständig.

Für die Wirksamkeit von Kaliumcarbonat könnte nach Meinung der Autoren ebenfalls der hohe pH-Wert der Lösungen von 11,4 verantwortlich sein. Dem widerspricht, dass die Wirkung eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit aufwies.

Für die Wirksamkeit der Tenside kommt der pH-Wert nicht in Betracht. Über sie ist aber bekannt, dass sie toxisch für Zellen und Gewebe sind (KRISTEN ET AL. 1993). Verantwortlich hierfür wird eine Schädigung der Zellmembran gemacht (MÜLLER ET AL. 1999).

## 4 Das *in vitro* Testsystem

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete *in vitro* Testsystem basiert auf enzymatisch isolierten Kutikularmembranen (CM = cuticular membrane) von Blättern von *Malus × domestica* (SCHULZE 2005). Die isolierten CM stellen eine natürliche Oberfläche dar, die *in vivo* Bedingungen simuliert. Die Konidien von *V. inaequalis*, die als Inokulum verwendet werden, zeigen auf den CM, anders als auf anderen Oberflächen, ein differenziertes Verhalten, das dem von SMEREKA ET AL. (1987) beschriebenen auf Apfelblättern gleicht (SCHULZE 2005). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten CM stammten von voll entfalteten, dunkelgrün gefärbten Apfelblättern (Abschnitt 7.2.1). Die Kutikula hat bei Blättern dieses Alters ihre endgültige Dicke bereits erreicht (HELLMANN UND STÖSSER 1992). Jüngere Blätter, mit dünner Kutikula sind für die Isolation und anschließende Verwendung schlecht geeignet, weil sie sehr leicht zerreißen (SCHULZE 2005). Die Verwendung von voll entfalteten Blättern, deren Kutikula bereits die volle Dicke erreicht hat, beinhaltet die Annahme, dass die Kutikula nicht an der Ausprägung der ontogenen Resistenz (Altersresistenz) oder anderen Formen der Resistenz beteiligt ist, was durch verschiedene Studien belegt ist (GESSLER UND STUMM 1984, VALSANGIACOMO UND GESSLER 1988, ORTEGA ET AL. 1998, SCHULZE 2005).

Das Testsystem ermöglicht eine direkte mikroskopische Untersuchung der fungiziden Effekte auf Ebene der Spore (SCHULZE 2005). Die Entwicklung der Spore kann von der Auskeimung über die Penetration der CM bis hin zur Ausbildung primärer Infektionsstrukturen beobachtet werden. Dabei sind die Lebendbetrachtung sowie der Einsatz von Vitalfarbstoffen zur Beurteilung physiologischer Prozesse der Spore möglich. Somit können noch vor einer teuren und aufwendigen Testung im Freiland wichtige Erkenntnisse über die Wirkung einer fungiziden Substanz schnell und unabhängig von der Saison gewonnen werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für den Einsatz des Testsystems liegt in der Beobachtung begründet, dass es sowohl in Versuchs- als auch in kommerziellen Anlagen im Herbst trotz Fungizideinsatzes zum Auftreten von Läsionen kommt, auch wenn die Anlage über die gesamte Vegetationsperiode als „schorffrei“ bezeichnet werden konnte (MACHARDY 1996, LI UND XU 2002). In einer neueren zu diesem Phänomen vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass Konidien die Unterseite von Apfelblättern jeden Alters infizieren konnten (LI UND XU 2002). Das Myzelwachstum war bei den jungen Blättern deutlich schneller und auch Symptome wurden früher sichtbar als bei alten. Auf sehr alten Blättern wuchs das Myzel nur langsam und führte zu keinen sichtbaren Symptomen. Einige der symptomlosen Läsionen produzierten aber trotzdem Konidien. Bei Fungizidtestungen an Apfelbäumen im Freiland

oder Sämlingen im Gewächshaus wird die Effektivität des Fungizids anhand der sichtbaren Symptome beurteilt. Da sich immer ein Großteil der Blätter in der Phase der ontogenen Resistenz befindet, während der es zur Ausbildung von Symptomen kommt, die allerdings mit dem bloßen Auge nicht sichtbar sind, (LI UND XU 2002), kann diese Beurteilungsmethode zu einer falschen Einschätzung der Wirkung eines Fungizids führen.



## 5 Fluoreszenzfarbstoffe zur Untersuchung physiologischer Prozesse in pilzlichen Sporen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceindiacetat (FDA) und 5-Cyano-2,3-Ditolyltetrazoliumchlorid (CTC) zur Untersuchung physiologischer Prozesse bzw. zur Bestimmung der Vitalität von Konidien von *V. inaequalis* eingesetzt.

FDA ist ein Indikator der Intaktheit der Zellmembran sowie der Esteraseaktivität (BREEUWER ET AL. 1995). Dabei kann das unpolare, farblose und nicht fluoreszierende FDA frei in die intakte Zelle eindringen, wo es von zelleigenen, unspezifischen Esterasen zu Fluorescein hydrolysiert wird. Fluorescein ist polar und akkumuliert somit in Zellen mit intakter Membran. Unter UV-Anregung, bei einem Exzitationsmaximum von 494 nm, fluoresziert es, mit einem Emissionsmaximum von 520 nm grün. Die erste Anwendung von FDA für Konidien von *V. inaequalis* wurde bereits 1987 von BECKER UND BURR in Form eines Abstracts publiziert.

CTC gehört zur Gruppe der Tetrazoliumsalze und ist ein Indikator für die Atmungsaktivität. Tetrazoliumsalze fungieren dabei als Elektronenakzeptoren und werden auf Ebene der Atmungskette durch Dehydrogenasen reduziert (WALLEY UND GERMIDA 1995). Die Umwandlung in die Farbstoffprodukte, die so genannten Formazane, geschieht nur in vitalen Zellen mit aktiven Mitochondrien. CTC bildet als einziges bisher bekanntes Tetrazoliumsalz ein rot fluoreszierendes Formazan (Exzitationsbereich 400 - 450 nm, Emissionsmaximum 602 nm) und wird zur Kontrolle des Trinkwassers auf Verunreinigungen mit Bakterien eingesetzt (RODRIGUEZ ET AL. 1992, SCHAULE ET AL. 1993). Zur Vitalitätsbestimmung pilzlicher Sporen wurden bislang nur Tetrazoliumsalze verwendet, deren Formazane nicht fluoreszieren. Eingesetzt wurde vor allem Tetrazoliumbromid (MTT) (AN UND HENDRIX 1988, JIANG UND ERWIN 1990, MILLER ET AL. 1993, WALLEY UND GERMIDA 1995). MTT wurde auch zur Testung der Sensitivität verschiedener Isolate von *V. inaequalis* gegenüber Fungiziden der Wirkstoffklasse der Strobilurine eingesetzt (STEINFELD ET AL. 2001). Strobilurine, zu denen auch der Wirkstoff Kresoxim-methyl gehört, hemmen die Atmung durch Bindung an das Q<sub>o</sub>-Zentrum (Ubiquinonoxidationszentrum) des mitochondrialen Cytochrom *b*.

## 6 Zielsetzungen der Arbeit

Grundlegendes Ziel der Arbeit war es, nähere Erkenntnisse über die Wirkungsweisen und -mechanismen einiger ausgewählter fungizider Substanzen zu gewinnen. Neben verschiedenen Kupferverbindungen waren dies Substanzen, die für die biologische Bekämpfung geeignet erscheinen und potentielle Alternativen zu Kupfer- und Schwefelfungiziden darstellen (Abschnitt 3.5.3). Die Erkenntnisse sollten mit Hilfe des *in vitro* Testsystems (Abschnitt 4) sowie begleitender Untersuchungen auf Ebene der Spore gewonnen werden. Dabei sollten die im Folgenden aufgeführten Aspekte, die sich aus dem oben beschriebenen Kenntnisstand der Literatur ergaben, näher untersucht werden.

### 6.1 Wirkungsweise von Kupferverbindungen

Die Wirkungsweise verschiedener Kupferverbindungen sollte mit dem Ziel untersucht werden, die im Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Strategien zur Minimierung der ausgebrachten Kupfermengen zu optimieren.

Ausgehend vom bisherigen Wissensstand (Abschnitt 3.5.1.1) sollte dabei zunächst die Rolle der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen bei der Wirkung der Kupferverbindungen untersucht werden. Dazu wurden Kupferverbindungen mit unterschiedlichen Wasserlöslichkeiten sowie deren Filtrate auf ihre protektive Wirkung gegen Konidien von *V. inaequalis* getestet. Verwendet wurden das leichtlösliche Kupfersulfat, das schwerlösliche Kupferhydroxid und das unlösliche Kupferoxid sowie die Filtrate der beiden letztgenannten Substanzen. Neben der Aussage, ob eine Keimhemmung vorliegt oder nicht, sollten mit Hilfe der unter Abschnitt 5 genannten Fluoreszenzfarbstoffe möglichst auch Kenntnisse darüber gewonnen werden, welche physiologischen Prozesse in der Spore gestört werden, die schließlich das Auskeimen verhindern.

Danach sollte untersucht werden, ob Kupfersulfat und Kupferhydroxid eine postinfektionelle Wirkung besitzen und welches Zeitfenster zur Verfügung steht, um primäre Stromata abzutöten. In diesem Zusammenhang sollte auch geklärt werden, welchen Einfluss Nässe für die Wirkung der beiden Kupfersalze hat. Die postinfektionelle Wirkung wurde dabei mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes FDA (Abschnitt 5) anhand der Anzahl vitaler primärer Stromata bonitiert.

Neben dem CM basierten Testsystem, das eher qualitative Aussagen liefert, sollte unter Verwendung von FDA und eines Spektralfotometers ein zusätzliches System entwickelt

werden, dass eher quantitative Aussagen über die Wirkung der Kupferverbindungen auf Konidien von *V. inaequalis* liefert.

Schließlich sollte noch untersucht werden, ob ROS, wie sie in Suspensionen von Zink- und Magnesiumoxid generiert werden (Abschnitt 3.5.1.1), für die Wirkung von Suspensionen schwer- bzw. unlöslicher Kupferverbindungen in Betracht kommen. Die Menge an generierten ROS wurde dabei mittels Chemilumineszenz unter Verwendung eines Acridiniumesters gemessen (Takahashi et al. 1993).

## **6.2 Wirkungsweise von Calciumhydroxid**

Da Calciumhydroxid über keine protektive Wirkung verfügt, ist eine erfolgreiche Schorfbekämpfung nur mit einer gezielten Behandlungsstrategie denkbar (Abschnitt 3.5.1). Für eine solche gezielte Strategie wäre eine postinfektionelle Wirkung von großem Vorteil.

Ziel der Untersuchungen mit Calciumhydroxid war es daher, zu ermitteln, ob Calciumhydroxid eine postinfektionelle Wirkung besitzt und welches Zeitfenster für die Applikation postinfektioneller Behandlungen zur Verfügung steht. Als Positivkontrolle wurde Schwefelkalk eingesetzt, dessen postinfektionelle Wirkung bekannt ist (Abschnitt 3.5.2).

Neben der Untersuchung der postinfektionellen Wirkung sollte geklärt werden, welcher Mechanismus der Wirkung von Calciumhydroxid zu Grunde liegt. Aufgrund des vorhandenen Wissensstandes sollte dabei vor allem die Rolle des pH-Wertes untersucht werden (Abschnitt 3.5.3.1). Dazu wurden vergleichend Untersuchungen mit KOH-Lösungen verschiedener pH-Werte durchgeführt.

## **6.3 Wirkungsweise von Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP**

Aufgrund der viel versprechenden Voruntersuchungen (Abschnitt 3.5.3.2) sollten auch Kaliumcarbonat und GP hinsichtlich ihrer postinfektionellen Wirkung getestet werden. Untersucht werden sollten vor allem der Einfluss der Konzentration, der Inkubationsdauer der Behandlung sowie des Behandlungszeitpunktes. Dabei wurde mittels FDA zum Einen der Effekt auf die Vitalität der Spore untersucht und zum Anderen der Effekt auf die Anzahl vitaler primärer Stromata.

## 7 Material und Methoden

### 7.1 Material

#### 7.1.1 Geräte

|                                                                                                                         |                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Autoklav, Varioklav                                                                                                     | H+P Labortechnik GmbH,<br>Oberschleißheim           |
| Digitalkamera, AxioCam                                                                                                  | Carl Zeiss, Göttingen                               |
| Fluoreszenzfiltersatz für FDA und CTC,<br>Zeiss Filtersatz No. 09 (Exzitation: BP 450 - 490 nm,<br>Emission: LP 515 nm) | Carl Zeiss, Göttingen                               |
| Fluoreszenzfiltersatz für KOH-Anilinblau,<br>Zeiss Filtersatz No. 02 (Exzitation: G 365 nm, Emission:<br>LP 420 nm)     | Carl Zeiss, Göttingen                               |
| Fluoreszenz-Glasstandard für Specord M500,<br>GG 17 (238 - 526 nm)                                                      | Carl Zeiss Jena, Jena                               |
| Fluoreszenzmesseinsatz für Specord M500                                                                                 | Carl Zeiss Jena, Jena                               |
| Glasfiltrationsapparat, GV 050/3                                                                                        | Schleicher&Schuell, Dassel                          |
| Inkubator, Incubator MIR 153                                                                                            | Sanyo Electric Co., Ltd.,<br>Gunma, Japan           |
| Klimaschrank                                                                                                            | Rumed - Rubarth Apparate<br>GmbH, Laatzen           |
| Kolkwitz-Planktonzytometer                                                                                              | Hydro-Bios, Kiel                                    |
| Lichtmikroskop, AxioPlan 2                                                                                              | Carl Zeiss, Göttingen                               |
| Lumineszenzmessgerät, Luminometer ‚junior‘                                                                              | Berthold Technologies GmbH<br>& Co. KG, Bad Wildbad |
| pH-Meter, pH-/Ionometer 692                                                                                             | Metrohm AG, Herisau, Schweiz                        |
| Spektralfotometer, Specord M500                                                                                         | Carl Zeiss Jena, Jena                               |
| Sterilwerkbank, Kojair                                                                                                  | Kojair Tech Oy, Vilppula,<br>Finnland               |

|                                                                              |                        |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Ultra-Turaxx                                                                 | Janke+Kunkel, Staufen  |
| Vakuumpumpe, Vacuum System B-172 und<br>Vacuum/Distillation Controller B-168 | Büchi, Flawil, Schweiz |

### 7.1.2 Materialien

|                                                 |                                             |
|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 6-Well-Macroplatten                             | Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen      |
| Cellophanmembranen, Cellophan 235 P             | Pütz GmbH und Co. Folien KG,<br>Taunusstein |
| Membranfilter, RC-L55, Porendurchmesser 0,45 µm | Schleicher&Schuell, Dassel                  |
| Miracloth, Filtergewebe                         | CN Biosciences Inc. La Jolla,<br>CA, USA    |
| Parafilm                                        | American National Can,<br>Chicago, IL, USA  |
| Petrischalen, Durchmesser 8 cm                  | Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen      |

### 7.1.3 Chemikalien

|                                                          |                                        |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Agar-Agar, hochreine Qualität                            | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Anilinblau WS (C. I. Nr. 42755)                          | E. Merck, Darmstadt                    |
| Borax (di-Natriumtetraborat-Decahydrat), ≥ 99,5 %, p. a. | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Calciumcarbonat (CaCO <sub>3</sub> ), > 99,0 %, p. a.    | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Calciumhydroxid (Ca(OH) <sub>2</sub> ), > 96 %           | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| Citronensäure Trinatriumsalz Dihydrat, ≥ 99 %, p. a.     | Carl Roth GmbH, Karlsruhe              |
| CTC (5-Cyano-2,3-Ditolyltetrazoliumchlorid)              | Polysciences Europe GmbH,<br>Eppelheim |

|                                                                                             |                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Discus, Fungizid mit dem Wirkstoff Kresoxim-methyl, Wirkstoffgehalt 50 %                    | Stähler Deutschland GmbH & Co. KG, Stade |
| FDA (Fluoresceindiaceetat)                                                                  | Riedel-de Haën, Seelze                   |
| Fluorescein (freie Säure), Farbstoffgehalt 95 %                                             | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz        |
| Glucopon 215 CSUP                                                                           | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz        |
| Glycerin, für die Fluoreszenzmikroskopie                                                    | E. Merck, Darmstadt                      |
| Immersionsöl (Immersol <sup>TM</sup> 518F)                                                  | Carl Zeiss, Göttingen                    |
| Kaliumcarbonat ( $\text{KCO}_3$ ), > 99 % p. a.                                             | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                |
| Kaliumhydroxid (KOH), p. a., in Plätzchen                                                   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                |
| Kaliumphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), dibasisch, wasserfrei, > 99,0% (T)             | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz        |
| Katalase aus Rinderleber, Pulver, Zellkultur getestet, 2000-5000 Einheiten $\text{mg}^{-1}$ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim     |
| Kupfer(II)hydroxid ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ), technisch                                  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim     |
| Kupfer(II)oxid ( $\text{CuO}$ ), rein                                                       | Riedel-de Haën, Seelze                   |
| Kupfer(II)sulfat ( $\text{CuSO}_4$ ), wasserfrei, reinst                                    | Riedel-de Haën, Seelze                   |
| Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), $\geq 99,5$ % (T)                                           | Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz        |
| Natriumhypochloritlösung 12 % Cl                                                            | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                |
| Pektinase, Fructozym P                                                                      | Erbslöh, Geisenheim                      |
| PMAC (10-Methyl-9-Phenoxycarbonyl-Acridinium Fluorosulfonat)                                | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim     |
| Potato Dextrose Agar (PDA), Difco PDA                                                       | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg        |

|                                                                                                                            |                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Schwefelkalk                                                                                                               | ÖON, Öko-Obstbaugruppe<br>Norddeutschland, Versuchs-<br>und Beratungsring e.V., Jork |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan Hydrochlorid<br>(Trizma <sup>®</sup> hydrochloride), Zellkultur getestet, $\geq 99,0\%$ (T) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim                                              |
| Tween 20, nichtionisches Tensid                                                                                            | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim                                              |
| Zinkoxid (ZnO), Nanopulver                                                                                                 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Steinheim                                              |

#### 7.1.4 pH-Werte verwendeter Lösungen und Suspensionen

Tabelle 7-1. pH-Werte verwendeter Lösungen und Suspensionen.

| Lösung/Suspension | Konzentration           | pH-Wert |
|-------------------|-------------------------|---------|
| Calciumcarbonat   | 6,75 g l <sup>-1</sup>  | 8,3     |
| Calciumhydroxid   | 5 g l <sup>-1</sup>     | 12,45   |
|                   | gesättigte Lösung       | 12,45   |
| Kupferhydroxid    | 1 mmol l <sup>-1</sup>  | 6,6     |
|                   | 10 mmol l <sup>-1</sup> | 6,7     |
| Kupferoxid        | 1 mmol l <sup>-1</sup>  | 6,6     |
|                   | 10 mmol l <sup>-1</sup> | 6,6     |
| Kupfersulfat      | 1 mmol l <sup>-1</sup>  | 5,7     |
|                   | 10 mmol l <sup>-1</sup> | 4,9     |
| Schwefelkalk      | 1,5 %                   | 11,2    |
| Zinkoxid          | 1 mmol l <sup>-1</sup>  | 7,5     |
|                   | 10 mmol l <sup>-1</sup> | 7,5     |

## 7.2 Methoden

### 7.2.1 Isolation der Kutikularmembranen

Für die Versuche wurden isolierte Kutikularmembranen (CM) von *Malus × domestica* ‚Gloster‘ und ‚Elstar‘ verwendet. Dazu wurden in den Jahren 2003 und 2004 Blätter (viertes und fünftes voll entfaltetes Blatt) von Neutrieben der genannten Sorten in einer Anlage des Versuchsbetriebes der Universität Hannover in Ruthe gesammelt. Die Isolation erfolgte enzymatisch nach der Methode von SCHÖNHERR UND RIEDERER (1986). Verwendet wurden nur die adaxialen astomatären CM. Dazu wurden die Blätter auf der Unterseite mit einem wasserfesten Filzstift markiert. Aus den Blättern wurden dann Blattscheiben (BS) von 2 cm Durchmesser ausgestanzt. Die BS wurden in eine 3%ige Pektinase-Lösung gegeben, die mit Citratpuffer ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) und  $\text{KOH}_{\text{ges.}}$  auf einen pH-Wert von 3 eingestellt war. Anschließend wurden die BS vakuumfiltriert. Um Mikroorganismenbefall zu verhindern, wurde der Lösung Natriumazid ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ) zugegeben. Die BS wurden bei  $20^\circ\text{C}$  inkubiert, bis sich die Lösung trüb gefärbt und sich die CM abgelöst hatten. Danach wurden die CM mehrfach mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  gespült. Um phenolische Substanzen, die sich bei der Isolierung bilden können, heraus zu waschen, wurden die CM für 48 Stunden in  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  Boraxpuffer aufbewahrt. Nach erneutem Spülen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  wurden die markierten abaxialen CM aussortiert und verworfen. Die adaxialen CM wurden zum Trocknen auf Teflonplättchen gezogen und mit einem Luftstrahl geglättet. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur waren die CM trocken. In einer verschlossenen Plastikdose konnten die CM bei  $8^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert werden.

### 7.2.2 Produktion der *Venturia inaequalis* Konidien

Als Inokulum wurden Konidien aus einer *in vitro* Kultur von *V. inaequalis* verwendet. Das Isolat wurde im Jahr 2000 an der BBA in Dossenheim von Bäumen der Sorte ‚Elstar‘ isoliert und auf PDA ( $39 \text{ g l}^{-1}$ ) erhalten (SCHULZE 2005). Die Konidien des Isolats zeichneten sich durch eine sehr hohe Keimrate aus. Die Infektiosität des Isolats wurde mehrfach auf Apfelsämlingen getestet.

Die Produktion der Konidien erfolgte auf Cellophanmembranen (PARKER ET AL. 1995, SCHULZE 2005). Hierzu wurden zunächst Petrischalen mit PDA ( $39 \text{ g l}^{-1}$ ) befüllt, worauf eine Cellophanmembran mit einem Durchmesser von 8 cm gelegt wurde. Die Cellophanmembranen waren zuvor in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  eingelegt, in Aluminiumfolie eingewickelt und



für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert worden. Unter der Sterilbank wurden die Petrischalen mit 1 ml einer Myzelsuspension beimpft. Zur Herstellung der Suspension wurde Myzel der Erhaltungskultur in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  gegeben und mit einem Ultra-Turaxx zerkleinert. Die Myzelsuspension wurde in der Petrischale leicht geschwenkt, so dass sich die Suspension gleichmäßig auf der Cellophanmembran verteilte. Abschließend wurden die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Zur Herstellung der Konidiensuspension wurde die mit dem Myzelrasen bewachsene Cellophanmembran nach vier bis fünf Tagen abgenommen und in ein mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  befülltes steriles Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach dreiminütigem Schütteln per Hand wurde die entstandene Sporensuspension durch drei Lagen Miracloth in ein anderes Gefäß überführt. Die Sporendichte der Suspension wurde mittels eines Kolkwitz-Planktonzytometers unter dem Lichtmikroskop ermittelt (KOLLAR 1998) und auf den gewünschten Titer eingestellt. Bei den Versuchen auf CM und auf BS wurde mit einem Sporentiter von ca.  $1 \times 10^4$  und bei den spektralfotometrischen Versuchen mit einem Titer von  $1,25 \times 10^5$  Konidien  $\text{ml}^{-1}$  gearbeitet. Die Suspension wurde abschließend auf Eppendorfgefäße verteilt (1 ml pro Gefäß) und sofort bei -20°C eingefroren. Die Suspension konnte so drei bis vier Wochen ohne Abnahme der Keimrate gelagert und nach dem Auftauen zur Inokulation verwendet werden.

### 7.2.3 Inokulation der Kutikularmembranen

Für die verschiedenen Versuche mit CM wurden zunächst Petrischalen mit 40 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  befüllt. Wenn nicht anders angegeben, wurden für die Versuche CM der Sorte ‚Gloster‘ verwendet. Die CM wurden mit einer Pinzette auf die Wasseroberfläche gegeben. Die morphologische Außenseite musste dabei nach oben zeigen (SCHULZE 2005). Je nach Experiment erfolgte die Inokulation vor oder nach der entsprechenden Behandlung mit der zu testenden Substanz. Zur Inokulation wurde ein 5  $\mu\text{l}$  Tropfen Konidiensuspension ( $\approx 50$  Konidien  $5 \mu\text{l}^{-1}$ ) in die Mitte der CM pipettiert (Abbildung 3-1 B). Nach erfolgter Inokulation wurden die Petrischalen, falls nicht anders beschrieben, mit ihrem Deckel und mit Parafilm verschlossen. Durch das Verschließen entstand in der Petrischale eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre, die das Eintrocknen des Tropfens verhinderte. Die Inkubation erfolgte für die jeweils angegebene Zeit immer bei 20°C und im Dunkeln.

### 7.2.4 Inokulation der Blattscheiben

Für die Versuche mit BS wurden die zweiten voll entfalteten Blätter von Neutrieben der Sorte ‚Elstar‘ gesammelt. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus kultiviert und waren auf der

Unterlage M9 veredelt. Die Oberflächen der Blätter wurden durch 90sekündiges Schütteln in einer Natriumhypochloritlösung (0,75 %) sterilisiert. Nach zweimaligem Spülen in sterilisiertem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  wurden die Blätter zum Trocknen auf Krepppapier gelegt. Mit einem Korkbohrer wurden dann BS mit einem Durchmesser von 0,8 cm ausgestanzt. Diese wurden mit der abaxialen Seite in mit Wasseragar (1 %) befüllte Petrischalen gelegt. Die BS wurden schließlich mit einem 10  $\mu\text{l}$  Tropfen Konidiensuspension ( $\approx 100$  Konidien  $10 \mu\text{l}^{-1}$ ), der in die Mitte der BS pipettiert wurde, inokuliert. Die Petrischalen wurden analog der Inokulation von CM mit ihrem Deckel und mit Parafilm verschlossen. Alle Arbeitsschritte, von der Sterilisation der Blattscheiben bis zum Verschließen der Petrischalen, erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Inkubation erfolgte bei  $20^\circ\text{C}$  in einem Klimaschrank, der für 16 Stunden pro Tag mit  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR beleuchtet wurde.

### 7.2.5 Experimentelles Design der Versuche auf Kutikularmembranen und Blattscheiben

Das verwendete *in vitro* Testsystem ist in hohem Maße standardisiert (SCHULZE 2005). Die Bedingungen für jede Petrischale innerhalb des Klimaschranks bzw. für jede CM oder BS innerhalb einer Petrischale waren identisch und es gab keine unkontrollierten Variablen, die die Ergebnisse hätten beeinflussen können. Daher konnte jede CM bzw. BS in einer Petrischale als wirkliche Wiederholung betrachtet werden, und ein spezifisches experimentelles Design zur Abschätzung zufälliger Effekte war nicht erforderlich.

Für jede Behandlung eines Experiments wurden jeweils zehn CM bzw. BS in eine Petrischale gegeben, und es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Jedes Experiment bestand somit aus 20 Beobachtungen je Behandlung.

Zu jedem Experiment wurde die Keimrate der verwendeten Sporensuspension auf sechs CM in einer Petrischale ermittelt. Lag die ermittelte Keimrate in einem Experiment unter 80 %, so wurde dieses verworfen und das Experiment wiederholt. Bei den Experimenten mit BS wurde die Keimrate ebenfalls auf CM ermittelt.

### 7.2.6 Mikroskopische Auswertung der Versuche auf Kutikularmembranen

#### 7.2.6.1 Herstellung der FDA- und CTC-Lösungen zur Vitalfärbung

Die FDA-Lösung wurde nach der Methode von HAMEL ET AL. (1990) hergestellt. Nach dieser wurden zunächst 5 mg FDA in 1 ml Aceton gelöst. Diese Lösung war bei  $8^\circ\text{C}$  im Dunkeln mehrere Monate haltbar. Kurz vor Verwendung wurden 20  $\mu\text{l}$  dieser Lösung in 500  $\mu\text{l}$  eines Tris-Puffers ( $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7,4) pipettiert. Diese gepufferte FDA-Lösung musste immer

wieder frisch hergestellt werden und konnte maximal 30 Minuten verwendet werden, da sich im Laufe der Zeit kristalline Ausfällungen bildeten. Mit der FDA-Lösung inkubierte pilzliche Strukturen mit intakter Membran und Esteraseaktivität fluoreszierten unter Anregungslicht und Verwendung des Zeiss Filtersatzes No. 9 grün.

CTC wurde nach der für Bakterien beschriebenen Methode von SCHAULE ET AL. (1993) verwendet. Nach dieser wurde eine 10 mmol l<sup>-1</sup> Lösung durch Auflösen von CTC in H<sub>2</sub>O<sub>dem.</sub> hergestellt. Die CTC-Lösung war sehr lichtempfindlich und musste zur Auswertung jedes Experiments frisch hergestellt werden. Bei mit CTC-Lösung inkubierten pilzlichen Strukturen fluoreszierten die Mitochondrien unter Anregungslicht und bei Verwendung des Zeiss Filtersatzes No. 9 rot, wenn die Elektronentransportkette intakt war.

#### 7.2.6.2 Ermittlung der Keimrate

Die Keimrate der verwendeten Konidiensuspension eines jeden Experiments wurde im Hellfeld und fluoreszenzmikroskopisch ermittelt. Dazu wurde das Inokulum 24 Stunden nach Inokulation mit einer FDA-Lösung gefärbt (Abschnitt 7.2.6.3). Anschließend wurden die Anzahl der gekeimten Konidien jeder CM mittels Epifluoreszenz sowie die Anzahl der ungekeimten Konidien im Hellfeld gezählt. Die Keimrate ergab sich aus dem Verhältnis der Anzahl der gekeimten Konidien zur Gesamtanzahl der Konidien (ungekeimt + gekeimt). Als gekeimt wurden nur Konidien gewertet, die bei Anregungslicht grün fluoreszierten und mindestens einen Keimschlauch sowie ein Appressorium ausgebildet hatten.

#### 7.2.6.3 Auswertung der Effekte von Behandlungen auf die Keimung von Konidien und andere physiologische Prozesse.

Die Effekte von Behandlungen auf physiologische Prozesse und die Keimung von Konidien von *V. inaequalis* wurden unter Verwendung der Vitalfarbstoffe FDA und CTC fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Zur Anfärbung mit FDA wurde ein Objektträger in die mit Wasser befüllte Petrischale getaucht und unter die auszuzählende CM gebracht. Mit einer Pinzette wurde diese dann auf den Objektträger gezogen. Das überschüssige Wasser auf dem Objektträger wurde mit einem Stück Krepppapier abgesaugt. Auf den Inokulum-Tropfen wurden anschließend 20 µl der FDA-Lösung pipettiert. Abschließend wurde auf die CM vorsichtig und ohne dass sich Luftbläschen bildeten ein Deckglas gelegt. Die so präparierten CM konnten sofort im Hellfeld oder mittels Epifluoreszenz betrachtet werden. Die Anzahl grün oder nicht fluoreszierender ungekeimter Konidien, Konidien mit Keimschlauch sowie Konidien mit Keimschlauch und

Appressorium konnte ausgezählt werden. Bei gekeimten Konidien konnte zudem ermittelt werden, ob alle oder nur bestimmte Bereiche fluoreszierten.

Bei der Anfärbung mit CTC wurden jeweils 5 µl der CTC-Lösung auf den Inokulum-Tropfen jeder CM pipettiert, so dass sich eine CTC-Endkonzentration von 5 mmol l<sup>-1</sup> ergab. Nach 30minütiger Inkubationszeit unter Lichtausschluss wurde die überschüssige CTC-Lösung von der CM entfernt. Dazu wurde die Flüssigkeit über dem Inokulum mit einem Stück Krepppapier zunächst abgesaugt. Anschließend wurden wieder 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dem.</sub> auf dieselbe Stelle pipettiert und wieder abgesaugt. Dieser „Spülvorgang“ wurde dreimal wiederholt. Zur mikroskopischen Auswertung wurden weitere 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dem.</sub> auf die CM pipettiert. Die CM wurde dann wie zuvor beschrieben auf einen Objektträger gezogen und mit einem Deckglas bedeckt. Mittels Epifluoreszenz konnte schließlich die Anzahl gekeimter Konidien, die in atungsaktiven Regionen rot fluoreszierten, ermittelt werden.

#### 7.2.6.4 Auswertung der Effekte postinfektioneller Behandlungen auf Vitalität und Anzahl primärer Stromata

Die Effekte postinfektioneller Behandlungen auf die Anzahl und die Vitalität primärer Stromata wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Hierzu war es erforderlich die morphologischen Innenseiten, auf denen sich die Stromata ausbildeten, zu betrachten. Daher wurde ein Deckglas mit einer Pinzette unter die CM gebracht, die mit einer zweiten Pinzette auf das Deckglas gezogen wurde. Das Deckglas mit der oben schwimmenden CM wurde auf ein Blatt Krepppapier gelegt und überschüssiges Wasser auf beiden Seiten des Deckglases abgesaugt. Zwischen die Unterseite der CM und das Deckglas wurden 20 µl der FDA-Lösung pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die FDA-Lösung nicht auf die Oberseite der CM gelangte. Um zu verhindern, dass beim anschließenden Auflegen des Deckglases auf den Objektträger Farbstoff auf die Oberseite der CM gelangte, wurde auf die Stelle des zuvor abgesaugten Inokulum-Tropfens ein Tropfen Immersionsöl gegeben, das sich beim Auflegen des Deckglases verteilte. Nach 10minütiger Inkubationszeit unter Lichtausschluss konnte die Anzahl vitaler, grün fluoreszierender Stromata mittels Epifluoreszenz ausgezählt werden. Hatte eine Konidie mehr als ein Appressorium ausgebildet und die CM mehr als einmal penetriert, so wurde dies als ein Penetrationsereignis bzw. als ein Stroma gezählt.

### 7.2.7 Mikroskopische Auswertung der Versuche mit Blattscheiben

Pilzliche Strukturen in/auf BS wurden mittels der von HOOD UND SHEW (1996) beschriebenen und von ORTEGA ET AL. (1998) für *V. inaequalis* modifizierten KOH-Anilinblau-Fluoreszenz-Färbemethode sichtbar gemacht. Gemäß dieser Methode wurden die BS einer Petrischale (10 Stück) in 50 ml einer KOH-Lösung ( $1 \text{ mol l}^{-1}$ ) gegeben. Nach kurzem Aufkochen (solange, bis sich die adaxiale Epidermis der BS abgelöst hatte) wurden die BS einmal in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  und zweimal in einem Kaliumphosphat-Puffer ( $0,067 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 9,0) gespült. Anschließend wurden die adaxialen Epidermen für 10 Minuten in einer 0,05%igen Lösung aus Anilinblau und dem Kaliumphosphat-Puffer gefärbt. Nach einmaligem Spülen mit Puffer wurden die Epidermen auf Objektträger gelegt und in einer Lösung aus Glycerin und Kaliumphosphat-Puffer (1:1) fixiert. Nach dem Auflegen eines Deckglases konnten die Präparate mittels Epifluoreszenz betrachtet werden. Bei Verwendung des Zeiss Filtersatzes No. 2 fluoreszierten die pilzlichen Strukturen blau. Die Anzahl der Stromata konnte so für jede BS ausgezählt werden. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die Anzahl der Stromata ins Verhältnis zur Anzahl der gekeimten Konidien der entsprechenden Keimratenkontrolle gesetzt. Da für die Versuche auf BS Blätter der Sorte ‚Elstar‘ verwendet wurden, wurden die Keimratenkontrollen auf CM der Sorte ‚Elstar‘ durchgeführt.

### 7.2.8 Fotografie

Aufnahmen von den entsprechend präparierten CM und BS wurden mit einer Digitalkamera (Zeiss AxioCam) gemacht. Die Bilder wurden mit der Software AxioVision 3.1 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) bearbeitet.

### 7.2.9 Quantifizierung der Fluorescein-Fluoreszenz mittels Spektrofotometrie

Da sich Intensitätsunterschiede in der Fluorescein-Fluoreszenz unter dem Lichtmikroskop quantitativ nicht auswerten ließen, wurde zu diesem Zwecke eine spektrofotometrische Methode entwickelt.

Hierzu stand ein Spektrofotometer mit einem Fluoreszenz-Messeinsatz zur Verfügung. Im Probenraum des Messeinsatzes befinden sich ein Messplatz sowie ein Vergleichsmessplatz. Das Spektrofotometer misst und vergleicht bei der jeweils eingestellten Anregungswellenlänge die emittierte Fluoreszenzstrahlung der Probe und des Standards. Die Fluoreszenzstrahlung der Probe wird in % Transmission zum Standard angegeben.

In den Vergleichsmessplatz wurde ein gelbgrüner Fluoreszenz-Glasstandard für den Spektralbereich von 238 bis 526 nm eingefügt. Als effektivste Anregungswellenlänge für Fluorescein wurde 494 nm ermittelt.

Um den Farbstoffumsatz von FDA zu Fluorescein durch die Esterasen der Konidien von *V. inaequalis* zu messen, musste ein System gefunden werden, bei dem die Sporen keimen können und anschließend in Form einer Suspension in die Glasküvette des Messplatzes überführt werden konnten. Hierzu wurden die mit Wasseragar befüllten Wells von 6-Well-Macroplatten verwendet. Zunächst wurde die Oberfläche der Wells mit einer 0,1%igen Lösung aus Tween 20 behandelt, damit der Wasseragar vollständig verlaufen und sich eine plane Oberfläche bilden konnte. Anschließend wurden die Wells mit 0,5 ml Wasseragar (0,25 %) befüllt. Auf der planen Oberfläche des Wasseragars wurde das Zusammenklumpen der Sporen verhindert. Zudem war die Konzentration des Wasseragars so gewählt, dass zum Einen das Absinken der Sporen auf den Grund der Wells verhindert wurde und zum Anderen der Wasseragar noch flüssig genug war, um mit einer Pipette aufgesogen zu werden. Mit dem System konnten sowohl Behandlungen vor erfolgter Inokulation als auch Behandlungen nach erfolgter Inokulation vorgenommen werden. Je Behandlung wurde eine 6-Well-Macroplatte verwendet, so dass sechs Messungen pro Behandlung vorgenommen wurden. Jedes Experiment wurde zweimal wiederholt. Bei allen Messungen mit Sporen wurde der oben genannte Fluoreszenz-Glasstandard und eine FDA-Lösung ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ) verwendet, die analog der im Abschnitt 7.2.6.1 beschriebenen Methode für jede Messung frisch hergestellt wurde. Die Messungen erfolgten bei einer Anregungswellenlänge von 494 nm.

#### 7.2.9.1 Messungen bei Behandlungen vor Inokulation

Bei Behandlungen vor Inokulation, wurde in jedes Well je 1 ml der entsprechenden Behandlungslösung pipettiert. Anschließend wurden die Macroplatten offen in den Inkubator gestellt ( $20^{\circ}\text{C}$ , Dunkelheit). 24 Stunden später, wenn die Behandlungslösung auf der Oberfläche des Wasseragars eingetrocknet war, erfolgte die Inokulation. Hierzu wurde in jedes Well 1 ml einer Sporensuspension ( $1,25 \times 10^5$  Konidien  $\text{ml}^{-1}$ ) pipettiert. Anschließend wurden die Macroplatten mit ihrem Deckel und mit Parafilm verschlossen und zurück in den Inkubator gestellt. Nach 24 Stunden wurde die überschüssige Flüssigkeit jedes Wells abgegossen und in jedes Well 1 ml einer frisch hergestellten FDA-Lösung ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde die Lösung wieder abgegossen und jedes Well mit 1 ml einer Tris-Pufferlösung (pH 8,0) wieder aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Der Inhalt jedes Wells wurde schließlich mit der Pipette

mehrfach vorsichtig aufgesaugt und wieder abgelassen, bis sich aus Wasseragar, gekeimten Sporen und Tris-Puffer eine gleichmäßige Suspension gebildet hatte. Die Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und darin bis zur Messung aufbewahrt.

#### 7.2.9.2 Messungen bei Behandlungen nach Inokulation

Bei Behandlungen nach Inokulation wurde zunächst 1 ml einer Sporensuspension ( $1,25 \times 10^5$  Konidien  $\text{ml}^{-1}$ ) in jedes Well pipettiert. Die Macroplatten wurden dann mit einem Deckel und mit Parafilm verschlossen und bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Nach 22 Stunden erfolgten die Behandlungen. Dazu wurde zunächst die überschüssige Flüssigkeit in den Wells jeder Macroplatte abgegossen. In jedes Well wurde 1 ml der entsprechenden Behandlungslösung pipettiert und die Macroplatten anschließend wieder verschlossen. Zwei Stunden später (24 Stunden nach Inokulation) wurden die Behandlungslösungen abgegossen und in jedes Well 1 ml einer FDA-Lösung ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ) pipettiert. Danach wurde entsprechend der im Abschnitt 7.2.9.1 beschriebenen Methode verfahren.

#### 7.2.10 Detektierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Chemilumineszenz

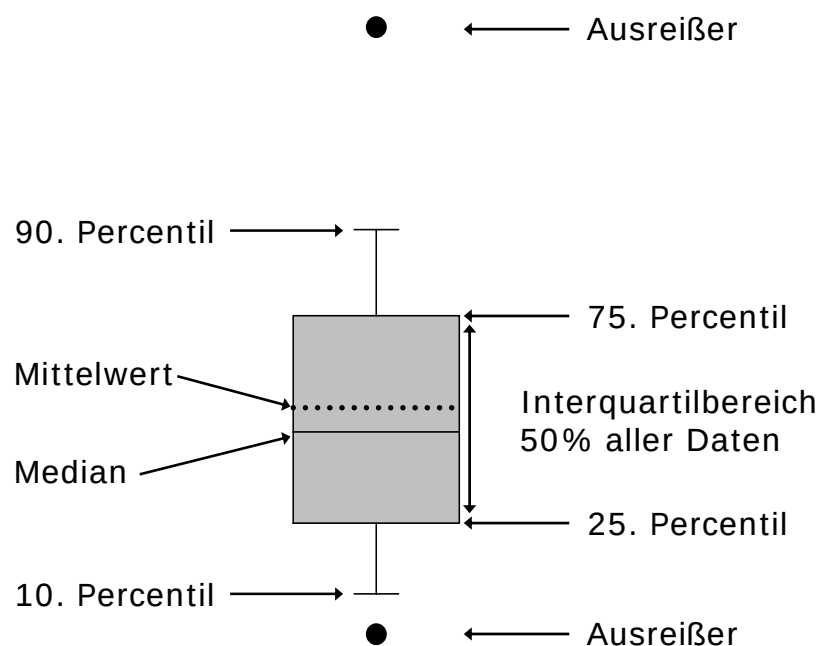
Die Generierung von ROS in wässrigen Suspensionen verschiedener Metallsalze wurde mittels Chemilumineszenz unter Verwendung eines Acridiniumesters gemessen (TAKAHASHI ET AL. 1993). Durch die Reaktion der ROS mit dem verwendeten Acridiniumester PMAC (10-Methyl-9-Phenoxycarbonyl-Acridinium Fluorosulfonat) wird Energie in Form von Lumineszenz freigesetzt. Die durch ROS induzierte Chemilumineszenz wurde mit einem Luminometer detektiert und als RLU (relative light units) angegeben. Für die Messungen wurden 250  $\mu\text{l}$  der zu testenden Suspension in ein für den Messplatz vorgesehenes Glasröhrchen pipettiert. Die Chemilumineszenzreaktion wurde durch die Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  einer PMAC-Lösung (1%) initiiert und die emittierte Lumineszenz für 10 Sekunden gemessen. Eine Katalase-Lösung wurde verwendet, um den Anteil der Lumineszenz zu bestimmen, der durch Wasserstoffperoxyd induziert wurde. Hierzu wurden 10  $\mu\text{l}$  der Katalase-Lösung ( $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) vor der Zugabe der zu testenden Suspension und der PMAC-Lösung in das Glasröhrchen pipettiert. Jede Messung wurde fünfmal wiederholt.

#### 7.2.11 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software SAS 8.1 (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). Da die auszuwertenden Daten nicht in stetiger Form vorlagen, sondern in %, wurde zur Auswertung das nichtparametrische

Rangsummenverfahren nach Wilcoxon verwendet. Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen Zweistichprobentest, der mit der Prozedur „proc npar1way“ durchgeführt wurde. Um bei multiplen Vergleichen das Niveau  $\alpha$  einzuhalten wurde eine Adjustierung mit der step-up-Methode nach HOCHBERG (1988) vorgenommen. Hierzu wurde die Prozedur „proc multtest“ verwendet. Getestet wurde zu einem globalen zweiseitigen  $\alpha = 0,05$ . Signifikante Unterschiede werden entweder in Form von p-Werten dargestellt, wobei eine Signifikanz vorliegt, wenn  $p < 0,05$ , oder in Form von Buchstaben, wobei sich Gruppen mit gleichen Buchstaben nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Zur graphischen Aufarbeitung der Daten wurde das Programm SigmaPlot 8.02 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) verwendet. Die Daten sind in der Regel in Form von Boxplots dargestellt (Abbildung 7-1). Sind die Ergebnisse ausschließlich in tabellarischer Form dargestellt, so sind arithmetisches Mittel (Mw.) und Standardabweichung (Stabw.) angegeben.



**Abbildung 7-1. Erläuterung eines Boxplots.**

Innerhalb der Box, zwischen 25. und 75. Perzentil, befinden sich 50 % der Daten aller Beobachtungen. Der Median ist zugleich das 50. Perzentil. Das heißt, dass 50 % aller Daten oberhalb des Medians bzw. unterhalb des Medians liegen. Werte, die unterhalb des 10. bzw. oberhalb des 90. Perzentils liegen sind als Ausreißer definiert.



## 7.3 Versuchsbeschreibungen

### 7.3.1 Abschnitt A: Versuche zur Wirkungsweise von Kupferverbindungen

Alle verwendeten Lösungen und Suspensionen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  hergestellt. Kupfersulfat hat eine Wasserlöslichkeit von  $1,44 \text{ mol l}^{-1}$  bei  $25^\circ\text{C}$  und Kupferhydroxid von  $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  bei  $20^\circ\text{C}$  (TOMLIN 1997). Kupferoxid ist wasserunlöslich (RÖMPP 1995).

#### 7.3.1.1 Protektive Wirkung von Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid sowie der Filtrate von Kupferhydroxid und Kupferoxid

Getestet wurden die protektiven Wirkungen von Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid in den Konzentrationen 1, 10 und  $25 \text{ mmol l}^{-1}$ . Filtrate der Suspensionen des schwerlöslichen Kupferhydroxids und des unlöslichen Kupferoxids wurden mittels Vakuumfiltration hergestellt. Vor der Filtration wurden die Suspensionen für 24 Stunden bei  $22^\circ\text{C}$  kräftig gerührt. Über einen Glasfiltrationsapparat, ausgestattet mit einem Membranfilter (Porendurchmesser  $0,45 \mu\text{m}$ ), wurden die Suspensionen filtriert. Als Positivkontrolle für die CTC-Färbung wurde das Fungizid Discus ( $0,0125 \%$ ) verwendet (Abschnitt 5).

Alle Behandlungen erfolgten 24 Stunden vor Inokulation. Dabei wurden  $5 \mu\text{l}$  der entsprechenden Behandlungslösung oder -suspension in die Mitte der CM pipettiert. Danach wurden die Petrischalen offen in den Inkubator gestellt ( $20^\circ\text{C}$ , dunkel) und die Behandlungslösung trocknete ein. Schließlich wurden  $5 \mu\text{l}$  einer Konidiensuspension ( $1 \times 10^4$  Konidien  $\text{ml}^{-1}$ ) auf die Stelle der noch sichtbaren Behandlungsrückstände pipettiert. Die Petrischalen wurden nun mit ihrem Deckel und mit Parafilm verschlossen und für weitere 24 Stunden bei  $20^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Die Effekte der protektiven Behandlungen wurden mittels der im Abschnitt 7.2.6.3 beschriebenen Fluoreszenzfärbungen ausgewertet. Bei der Testung der Filtrate wurde keine CTC-Färbung vorgenommen.

#### 7.3.1.2 Postinfektionelle Wirkung von Kupfersulfat und Kupferhydroxid

Bei den Versuchen zur postinfektionellen Wirkung von Kupfersulfat und Kupferhydroxid wurden zwei Arten von Experimenten durchgeführt. In einem Fall wurde das Inokulum nach erfolgter Behandlung nass inkubiert und im anderen trocken. Die Experimente bei nasser Inkubation wurden sowohl auf CM als auch auf BS durchgeführt. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die Anzahl der fluoreszierenden primären Stromata ins Verhältnis zur Anzahl der gekeimten Konidien der jeweiligen Keimratenkontrolle gesetzt (Abschnitt 7.2.6.2).

#### 7.3.1.2.1 Behandlungen auf Kutikularmembranen und Blattscheiben bei Inkubation in Wassertropfen

Auf CM wurden die postinfektionellen Wirkungen von Kupfersulfat-Lösungen in den Konzentrationen 29, 58, 116 und 348 mg l<sup>-1</sup> und von Kupferhydroxid-Suspensionen in den Konzentrationen 29, 58, 116 und 231 mg l<sup>-1</sup> getestet. Bei einem Kupfergehalt von 65 % entsprechen 231 mg Kupferhydroxid l<sup>-1</sup> einer Menge von 150 g Kupfer 1000 l<sup>-1</sup> ha<sup>-1</sup>. Die Behandlungen erfolgten 24 bzw. 48 Stunden nach Inokulation. Zu jedem Behandlungszeitpunkt gab es eine Kontrolle, bei der die Anzahl vitaler primärer Stromata bereits nach 24 bzw. 48 Stunden wie unter Abschnitt 7.2.6.4 beschrieben ermittelt wurde. Zudem wurde bei zusätzlichen Kupfersulfat-Behandlungen (58 und 348 mg l<sup>-1</sup>) die Inkubationszeit der Behandlungen von 15 Minuten auf 24 Stunden verlängert. Die Auswertung der postinfektionellen Effekte der Behandlungen und der Kontrollen erfolgte 72 Stunden nach Inokulation gemäß der im Abschnitt 7.2.6.4 beschriebenen Methode.

Auf BS wurde Kupferhydroxid nur in einer Konzentration (116 mg l<sup>-1</sup>) und zu einem Behandlungszeitpunkt (24 Stunden nach Inokulation) getestet. Zum Zeitpunkt der Behandlung wurde eine unbehandelte Kontrolle wie im Abschnitt 7.2.6.4 beschrieben ausgezählt. Die Auswertung der Behandlungen und einer weiteren Kontrolle erfolgte 72 Stunden nach Inokulation gemäß der im Abschnitt 7.2.6.4 beschriebenen Methode.

Der im Folgenden beschriebene Ablauf zur Durchführung der Behandlungen war auf CM und BS identisch. Zunächst wurde die überschüssige Flüssigkeit des Inokulum-Tropfens mit einem Stück Krepppapier aufgesaugt. Danach wurden auf dieselbe Stelle 5 µl der jeweiligen Behandlungslösung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bzw. 24 Stunden wurde überschüssiges Wasser und die darin gelösten Behandlungsrückstände mit einem Stück Krepppapier aufgesaugt. Auf dieselbe Stelle wurden wieder 5 µl H<sub>2</sub>O<sub>dem.</sub> pipettiert. Dieser Spülvorgang wurde dreimal wiederholt. Nach so erfolgter Behandlung wurden die Petrischalen verschlossen und für den Rest der Inkubationszeit in den Inkubator verbracht. Während der 24stündigen Inkubationszeit der Behandlungen wurden die Petrischalen ebenfalls verschlossen und zurück in den Inkubator gestellt.

#### 7.3.1.2.2 Behandlungen auf Kutikularmembranen bei trockener Inkubation

Bei diesen Experimenten erfolgte eine Behandlung mit Kupferhydroxid (116 mg l<sup>-1</sup>) 48 Stunden nach Inokulation. Die Behandlung wurde wie im Abschnitt 7.3.1.2.1 beschrieben appliziert, wobei die Behandlung nicht gespült wurde, sondern die Oberflächen der CM innerhalb einer Stunde im Luftstrom eines Ventilators getrocknet wurden. Nach der

Trocknung wurden die Petrischalen wieder verschlossen und in den Inkubator gestellt. Die Auswertung der Behandlungen sowie einer Kontrolle erfolgte 72 Stunden nach Inokulation mittels der im Abschnitt 7.2.6.4 beschriebenen Methode. Vergleichend wurden eine Behandlung mit Kupferhydroxid unter nassen Inkubationsbedingungen (Abschnitt 7.3.1.2.1) sowie eine entsprechende 72-Stunden-Kontrolle durchgeführt.

#### 7.3.1.3 Versuche zur Wirkung von Kupfersulfat und Kupferoxid bei Behandlungen auf Wasseragar

Die Effekte von Behandlungen mit Kupfersulfat und Kupferoxid vor und nach erfolgter Inokulation auf die Umsetzung von FDA zu Fluorescein wurden wie im Abschnitt 7.2.9 beschrieben spektralfotometrisch gemessen. Kupfersulfat und Kupferoxid wurden in den Konzentrationen 1, 10 und 25 mmol l<sup>-1</sup> getestet.

#### 7.3.1.4 Generierung von ROS in Suspensionen von Kupferhydroxid und Kupferoxid

Die Generierung von ROS in Suspensionen von Kupferhydroxid und Kupferoxid wurde nach der unter Abschnitt 7.2.10 beschriebenen Methode gemessen. Vergleichend wurde zur Kontrolle die Generierung von ROS in einer Zinkoxid-Suspension gemessen. Alle Suspensionen wurden in den Konzentrationen 0,5, 1, 10 und 100 mmol l<sup>-1</sup> verwendet.

### 7.3.2 Abschnitt B: Versuche zur Wirkungsweise von Calciumhydroxid

Bei diesen Versuchen sollte zum Einen die postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid und zum Anderen der zu Grunde liegende Wirkungsmechanismus untersucht werden. In den Experimenten zur postinfektionellen Wirkung von Calciumhydroxid wurde Schwefelkalk als Positivkontrolle verwendet. Um Informationen über den Wirkungsmechanismus zu erhalten wurden vergleichend Calciumcarbonat und KOH-Lösungen verschiedener pH-Werte getestet.

#### 7.3.2.1 Postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid

Zur Ermittlung der postinfektionellen Wirkung von Calciumhydroxid wurden eine Suspension ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) sowie eine gesättigte Lösung getestet. Die Wasserlöslichkeit von Calciumhydroxid beträgt  $1,6 \text{ g l}^{-1}$  (JOHANNSEN UND RADEMACHER 1999). Die gesättigte Lösung wurde mittels Filtration einer Suspension ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) analog der im Abschnitt 7.3.1.1 beschriebenen Methode hergestellt. Vergleichend wurden die Effekte einer Calciumcarbonat-Suspension ( $6,75 \text{ g l}^{-1}$ ) und von KOH-Lösungen mit den pH-Werten 11, 12, 12,4 und 12,6 getestet. Als Positivkontrolle wurde eine Schwefelkalklösung (1,5 %) verwendet. Die Applikation der Behandlungen erfolgte 24 bzw. 48 Stunden nach Inokulation gemäß der im Abschnitt 7.3.1.2.1 beschriebenen Methode mit einer Inkubationszeit der Behandlung von 15 Minuten. 72 Stunden nach Inokulation wurde die Anzahl der vitalen primären Stromata nach der im Abschnitt 7.2.6.4 beschriebenen Methode ausgezählt. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die Anzahl der primären Stromata ins Verhältnis zur durchschnittlichen Anzahl primärer Stromata einer unbehandelten 72-Stunden-Kontrolle gesetzt.

#### 7.3.2.2 Effekt des pH-Wertes auf die Vitalität gekeimter Konidien

Bei diesen Experimenten wurden zum Einen die Effekte steigender pH-Werte und zum Anderen die Effekte der Inkubationsdauer eines bestimmten pH-Wertes auf die Vitalität gekeimter Konidien von *V. inaequalis* untersucht.

Im ersten Experiment wurden KOH-Lösungen mit den pH-Werten 11, 12, 12,4 und 12,6 24 Stunden nach erfolgter Inokulation wie unter Abschnitt 7.3.1.2.1 beschrieben appliziert und nach 15 Minuten gespült. Im zweiten Experiment wurden KOH-Lösungen mit pH 12,4 appliziert, wobei die Inkubationszeiten der Behandlungslösungen 15, 30 und 60 Minuten betrugen. Die Vitalität der Konidien, Keimschläuche und Appressorien wurde mittels FDA gemäß der im Abschnitt 7.2.6.3 beschriebenen Methode untersucht. Bei der Auszählung wurden die drei Kategorien nicht, teilweise sowie vollständig fluoreszierend unterschieden.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die Anzahl einer Kategorie ins Verhältnis zur Anzahl gekeimter Konidien der entsprechenden Keimratenkontrolle gesetzt (Abschnitt 7.2.6.2).

### **7.3.3 Abschnitt C: Versuche zur Wirkungsweise von Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP**

Bei diesen Versuchen sollte zum Einen untersucht werden, ob Kaliumcarbonat und GP eine postinfektionelle Wirkung haben und zum Anderen, welchen Einfluss die Konzentration, die Inkubationsdauer der Behandlungen sowie der Behandlungszeitpunkt auf die Wirkung der beiden Substanzen haben. Diese Untersuchungen wurden auch für eine Kombination der beiden Einzelsubstanzen vorgenommen.

#### **7.3.3.1 Wirkungen auf die Vitalität gekeimter Konidien**

Bei dieser Art der Experimente ging es darum herauszufinden welche Wirkungen die zu testenden Substanzen auf die Vitalität gekeimter Konidien haben und welchen Einfluss die Konzentration, die Inkubationszeit der Behandlung sowie der Behandlungszeitpunkt haben. Die Vitalität der Konidien, Keimschläuche und Appressorien wurde mit Hilfe von FDA gemäß der im Abschnitt 7.2.6.3 beschriebenen Methode untersucht. Bei der Auszählung wurden die drei Kategorien nicht, teilweise sowie vollständig fluoreszierend unterschieden. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die Anzahl einer Kategorie ins Verhältnis zur Anzahl gekeimter Konidien der entsprechenden Keimratenkontrolle (Abschnitt 7.2.6.2) gesetzt. Die Behandlungslösungen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten wie im Abschnitt 7.3.1.2.1 beschriebenen appliziert und nach der angegebenen Inkubationszeit wieder abgespült. Die zu den einzelnen Substanzen durchgeführten Experimente sind im Folgenden aufgeführt.

##### **7.3.3.1.1 Kaliumcarbonat**

Um den Einfluss der Inkubationszeit bei gegebener Konzentration von Kaliumcarbonat zu ermitteln wurden bei den Konzentrationen 5, 15, 35 und 80 g l<sup>-1</sup> Inkubationszeiten von 15 bis 240 Minuten getestet. Der Einfluss des Behandlungszeitpunktes wurde bei einer Konzentration von 5 g l<sup>-1</sup> 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation getestet.

##### **7.3.3.1.2 Glucopon 215 CSUP**

Um den Einfluss der Inkubationszeit bei gegebener Konzentration von GP zu ermitteln wurden bei den Konzentrationen 2 und 5 g l<sup>-1</sup> Inkubationszeiten von 15 bis 240 Minuten getestet. Der Einfluss des Behandlungszeitpunktes wurde bei 5 g l<sup>-1</sup> 6, 12 und 24 Stunden nach Inokulation getestet.

#### 7.3.3.1.3 Kaliumcarbonat + Glucopon 215 CSUP

Der Einfluss der Inkubationsdauer der Behandlung sowie des Behandlungszeitpunktes wurde bei einer Mischung aus Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) und GP ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) getestet. Bei dieser Mischung wurden die Inkubationszeiten 15 und 30 Minuten sowie 24 Stunden getestet. Die Behandlungen bei 15 und 30minütiger Inkubation erfolgten 24 Stunden nach Inokulation. Die Behandlungen mit 24stündiger Inkubation erfolgten 8 bzw. 24 Stunden nach Inokulation.

#### 7.3.3.2 Postinfektionelle Wirkung

Bei dieser Art der Experimente ging es darum herauszufinden ob die zu testenden Substanzen eine postinfektionelle Wirkung haben und in welcher Weise die Konzentration, die Inkubationszeit der Behandlung sowie der Behandlungszeitpunkt diese Wirkung beeinflussen. Die Effekte wurden anhand der Anzahl vitaler primärer Stromata wie im Abschnitt 7.2.6.4 beschrieben 48 bzw. 72 Stunden nach Inokulation ermittelt. Zu jeder Behandlung gab es eine unbehandelte Kontrolle. Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die Anzahl der vitalen primären Stromata ins Verhältnis zur Anzahl der gekeimten Konidien der entsprechenden Keimratenkontrolle gesetzt (Abschnitt 7.2.6.2). Die Behandlungen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten wie im Abschnitt 7.3.1.2.1 beschriebenen appliziert und nach der angegebenen Inkubationszeit gespült. Die zu den einzelnen Substanzen durchgeführten Experimente sind im Folgenden aufgeführt.

##### 7.3.3.2.1 Kaliumcarbonat

Um den Einfluss der Konzentration auf die Anzahl vitaler primärer Stromata zu testen wurde Kaliumcarbonat in den Konzentrationen 5, 15 und  $35 \text{ g l}^{-1}$  24 Stunden nach Inokulation appliziert, wobei die Behandlungen nach 15 Minuten gespült wurden.

Der Einfluss des Behandlungszeitpunktes wurde bei einer Konzentration von  $5 \text{ g l}^{-1}$  zu den Applikationszeitpunkten 6, 12 und 24 Stunden ermittelt. Die Behandlungen wurden nach 15 Minuten gespült.

##### 7.3.3.2.2 Glucopon 215 CSUP

Um den Einfluss der Konzentration und der Inkubationszeit auf die Anzahl vitaler primärer Stromata zu testen wurde GP in den Konzentrationen 2 und  $5 \text{ g l}^{-1}$  24 Stunden nach Inokulation appliziert. Die Behandlungen wurden nach 15 bzw. 30 Minuten gespült.

Der Einfluss des Behandlungszeitpunktes wurde bei einer Konzentration von  $5 \text{ g l}^{-1}$  zu den Applikationszeitpunkten 6, 12 und 24 Stunden ermittelt. Die Behandlungen wurden nach 15 Minuten gespült.

#### 7.3.3.2.3 Kaliumcarbonat + Glucopon 215 CSUP

Der Einfluss des Behandlungszeitpunktes auf die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde bei einer Mischung aus Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) und GP ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) getestet. Die Behandlungen erfolgten 24 bzw. 48 Stunden nach Inokulation. Dabei wurde im ersten Experiment die Behandlung nach 15 Minuten gespült. Im zweiten Experiment trocknete die Behandlung gemäß der im Abschnitt 7.3.1.2.2 beschriebenen Methode an.



## 8 Ergebnisse

### 8.1 Abschnitt A: Wirkungsweise von Kupferverbindungen

#### 8.1.1 Protektive Wirkung von Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid sowie den Filtraten von Kupferhydroxid und Kupferoxid

Bei 20°C waren 24 Stunden nach Inokulation 89 % der Konidien der unbehandelten Kontrollen ausgekeimt und hatten Appressorien gebildet (Tabelle 8-1 und Abbildung 8-1 A). Bei einer Vitalfärbung mit FDA fluoreszierten alle gekeimten Konidien der Kontrolle vollständig grün (Abbildung 8-1 B-D). Bei einer Färbung mit CTC fluoreszierten bei 86,3 % der Konidien Teile der ausgekeimten Spore rot (Tabelle 8-1 und Abbildung 8-2 A-C). Die Fluoreszenz war dabei auf Appressorien und Spitzen der Keimschläuche konzentriert.

Protektive Behandlungen mit dem Fungizid Discus (0,0125 %) hemmten die Konidienkeimung vollständig (Tabelle 8-1). Knapp 90 % der Sporen fluoreszierten nach einer FDA-Färbung. Bei einer CTC-Färbung hingegen fluoreszierte keine der ungekeimten Sporen.

Protektive Behandlungen mit Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid führten bei allen getesteten Konzentrationen zu einer vollständigen Keimhemmung (Tabelle 8-1). Zudem wiesen die ungekeimten Sporen bei einer CTC-Färbung keine Fluoreszenz auf. Bei Behandlungen mit Kupfersulfat trat in allen getesteten Konzentrationen auch bei FDA-Färbung keine Fluoreszenz auf. Bei Behandlungen mit Kupferhydroxid und Kupferoxid hingegen fluoreszierten einige ungekeimte Konidien bei FDA-Färbung, wobei der prozentuale Anteil fluoreszierender Konidien mit steigender Konzentration der Behandlung abnahm (Abbildung 8-2 D+E). In den Kontrollen (Abbildung 8-1 A+C) und bei Behandlungen mit Kupfersulfat erschienen die Oberflächen der CM sauber. Bei Behandlungen mit Kupferhydroxid und Kupferoxid hingegen waren Rückstände der Kupferverbindungen deutlich sichtbar, wobei die Dichte der Partikel mit steigender Konzentration zunahm (Abbildung 8-2 D+E).

Die protektive Behandlung mit dem Filtrat der Suspension von Kupferhydroxid führte zu einer leichten Keimhemmung. Dabei waren 86 % der Konidien 24 Stunden nach Inokulation zwar ausgekeimt, sie hatten aber keine Appressorien ausgebildet (Tabelle 8-2 und Abbildung 8-2 F). Bei FDA-Färbung fluoreszierten die Konidien. Das Filtrat der Kupferoxid-Suspension konnte weder die Keimung noch die Ausbildung von Appressorien verhindern, und alle gekeimten Konidien fluoreszierten nach FDA-Färbung (Tabelle 8-2).

**Tabelle 8-1. Protektive Wirkung von Discus sowie Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid auf die Keimung und Vitalität von Konidien.**

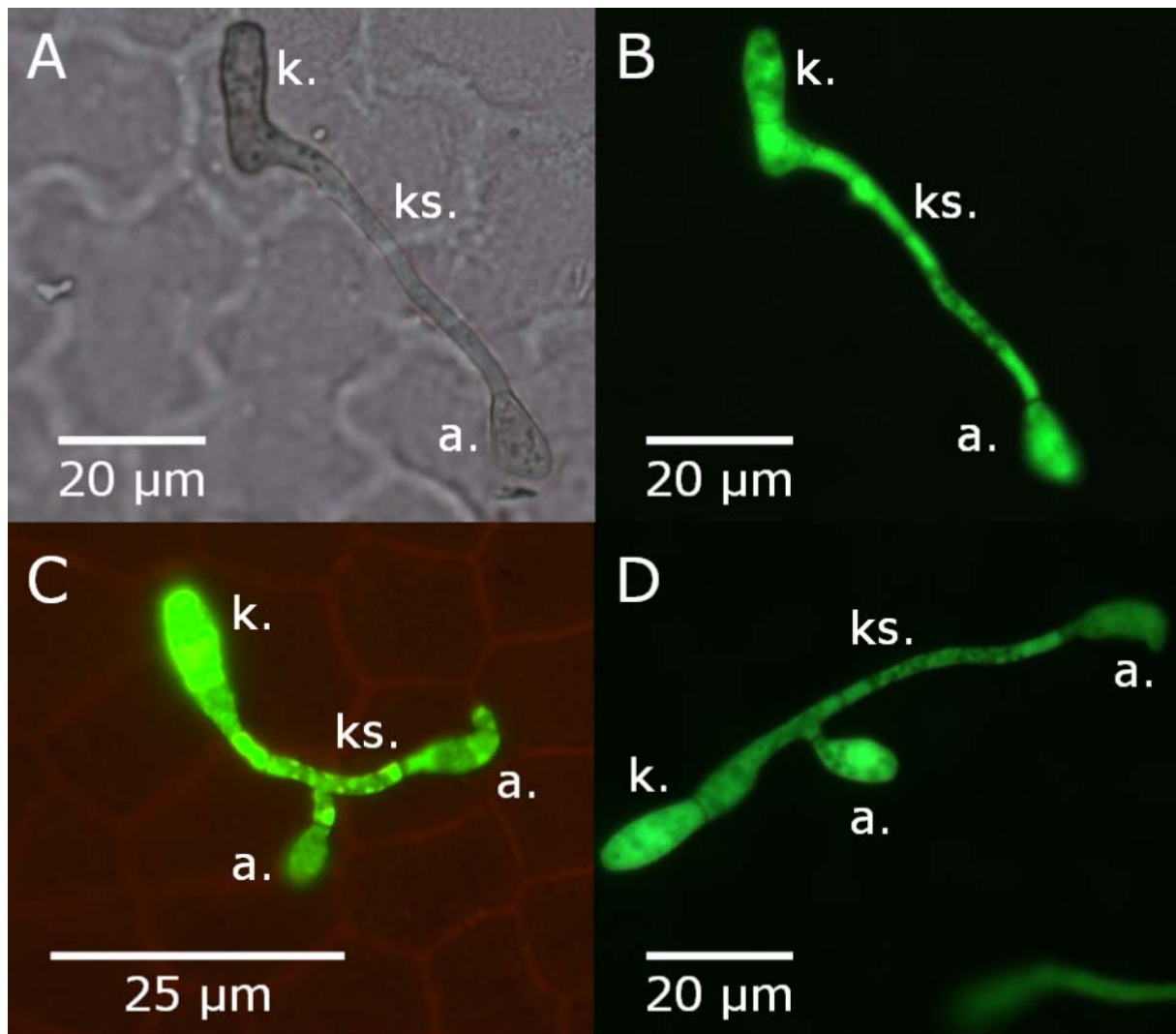
Die Kupferbehandlungen wurden 24 h vor Inokulation appliziert und trockneten an. Die inokulierten CM wurden für 24 h bei 20°C und im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch unter Verwendung der Vitalfarbstoffe FDA und CTC. Die Ergebnisse werden als Mittelwert (Mw.) in % der Gesamtanzahl der Konidien angegeben. Die Standardabweichung (Stabw.) ist in Klammern angegeben.

| Behandlung                | Ungekeimte Konidien (%) |          | FDA-Fluoreszenz:<br>Konidien (%) |          | CTC-Fluoreszenz:<br>Konidien (%) |          |
|---------------------------|-------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------------------|----------|
|                           | Mw.                     | (Stabw.) | Mw.                              | (Stabw.) | Mw.                              | (Stabw.) |
| <b>Kontrolle</b>          | 11                      | (2,6)    | 89,0                             | (2,6)    | 82,3                             | (5,6)    |
| <b>Discus</b>             |                         |          |                                  |          |                                  |          |
| 0,0125 %                  | 100                     | (0)      | 87,6                             | (5,8)    | 0                                | (0)      |
| <b>CuSO<sub>4</sub></b>   |                         |          |                                  |          |                                  |          |
| 1 mmol l <sup>-1</sup>    | 100                     | (0)      | 0                                | (0)      | 0                                | (0)      |
| 10 mmol l <sup>-1</sup>   | 100                     | (0)      | 0                                | (0)      | 0                                | (0)      |
| 25 mmol l <sup>-1</sup>   | 100                     | (0)      | 0                                | (0)      | 0                                | (0)      |
| <b>Cu(OH)<sub>2</sub></b> |                         |          |                                  |          |                                  |          |
| 1 mmol l <sup>-1</sup>    | 100                     | (0)      | 32,3                             | (4,9)    | 0                                | (0)      |
| 10 mmol l <sup>-1</sup>   | 100                     | (0)      | 10,4                             | (3,5)    | 0                                | (0)      |
| 25 mmol l <sup>-1</sup>   | 100                     | (0)      | 7,8                              | (3,0)    | 0                                | (0)      |
| <b>CuO</b>                |                         |          |                                  |          |                                  |          |
| 1 mmol l <sup>-1</sup>    | 100                     | (0)      | 29,8                             | (7,2)    | 0                                | (0)      |
| 10 mmol l <sup>-1</sup>   | 100                     | (0)      | 22,2                             | (5,3)    | 0                                | (0)      |
| 25 mmol l <sup>-1</sup>   | 100                     | (0)      | 19,1                             | (5,8)    | 0                                | (0)      |

**Tabelle 8-2. Protektive Wirkung der Filtrate von Kupferhydroxid und Kupferoxid auf die Keimung und Vitalität von Konidien.**

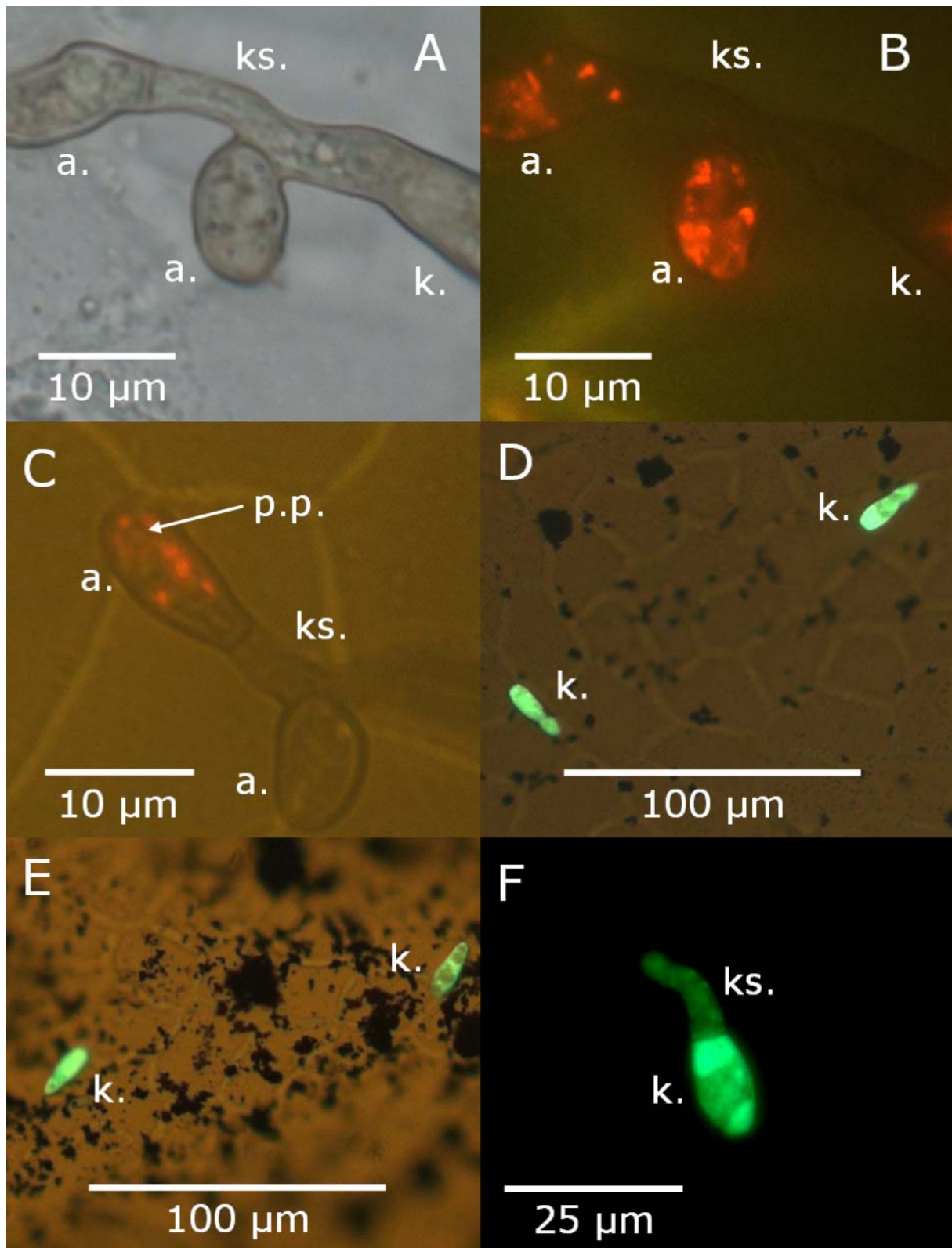
Die Filtrate wurden 24 h vor Inokulation appliziert und trockneten an. Die inokulierten CM wurden für 24 h bei 20°C und im Dunkeln inkubiert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA. Die Ergebnisse werden als Mittelwert (Mw.) in % der gekeimten Konidien der Kontrolle angegeben. Die Standardabweichung (Stabw.) ist in Klammern angegeben.

| Filtrate                  | FDA-Fluoreszenz: Konidien (% der Kontrolle) |          |                  |          |                             |          |
|---------------------------|---------------------------------------------|----------|------------------|----------|-----------------------------|----------|
|                           | ungekeimt                                   |          | nur Keimschlauch |          | Keimschlauch + Appressorium |          |
|                           | Mw                                          | (Stabw.) | Mw               | (Stabw.) | Mw                          | (Stabw.) |
| <b>Cu(OH)<sub>2</sub></b> | 12,4                                        | (7,7)    | 86,8             | (13,0)   | 0                           | (0)      |
| <b>CuO</b>                | 0                                           | (0)      | 0                | (0)      | 99,5                        | (9,8)    |



**Abbildung 8-1. Gekeimte Konidien von *V. inaequalis* unbehandelter Kontrollen 24 Stunden nach Inokulation von ‚Gloster‘-CM.**

(A) Gekeimte Konidie (k.) mit Keimschlauch (ks.) und Appressorium im Hellfeld. (B-D) Mit FDA angefärbte Konidien (k.), Keimschläuche (ks.) und Appressorien (a.) fluoreszieren unter UV-Anregung.



**Abbildung 8-2. Gekeimte Konidien un behandelter Kontrollen nach Anfärbung mit CTC sowie gekeimte und ungekeimte Konidien nach protektiven Behandlungen mit Kupferoxid oder dem Filtrat von Kupferhydroxid.**

(A-F) Konidien von *V. inaequalis* auf ‚Gloster‘-CM 24 h nach Inokulation. (A-C) Gekeimte Konidien (k.) un behandelter Kontrollen mit Keimschläuchen (ks.) und Appressorien (a.) angefärbt mit CTC. (B+D) Formazane in den Mitochondrien fluoreszieren unter UV-Anregung rot. (C) Die Mitochondrien sind um die

Penetrationspore (p.p). angeordnet. (D+E) Ungekeimte Konidien (k.) nach protektiven Behandlungen mit Kupferoxid in den Konzentrationen 1 mmol l<sup>-1</sup> (D) bzw. 10 mmol l<sup>-1</sup> (E). (F) Gekeimte Konidie (k.) mit Keimschlauch (ks.) nach protektiver Behandlung mit dem mit Filtrat einer Kupferhydroxid-Suspension. (D-F) Konidien mit FDA angefärbt.

### 8.1.2 Postinfektionelle Wirkung von Kupfersulfat und Kupferhydroxid

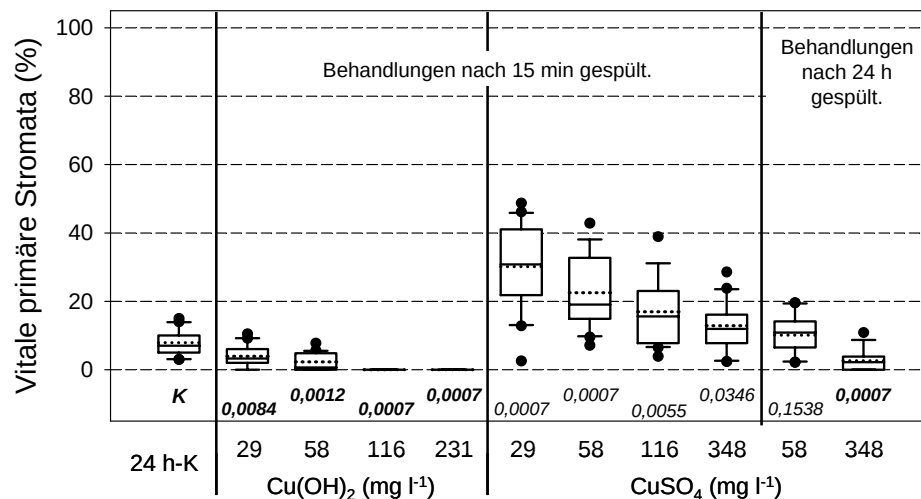
#### 8.1.2.1 Inkubation in Wassertropfen auf Kutikularmembranen

Bei den Kontrollen, die zu den Zeitpunkten der Applikation der Behandlungen ausgewertet wurden, hatten 24 Stunden nach Inokulation 7,9 % (Stabw.  $\pm$  3,7 %) und 48 Stunden nach Inokulation 33,2 % (Stabw.  $\pm$  8,7 %) der gekeimten Konidien vitale primäre Stromata ausgebildet (Abbildung 8-3 und Abbildung 8-4). 72 Stunden nach Inokulation hatten 63,2 % der Konidien die CM penetriert und primäre Stromata ausgebildet (Abbildung 8-5 A-C und Abbildung 8-9). Die primären Stromata befanden sich an der Kontaktstelle zwischen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  und der Innenseite der CM.

Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation mit Kupferhydroxid (116 und 231  $\text{mg l}^{-1}$ ) und einer 15minütigen Inkubation töteten alle vorhandenen primären Stromata und verhinderten die Bildung neuer Stromata (Abbildung 8-3). Kupfersulfat war zum gleichen Applikationszeitpunkt weniger effektiv. Selbst bei der höchsten Konzentration von 348  $\text{mg l}^{-1}$  konnte die Entwicklung primärer Stromata nicht verhindert werden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit der Behandlung von 15 Minuten auf 24 Stunden führte zwar zu einer weiteren Reduzierung der Rate vitaler primärer Stromata, konnte diese aber ebenfalls nicht auf Null senken.

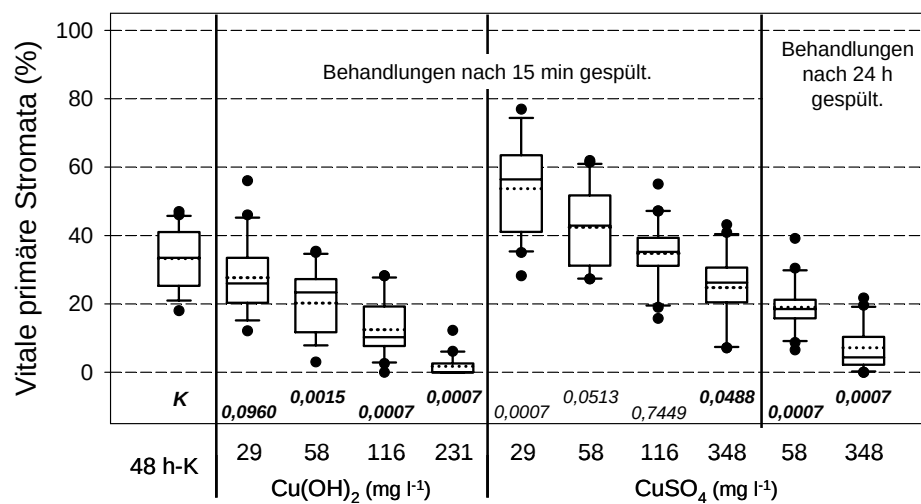
Bei Behandlungen 48 Stunden nach Inokulation mit 15minütiger Inkubationszeit konnte Kupferhydroxid in den Konzentrationen 58, 116 und 231  $\text{mg l}^{-1}$  die Rate vitaler primärer Stromata gegenüber der 48 h-Kontrolle signifikant reduzieren (Abbildung 8-4). Bei Kupfersulfat-Behandlungen mit 15minütiger Inkubationszeit konnte der Prozentsatz vitaler primärer Stromata nur in der höchsten Konzentration von 348  $\text{mg l}^{-1}$  gegenüber der Kontrolle signifikant reduziert werden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 Stunden führte bei den Konzentrationen von 58 und 348  $\text{mg l}^{-1}$  zu einer weiteren Reduzierung des Prozentsatzes vitaler primärer Stromata. Bei Behandlungen 48 Stunden nach Inokulation konnten allerdings weder Kupferhydroxid noch Kupfersulfat die Anzahl vitaler primärer Stromata auf Null reduzieren.

Durch das Spülen der Rückstände auf den CM nach Ende der Inkubationszeit wurden bei den Behandlungen mit Kupferhydroxid nicht alle Rückstände entfernt. Die Partikel hafteten vorzugsweise an den Sporen (Abbildung 8-5 D).



**Abbildung 8-3. Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid und Kupfersulfat auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation.**

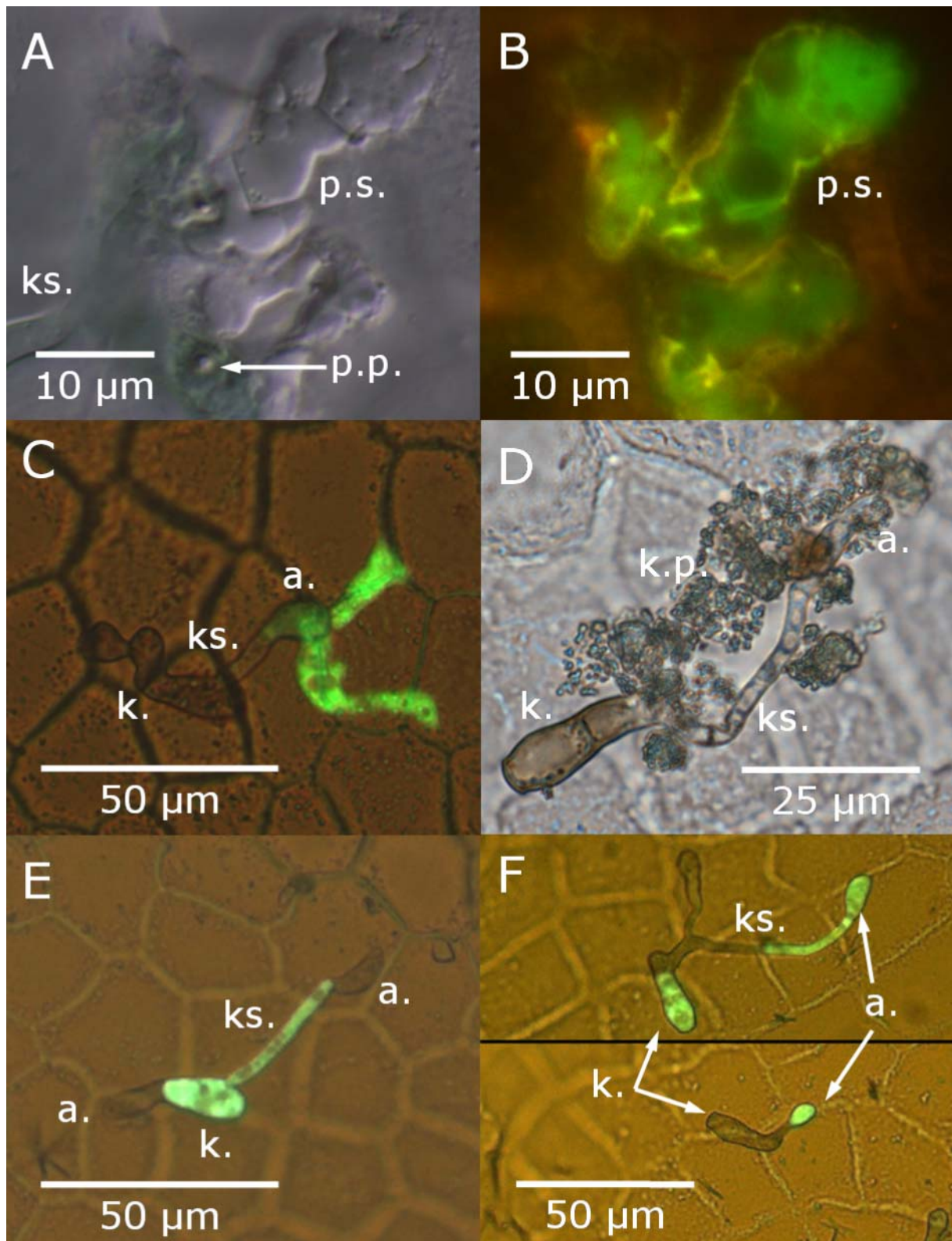
Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min bzw. 24 h Inkubation wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 72 bzw. bei der 24 h-Kontrolle 24 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle. Die adjustierten p-Werte sind kursiv gedruckt. Fett gedruckte p-Werte zeigen an, dass die Prozentsätze vitaler primärer Stromata signifikant unter dem Prozentsatz der 24 h-Kontrolle lagen ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 8-4. Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid und Kupfersulfat auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 48 Stunden nach Inokulation.**

Die Behandlungen wurden 48 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min bzw. 24 h Inkubation wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 72 bzw. bei der 48 h-Kontrolle 48 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle. Die adjustierten p-Werte sind kursiv gedruckt. Fett gedruckte p-Werte zeigen an, dass die Prozentsätze vitaler primärer Stromata signifikant unter dem Prozentsatz der 48 h-Kontrolle lagen ( $p < 0,05$ ).





**Abbildung 8-5. Primäre Stromata sowie gekeimte Konidien nach Behandlungen mit Kupferhydroxid, KOH und Glucopon 215 CSUP.**

(A+B) Primäres Stroma (p.s.) von *V. inaequalis* auf ‚Gloster‘-CM 72 h nach Inokulation. Das Stroma wurde mit FDA angefärbt. (A) Im Hellfeld mit differentiellem Interferenzkontrast ist die Penetrationspore (p.p.) sichtbar. (B) Unter UV-Anregung fluoresziert das Stroma. (C-F) Gekeimte Konidien (k.) von *V. inaequalis* mit Keimschläuchen (ks.) und Appressorien (a.) auf ‚Gloster‘-CM. (C) Primäres Stroma (p.s.) 72 h nach Inokulation

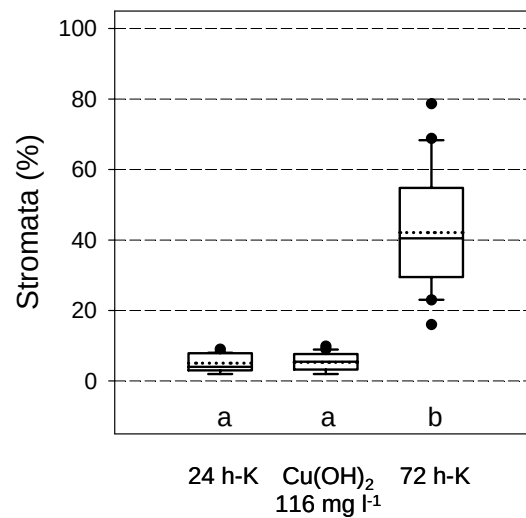
angefärbt mit FDA, unter UV-Anregung. (D) Gekeimte Konidie 48 h nach Inokulation. Eine Behandlung mit Kupferhydroxid ( $116 \text{ mg l}^{-1}$ ) wurde 24 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült. Kupferpartikel (k.p.) haften an der ausgekeimten Spore. (E) Gekeimte Konidie 24 h nach Inokulation. Eine Behandlung mit KOH (pH 12,4) erfolgte 24 h nach Inokulation und wurde nach 30 min gespült. Die Appressorien ließen sich nicht mehr mit FDA anfärben. (F) Gekeimte Konidie 24 h nach Inokulation. Eine Behandlung mit GP ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) erfolgte 24 h nach Inokulation und wurde nach 30 min Inkubation wieder abgespült. Eine Konidie und zwei Appressorien ließen sich mit FDA anfärben.

#### 8.1.2.2 Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid bei Inkubation in Wassertropfen auf Blattscheiben

Da beim Kochen der ‚Elstar‘-BS in KOH die ungekeimten Konidien von der Oberfläche entfernt wurden, musste die Keimratenkontrolle auf ‚Elstar‘-CM durchgeführt werden.

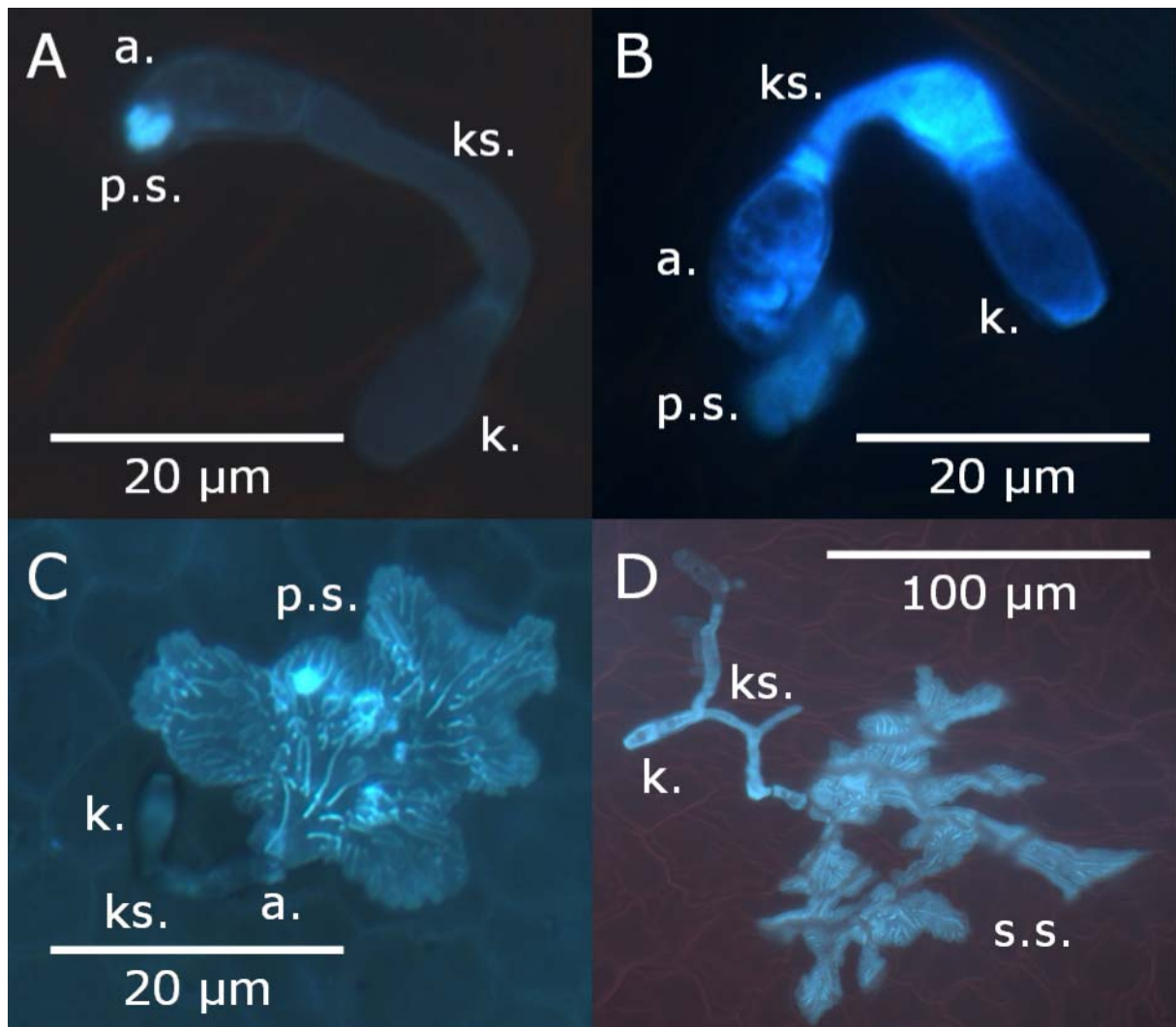
Auf BS hatten bereits 24 Stunden nach Inokulation 5,1 % (Stabw.  $\pm$  2,5 %) der gekeimten Konidien primäre Stromata ausgebildet (Abbildung 8-6 und Abbildung 8-7 A+B). Bei einer Konzentration von 116 mg l<sup>-1</sup> und 15minütiger Inkubationszeit verhinderten Behandlungen mit Kupferhydroxid die Entwicklung weiterer Stromata. Es konnte kein signifikanter Unterschied zur 24 h-Kontrolle festgestellt werden. Bei der 72 h-Kontrolle hatten 42,1 % (Stabw.  $\pm$  17,1 %) der gekeimten Konidien Stromata ausgebildet (Abbildung 8-7 C+D und Abbildung 8-8 A).

Die primären Stromata, die in der Epidermisaußenwand der BS gebildet wurden (Abbildung 8-7 A-C und Abbildung 8-8 A), ähneln denen an der Kontaktstelle zwischen Wasser und Innenseite der CM (Abbildung 8-5 B+C). Erstere erscheinen allerdings etwas stärker strukturiert. Zudem kam es auf BS 72 Stunden nach Inokulation bereits zur Ausbildung sekundärer Stromata und nach 96 Stunden zur Ausbildung von Laufhyphen (Abbildung 8-7 D und Abbildung 8-8).



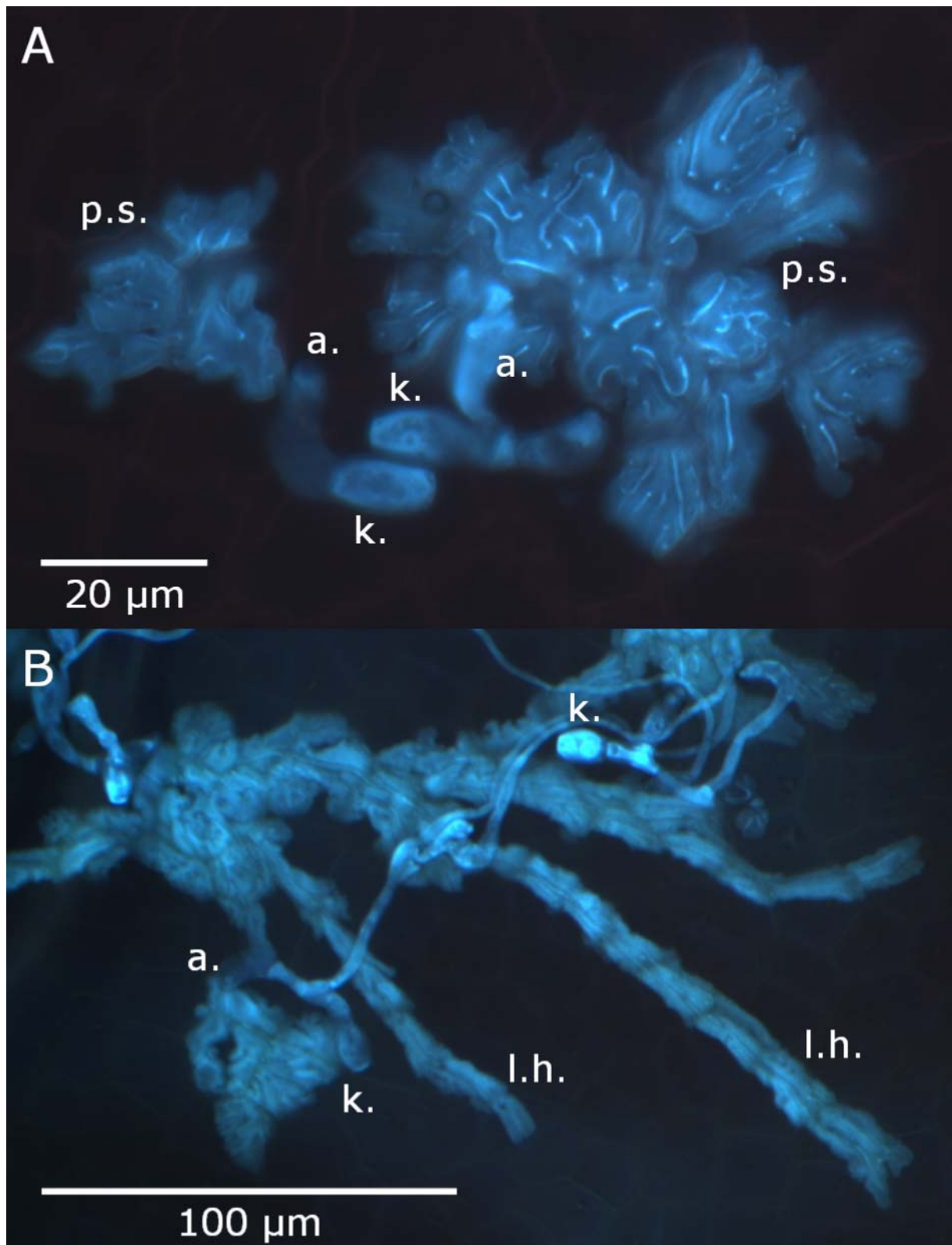
**Abbildung 8-6. Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid auf die Anzahl der Stromata bei einer Behandlung 24 Stunden nach Inokulation von ‚Elstar‘- Blattscheiben.**

Die Behandlung wurde 24 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült. Die Anzahl der Stromata wurde 72 bzw. bei der 24 h-Kontrolle 24 h nach Inokulation mittels der KOH-Anilinblau-Methode ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze der Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle auf ‚Elstar‘-CM. Gruppen, die mit demselben Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 8-7. Stomata 24 und 72 Stunden nach Inokulation von ‚Elstar‘-Blattscheiben.**

(A-D) Gekeimte Konidien (k.) von *V. inaequalis* unbehandelter Kontrollen mit Keimschläuchen (ks.) und Appressorien (a.) auf ‚Elstar‘-BS. (A+B) 24 h nach Inokulation wurde die Kutikula penetriert und primäre Stomata (p.s.) beginnen sich auszubilden. (C+D) 72 h nach Inokulation haben die Stomata deutlich an Größe zugenommen und das sekundäre Stroma (s.s.) beginnt sich auszubilden. (A-D) Die gekeimten Konidien und die Stomata wurden mit der KOH-Anilinblau-Methode gefärbt und fluoreszieren unter UV-Anregung.



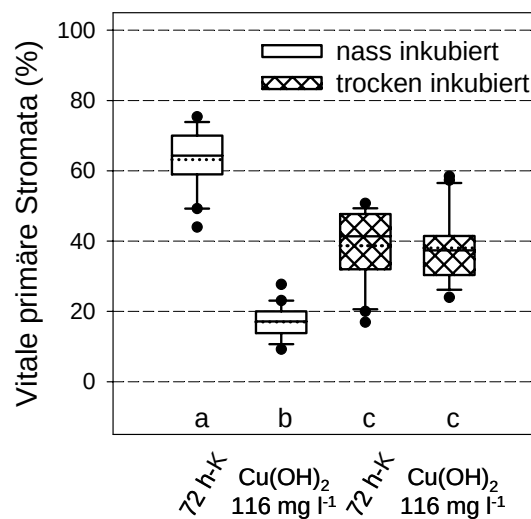
**Abbildung 8-8. Stromata und Laufhyphen 72 und 96 Stunden nach Inokulation von ‚Elstar‘-Blattscheiben.**

(A+B) Gekeimte Konidien (k.) von *V. inaequalis* unbehandelter Kontrollen mit Keimschläuchen (ks.) und Appressorien (a.) auf ‚Elstar‘-BS. (A) 72 h nach Inokulation haben sich deutlich strukturierte primäre Stromata (p.s.) ausgebildet. (B) Ausgehend vom primären Stroma haben sich 92 h nach Inokulation Laufhyphen (l.h.) gebildet. (A+D) Die gekeimten Konidien und die Stromata wurden mit der KOH-Anilinblau-Methode gefärbt und fluoreszieren unter UV-Anregung.



### 8.1.2.3 Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid bei trockener Inkubation auf Kutikularmembranen

Trockneten die CM 48 Stunden nach Inokulation bzw. nach erfolgter Behandlung ab, so reduzierte sich die Rate vitaler primärer Stromata in der 72 h-Kontrolle auf 38,7 % (Stabw.  $\pm$  10,5 %) (Abbildung 8-9). Bei einer Kupferhydroxid-Behandlung ( $116 \text{ mg l}^{-1}$ ) und trockenen Inkubationsbedingungen lag die Rate vitaler primärer Stromata bei 38,0 % (Stabw.  $\pm$  9,3 %) und unterschied sich nicht signifikant von der entsprechenden Kontrolle.



**Abbildung 8-9. Vergleich der postinfektionellen Wirkung von Kupferhydroxid auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 48 Stunden nach Inokulation unter trockenen bzw. nassen Inkubationsbedingungen.**

Die Behandlungen wurden 48 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült bzw. trockneten ein. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 72 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle. Gruppen, die mit demselben Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

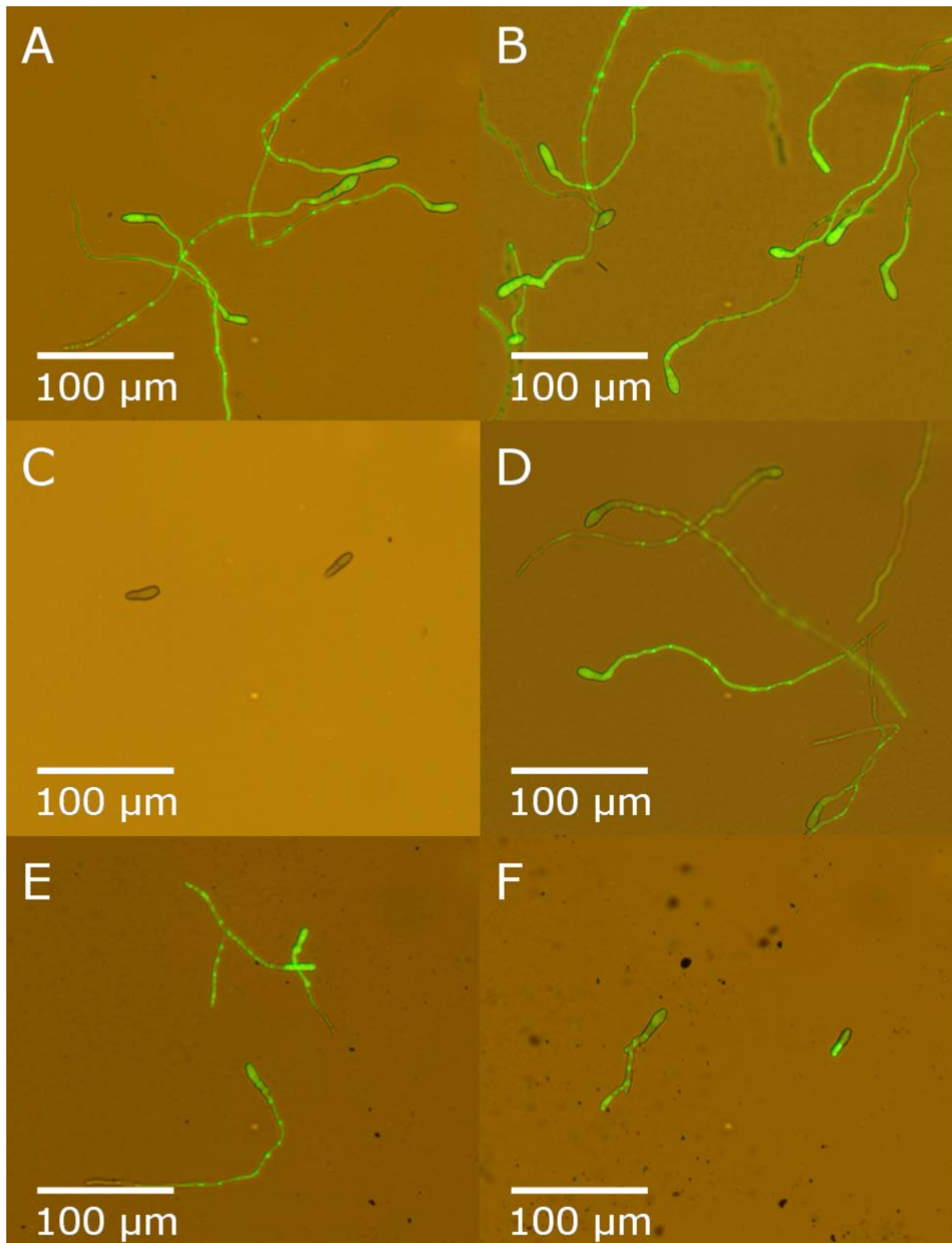
### 8.1.3 Wirkung von Kupfersulfat und Kupferoxid bei Behandlungen auf Wasseragar

Auf der Oberfläche des Wasseragars keimten die Konidien 24 Stunden nach Inokulation mit vergleichsweise langen Keimschläuchen aus, bildeten aber keine Appressorien. Die Konidien und Keimschläuche fluoreszierten nach FDA-Färbung stark grün (Abbildung 8-10 A+B).

#### 8.1.3.1 Wirkung bei Behandlungen vor Inokulation

Kupfersulfat-Behandlungen (1, 10, 25 mmol l<sup>-1</sup>), die 24 Stunden vor Inokulation auf die Oberfläche des Wasseragars appliziert wurden, verhinderten die Keimung der Konidien bei allen getesteten Konzentrationen (Abbildung 8-10 C). Die ungekeimten Konidien wiesen unter dem Mikroskop keine Fluoreszenz auf. Die mittels des Spektralfotometers gemessene Fluorescein-Fluoreszenz lag bei nur rund 5 % der Kontrolle (Abbildung 8-11). Bei protektiven Behandlungen mit Kupferoxid war eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Effekte zu beobachten. In der niedrigsten Konzentration (1 mmol l<sup>-1</sup>) wurde die Fluoreszenz lediglich auf 82,6 % der Kontrolle (Stabw.  $\pm$  5,0 %) reduziert. Unter dem Mikroskop war optisch kein eindeutiger Unterschied im Keimverhalten gegenüber der Kontrolle feststellbar (Abbildung 8-10 A, B, D). Bei einer Konzentration von 10 mmol l<sup>-1</sup> wurde die Fluorescein-Fluoreszenz auf 65,9 (Stabw.  $\pm$  3,6 %) und bei 25 mmol l<sup>-1</sup> auf 41,1 % der Kontrolle (Stabw.  $\pm$  3,8 %) reduziert. Dieser Effekt konnte anhand der Keimschlauchlängen unter dem Mikroskop nachvollzogen werden (Abbildung 8-10 A, E+F). Unter dem Mikroskop waren Partikel der Kupferoxid-Behandlungen zu sehen, deren Dichte mit steigender Konzentration zunahm (Abbildung 8-10 D-F). Die meisten dieser Partikel befanden sich in einer anderen optischen Ebene als die Sporen.

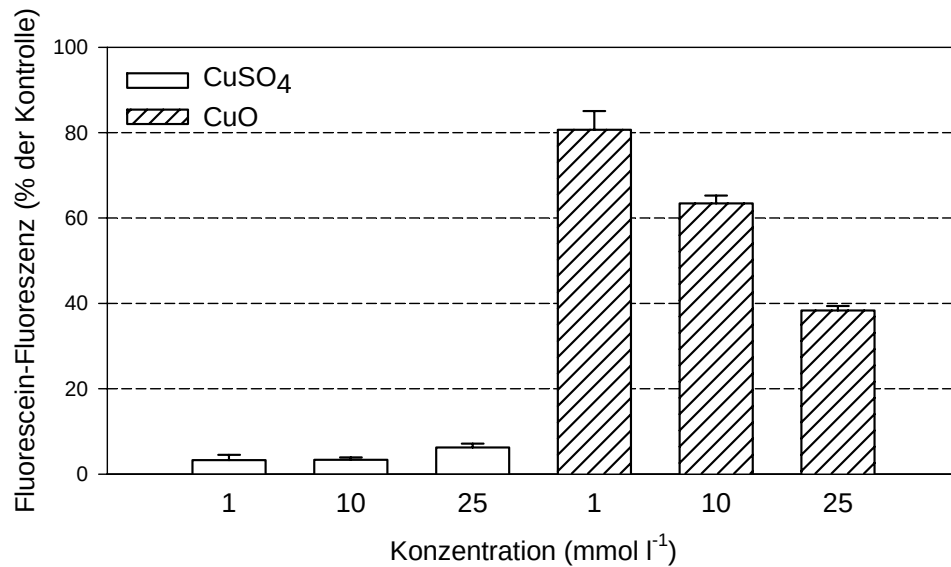




**Abbildung 8-10. Konidien unbehandelter Kontrollen auf Wasseragar sowie Konidien nach Behandlungen mit Kupfersulfat und Kupferoxid 24 Stunden vor Inokulation auf Wasseragar.**

(A+B) Gekeimte Konidien unbehandelter Kontrollen mit langen Keimschläuchen 24 h nach Inokulation. (C) Ungekeimte Konidien bei einer protektiven Behandlung mit Kupfersulfat ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ). (D-F) gekeimte Konidien mit Keimschläuchen bei protektiven Behandlungen mit Kupferoxid in den Konzentrationen 1 (D), 10 (E) und 25

mmol l<sup>-1</sup> (F). (A-F) Die Konidien wurden 24 h nach Inokulation mit FDA gefärbt. (C) Die ungekeimten Konidien fluoreszieren trotz UV-Anregung nicht.



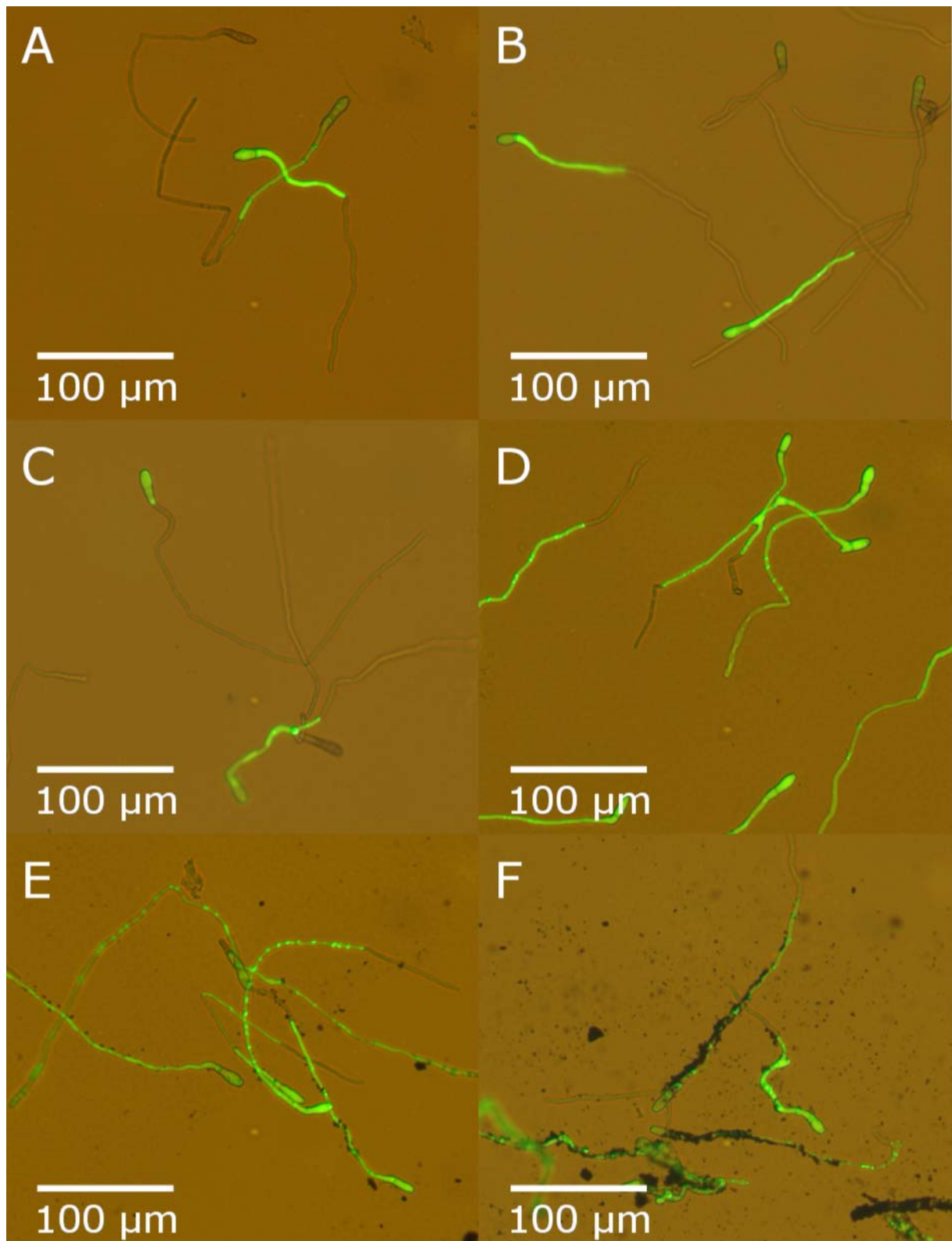
**Abbildung 8-11. Wirkung von Behandlungen mit Kupfersulfat und Kupferoxid 24 Stunden vor Inokulation auf die Fluorescein-Fluoreszenz von Konidien auf Wasseragar.**

Die gekeimten Konidien wurden 24 h nach Inokulation mit FDA gefärbt. Die FDA-Lösung wurde nach 15 min abgegossen. Die Fluorescein-Fluoreszenz wurde mit einem Spektrofotometer bei einer Exzitationswellenlänge von 494 nm gemessen. Die Säulen geben den Mittelwert aus 12 Messungen in % der unbehandelten Kontrolle an. Die Balken geben die Standardabweichung an.

### 8.1.3.2 Wirkung bei Behandlungen nach Inokulation

Bei Behandlungen, die 22 Stunden nach Inokulation auf die Oberfläche des Wasseragars appliziert wurden, waren unter dem Mikroskop keine Unterschiede in den Keimschlauchlängen gegenüber der Kontrolle feststellbar (Abbildung 8-10 A+B und Abbildung 8-12). Mit steigenden Konzentrationen der Behandlungen (insbesondere bei Kupfersulfat) nahm jedoch die Fluoreszenz in den Keimschläuchen ab, wobei die Fluoreszenz in der Regel von der Keimschlauchspitze her abnahm. Bei Behandlungen mit Kupferoxid waren zudem Partikel der Verbindung zu sehen, die durch den Spülvorgang nicht abgewaschen wurden und vorrangig an den Sporen anhafteten (Abbildung 8-12 D-F). Die Dichte der Partikel nahm mit steigender Kupferoxid-Konzentration zu.

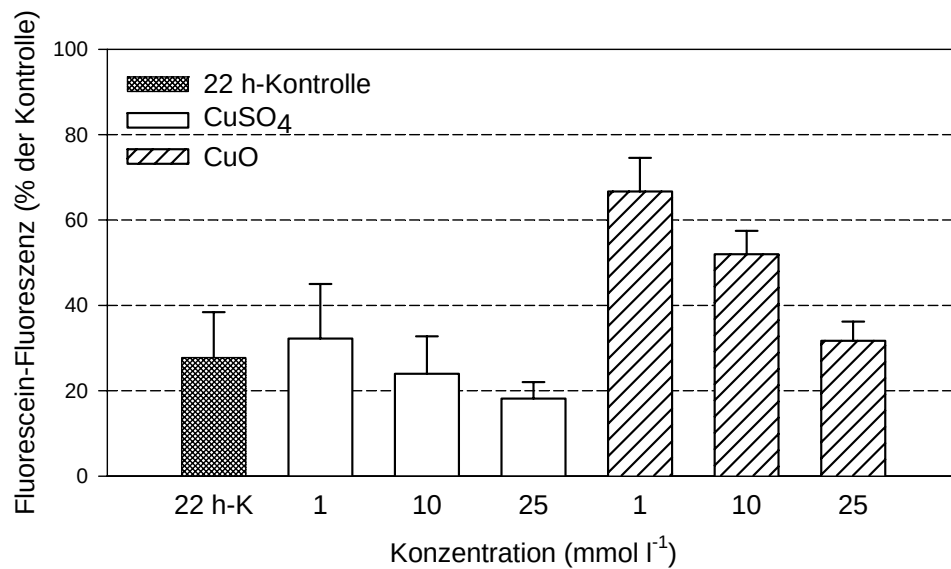
Auf die Fluorescein-Fluoreszenz zeigten Behandlungen mit Kupfersulfat einen deutlich stärkeren Effekt als Behandlungen mit Kupferoxid (Abbildung 8-13). Bei beiden Kupferverbindungen war der Effekt konzentrationsabhängig. In den Konzentrationen 10 und 25 mmol l<sup>-1</sup> konnte Kupfersulfat die Fluoreszenz auf 18,2 % (Stabw. ± 3,9 %) bzw. 24,0 % der Kontrolle (Stabw. ± 8,8 %) reduzieren. Somit lag die Fluorescein-Fluoreszenz bei diesen beiden Behandlungen auch unter der 22 h-Kontrolle (Auswertung zum Zeitpunkt der Behandlungen), bei der eine Fluoreszenz von 27,8 % der Kontrolle (Stabw. ± 10,6%) gemessen wurde. Die Fluoreszenz der niedrigsten Kupfersulfat-Konzentration lag mit 32,2 % (Stabw. ± 12,8 %) leicht über diesem Wert. Bei Kupferoxid-Behandlungen war die gemessene Fluorescein-Fluoreszenz bei allen getesteten Konzentrationen (1, 10, 25 mmol l<sup>-1</sup>) höher als bei der 22 h-Kontrolle. Gegenüber der 24 h-Kontrolle konnte sie aber auf 66,7 % (Stabw. ± 7,9 %) bei der niedrigsten, über 52,0 % (Stabw. ± 5,5 %), bis hin zu 31,7 % (Stabw. ± 4,5 %) bei der höchsten Konzentration reduziert werden.



**Abbildung 8-12. Gekeimte Konidien nach Behandlungen mit Kupfersulfat und Kupferoxid 22 Stunden nach Inokulation auf Wasseragar.**

(A-C) Gekeimte Konidien mit Keimschläuchen nach Behandlungen mit Kupfersulfat in den Konzentrationen 1 (A), 10 (B) und 25 mmol l<sup>-1</sup> (C). (D-F) Gekeimte Konidien mit Keimschläuchen nach Behandlungen mit Kupferoxid in den Konzentrationen 1 (D), 10 (E) und 25 mmol l<sup>-1</sup> (F). (A-F) Die Konidien und Keimschläuche

wurden 24 h nach Inokulation mit FDA gefärbt. Je nach Effekt der Behandlung fluoreszieren mehr oder weniger Teile der Sporen und Keimhyphen.

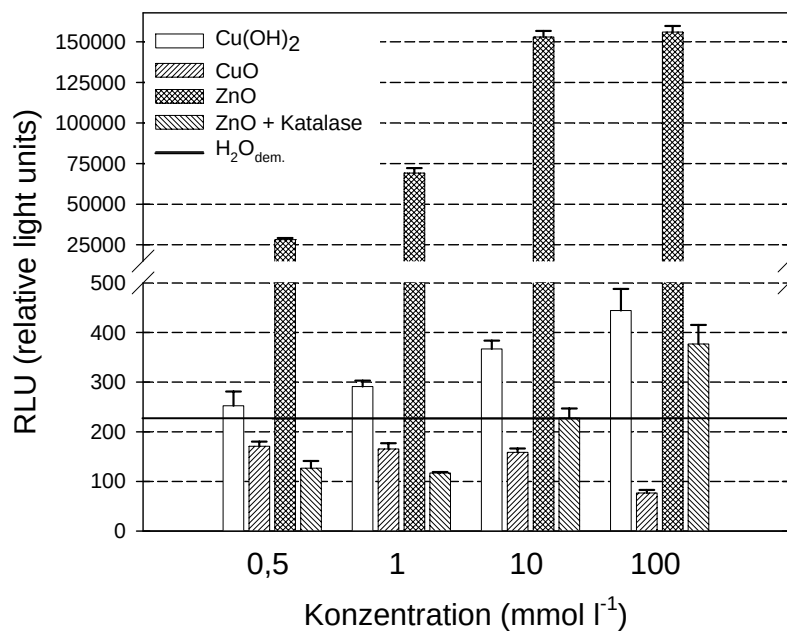


**Abbildung 8-13. Wirkung von Behandlungen mit Kupfersulfat und Kupferoxid 22 Stunden nach Inokulation auf die Fluorescein-Fluoreszenz von Konidien auf Wasseragar.**

Die gekeimten Konidien wurden 24 h nach Inokulation mit FDA gefärbt. Die FDA-Lösung wurde nach 15 min abgegossen. Die Fluorescein-Fluoreszenz wurde mit einem Spektrofotometer bei einer Exzitationswellenlänge von 494 nm gemessen. Die Säulen geben den Mittelwert aus 12 Messungen in % der unbehandelten Kontrolle an. Die Balken geben die Standardabweichung an.

#### 8.1.4 Generierung von ROS in Suspensionen von Kupferhydroxid und Kupferoxid

Wurde die durch ROS induzierte Chemilumineszenz in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  und der PMAC-Lösung separat gemessen, so wurden 49 RLU (Stabw.  $\pm 3$  RLU) bzw. 51 RLU (Stabw.  $\pm 4$  RLU) detektiert. Wurde die PMAC-Lösung in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  pipettiert, so wurden 226 RLU (Stabw.  $\pm 21$  RLU) gemessen (Abbildung 8-14). RLU-Werte in derselben Größenordnung wurden unabhängig von der Konzentration in den Suspensionen von Kupferhydroxid und Kupferoxid gemessen. In der Zinkoxid-Suspension, die als Positivkontrolle zur Detektion von ROS diente, wurden Werte zwischen 28.162 RLU (Stabw.  $\pm 1.022$  RLU) bei der niedrigsten Konzentration ( $0,5 \text{ mmol l}^{-1}$ ) und 156.035 RLU (Stabw.  $\pm 3.782$  RLU) bei der höchsten Konzentration ( $100 \text{ mmol l}^{-1}$ ) gemessen. Durch die Zugabe der Katalase verringerten sich die RLU-Werte in den Zinkoxid-Suspensionen in den Bereich von  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  bzw. der Kupfer-Suspensionen.



**Abbildung 8-14. Durch ROS induzierte Chemilumineszenz in Suspensionen von Kupferhydroxid, Kupferoxid sowie Zinkoxid.**

Die durch ROS induzierte Chemilumineszenz wurde nach Zugabe von PMAC gemessen. Katalase wurde verwendet, um den Anteil der Chemilumineszenz zu bestimmen, der durch Wasserstoffperoxyd induziert wurde. Die Säulen geben den Mittelwert aus fünf Messungen an. Die Balken zeigen die Standardabweichungen.

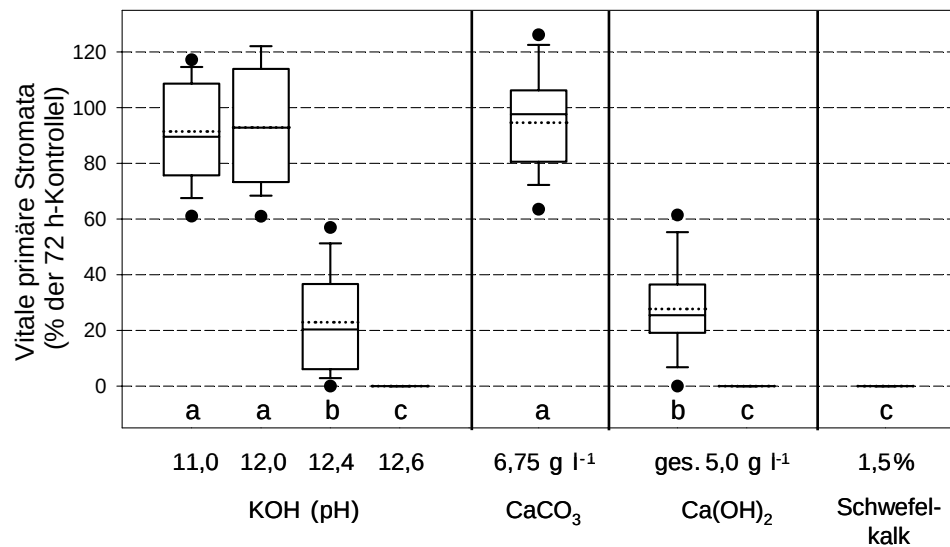
## 8.2 Abschnitt B: Wirkungsweise von Calciumhydroxid

### 8.2.1 Postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid

In den Kontrollen hatten etwa 60 % der gekeimten Konidien 72 Stunden nach Inokulation die CM penetriert und vitale primäre Stromata ausgebildet (Abbildung 8-5 A-C). Die ersten Stromata waren 24 Stunden und Penetrationssporen bereits 12 Stunden nach Inokulation sichtbar.

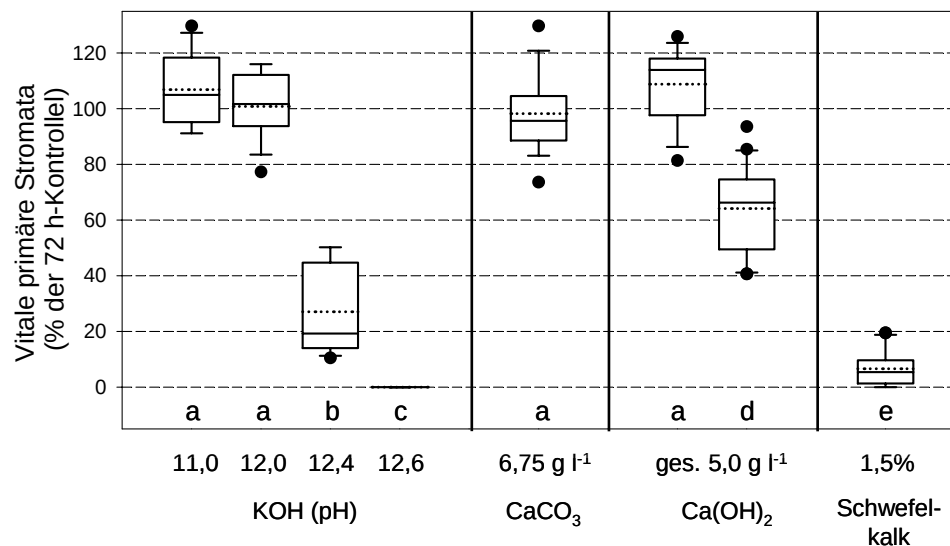
Bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation töteten Schwefelkalk (1,5 %) und Calciumhydroxid ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) alle primären Stromata ab und verhinderten die Entwicklung neuer Stromata, so dass der Prozentsatz vitaler primärer Stromata 72 Stunden nach Inokulation bei Null lag (Abbildung 8-15). Die gesättigte Calciumhydroxid-Lösung reduzierte den Prozentsatz vitaler primärer Stromata auf 27,7 % (Stabw.  $\pm 15,8$  %) der 72 h-Kontrolle. Die Calciumcarbonat-Suspension ( $6,75 \text{ g l}^{-1}$ ) hingegen zeigte keinen Effekt. KOH-Lösungen mit pH 11 und pH 12 waren ebenso wirkungslos. Bei pH 12,4 reduzierte die KOH-Lösung den Prozentsatz vitaler primärer Stromata auf 22,9 % (Stabw.  $\pm 17,3$  %). Der Effekt war somit vergleichbar mit dem der gesättigten Calciumhydroxid-Lösung. Bei pH 12,6 wurde die Rate vitaler primärer Stromata auf Null reduziert.

Bei Behandlungen 48 Stunden nach Inokulation konnte nur die KOH-Lösung mit pH 12,6 den Prozentsatz vitaler primärer Stromata auf Null reduzieren (Abbildung 8-16). Schwefelkalk konnte den Prozentsatz auf 6,6 % (Stabw.  $\pm 5,8$  %) der 72 h-Kontrolle reduzieren. Der Effekt der Calciumhydroxid-Suspension ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) verringerte sich im Vergleich zur Behandlung 24 Stunden nach Inokulation deutlich, und der Prozentsatz vitaler primärer Stromata lag bei 64,1 % (Stabw.  $\pm 15,0$  %). Die gesättigte Calciumhydroxid-Lösung zeigte keinen Effekt, ebenso wie die Calciumcarbonat-Suspension ( $6,75 \text{ g l}^{-1}$ ) und die KOH-Lösungen mit pH 11 und pH 12. Der Effekt der KOH-Lösung mit pH 12,4 hingegen war mit 27,1 % (Stabw.  $\pm 15,4$  %) vergleichbar dem Effekt bei einer Behandlung 24 Stunden nach Inokulation.



**Abbildung 8-15. Postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid, Calciumcarbonat, KOH-Lösungen verschiedener pH-Werte sowie Schwefelkalk auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation.**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 72 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf den Prozentsatz der 72 h-Kontrolle. Gruppen, die mit demselben Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 8-16. Postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid, Calciumcarbonat, KOH-Lösungen verschiedener pH-Werte sowie Schwefelkalk auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 48 Stunden nach Inokulation.**

Die Behandlungen wurden 48 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 72 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA

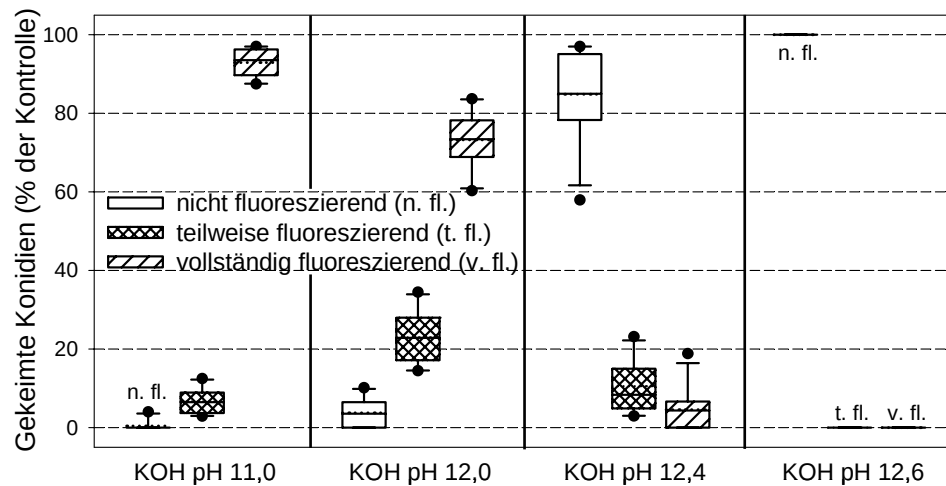


ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf den Prozentsatz der 72 h-Kontrolle. Gruppen, die mit demselben Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

### **8.2.2 Effekte des pH-Wertes auf die Vitalität gekeimter Konidien**

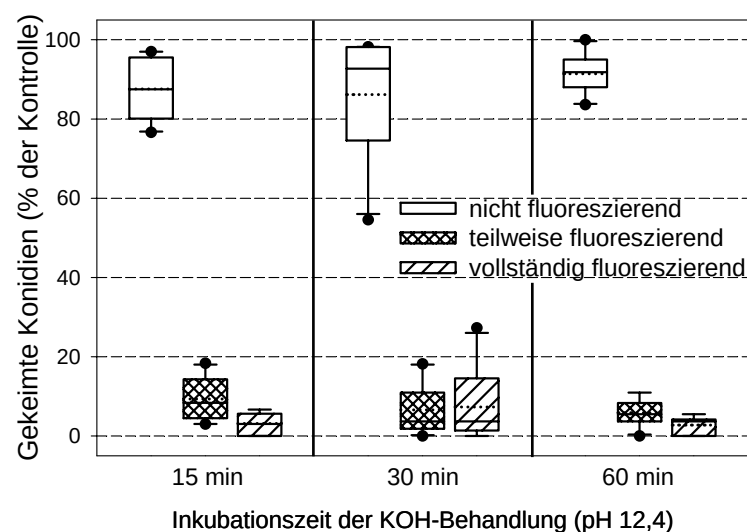
Die Vitalität der gekeimten Konidien, die 24 Stunden nach Inokulation mittels FDA-Vitalfärbung ermittelt wurde, zeigte eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert der applizierten KOH-Lösungen. Bei pH 11 und pH 12 waren die Effekte nur schwach, wobei die meisten der gekeimten Konidien vollständig fluoreszierten (Abbildung 8-17). Ein sehr starker Effekt trat bei pH 12,4 auf, wobei nur noch 4,5 % (Stabw.  $\pm 5,4$ ) vollständig und 10,6 % (Stabw.  $\pm 6,7$  %) der gekeimten Konidien teilweise fluoreszierten (Abbildung 8-5 E). Bei pH 12,6 reduzierte sich der Anteil vollständig oder teilweise fluoreszierender Konidien auf Null.

Die Inkubationszeit des pH-Wertes hatte keinen Einfluss auf die Wirksamkeit. Bei KOH-Behandlungen mit pH 12,4 verringerte sich allerdings die Variabilität bei 60minütiger Inkubationszeit deutlich (Abbildung 8-5 E und Abbildung 8-18).



**Abbildung 8-17. Einfluss des pH-Wertes auf die Wirkung von KOH-Lösungen auf die Vitalität gekeimter Konidien.**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender Stromata wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der unbehandelten Kontrolle.



**Abbildung 8-18. Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von KOH-Lösungen mit pH 12,4 auf die Vitalität gekeimter Konidien.**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach angegebener Inkubationszeit wieder abgespült. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender Stromata wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der unbehandelten Kontrolle.

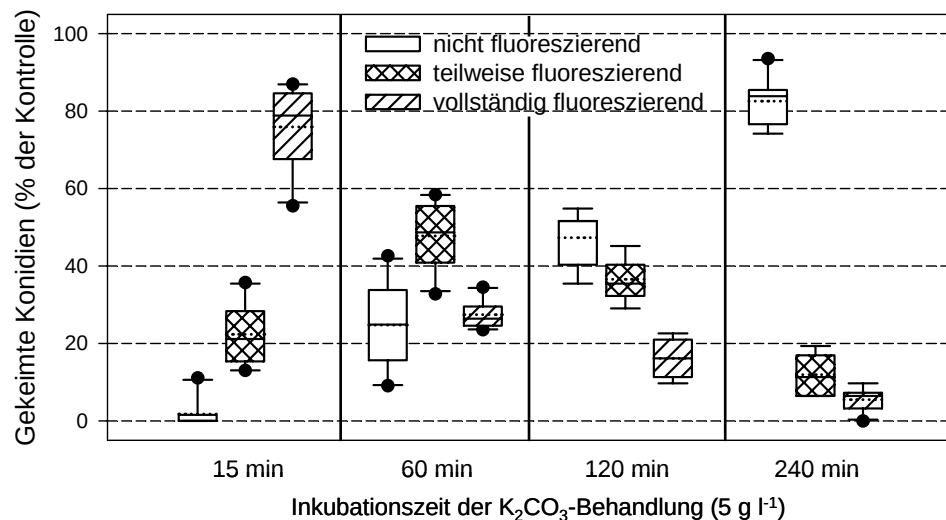
## 8.3 Abschnitt C: Wirkungsweise von Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP

### 8.3.1 Effekte auf die Vitalität gekeimter Konidien

#### 8.3.1.1 Kaliumcarbonat

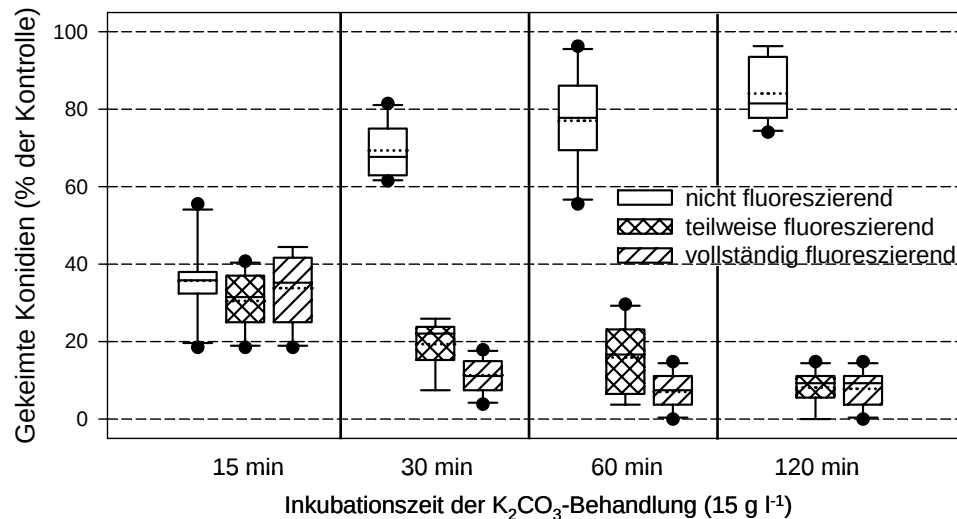
Die Vitalität der gekeimten Konidien, die 24 Stunden nach Inokulation mittels FDA-Vitalfärbung ermittelt wurde, zeigte sowohl eine Abhängigkeit von der Konzentration der applizierten Kaliumcarbonat-Lösungen als auch von der Inkubationszeit der Behandlungen (Abbildung 8-19, Abbildung 8-20 und Abbildung 8-21). Die stärksten Effekte wurden jeweils für eine Konzentration von 5 g l<sup>-1</sup> und eine Inkubationszeit von 240 Minuten, für 15 g l<sup>-1</sup> und 120 Minuten, für 35 g l<sup>-1</sup> und 60 Minuten sowie für 80 g l<sup>-1</sup> und 15 Minuten ermittelt. 100%ig reduziert werden konnte der Prozentsatz Rate teilweise und vollständig fluoreszierender Konidien allerdings nur bei 35 g l<sup>-1</sup> und 60minütiger Inkubation sowie bei 80 g l<sup>-1</sup> und 15minütiger Inkubation (Abbildung 8-21).

Neben der Konzentration und der Inkubationszeit hatte auch der Zeitpunkt der Behandlung einen Einfluss auf die Vitalität der gekeimten Konidien. Der stärkste Effekt wurde für eine Konzentration von 5 g l<sup>-1</sup> mit 15minütiger Inkubationszeit bei einer Behandlung 6 Stunden nach Inokulation erzielt (Abbildung 8-22), wobei die Prozentsätze teilweise und vollständig fluoreszierender Konidien auf 15,1 % (Stabw. ± 11,8 %) bzw. 51,2 % (Stabw. ± 9,9 %) reduziert wurden.



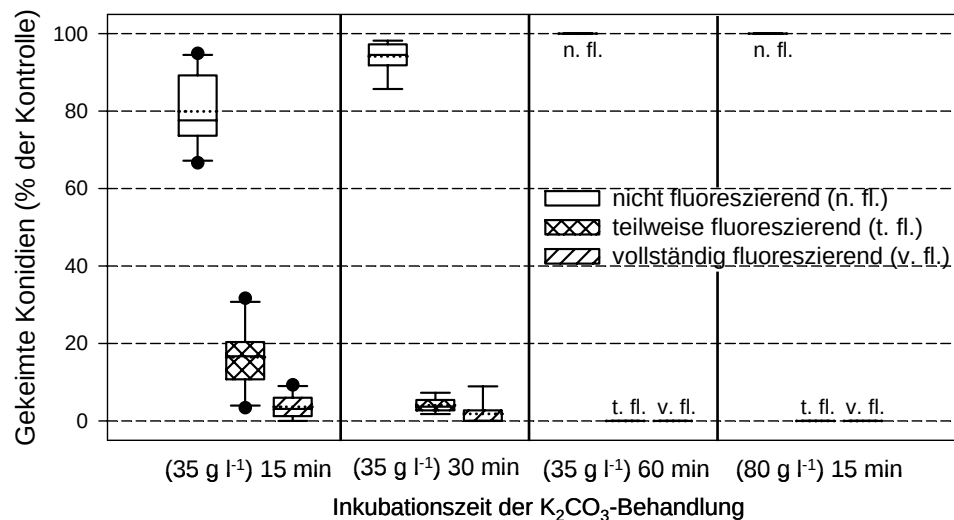
**Abbildung 8-19. Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von Kaliumcarbonat (5 g l<sup>-1</sup>) auf die Vitalität gekeimter Konidien.**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach angegebener Inkubationszeit wieder abgespült. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender, gekeimter Konidien wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl der gekeimten Konidien der unbehandelten Kontrolle.



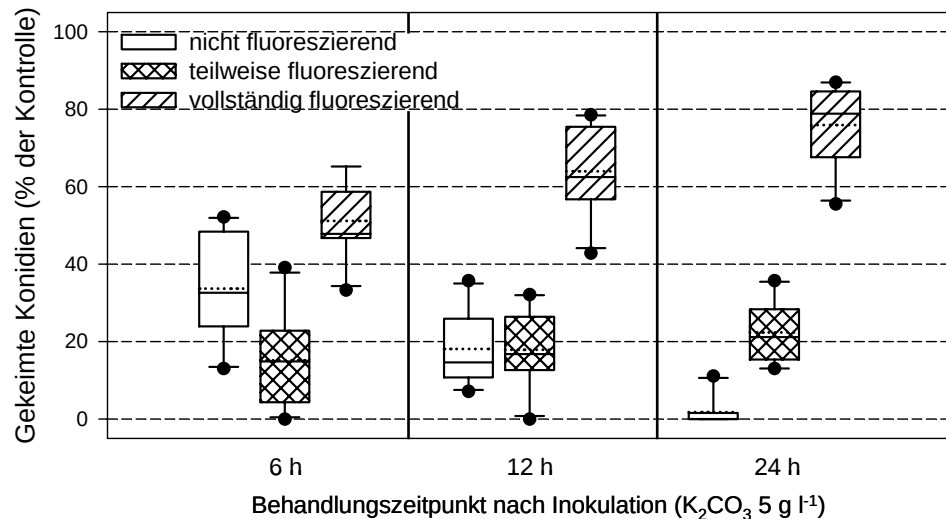
**Abbildung 8-20. Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von Kaliumcarbonat (15 g l<sup>-1</sup>) auf die Vitalität gekeimter Konidien.**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach angegebener Inkubationszeit wieder abgespült. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender, gekeimter Konidien wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl der gekeimten Konidien der unbehandelten Kontrolle.



**Abbildung 8-21. Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von Kaliumcarbonat (35 bzw. 80 g l<sup>-1</sup>) auf die Vitalität gekeimter Konidien.**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach angegebener Inkubationszeit wieder abgespült. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender, gekeimter Konidien wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl der gekeimten Konidien der unbehandelten Kontrolle.



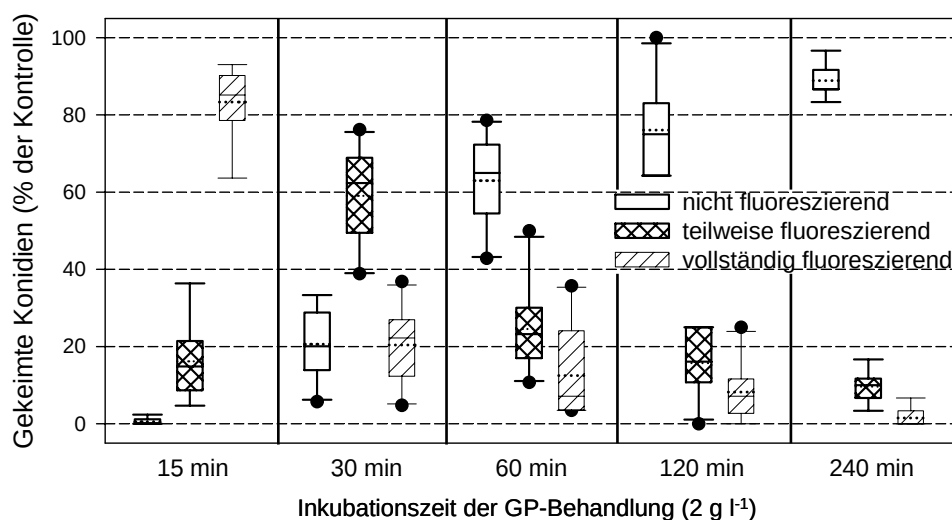
**Abbildung 8-22. Einfluss des Behandlungszeitpunktes nach Inokulation auf die Wirkung von Kaliumcarbonat (5 g l<sup>-1</sup>) auf die Vitalität gekeimter Konidien.**

Die Behandlungen wurden 6, 12 bzw. 24 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender, gekeimter Konidien wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl der gekeimten Konidien der unbehandelten Kontrolle.

### 8.3.1.2 Glucopon 215 CSUP

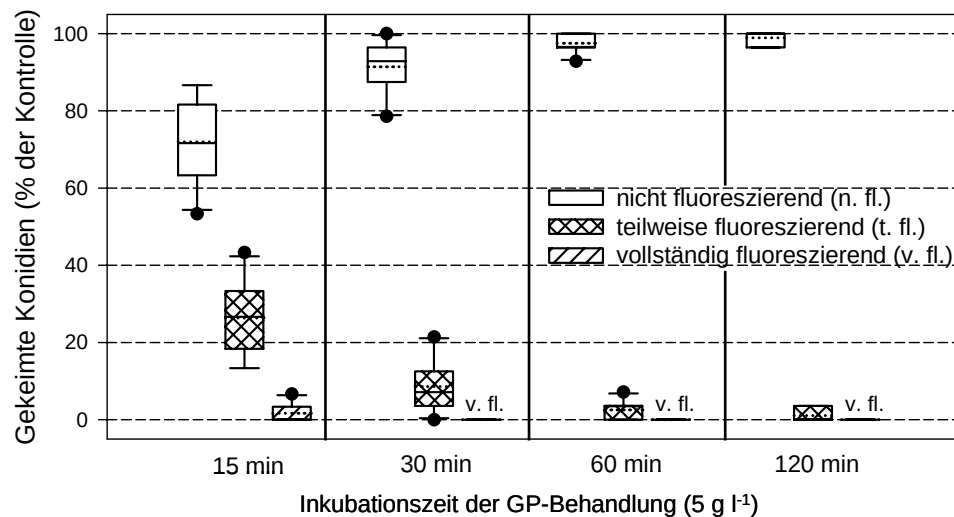
Analog den Ergebnissen für Kaliumcarbonat hatten auch bei GP-Behandlungen die Konzentration, die Inkubationszeit sowie der Behandlungszeitpunkt einen Einfluss auf die Wirkung bzw. auf die Vitalität gekeimter Konidien (Abbildung 8-23, Abbildung 8-24 und Abbildung 8-25). Den stärksten Effekt zeigte die GP-Behandlung 24 Stunden nach Inokulation bei einer Konzentration von  $5 \text{ g l}^{-1}$  und 120minütiger Inkubationszeit (Abbildung 8-24) bzw. die Behandlung 6 Stunden nach Inokulation bei gleicher Konzentration und 15minütiger Inkubationszeit (Abbildung 8-25).

Die Appressorien zeigten sich gegenüber den GP-Behandlungen besonders widerstandsfähig. Bei teilweise fluoreszierenden Keimhyphen waren es in der Regel Appressorien, die noch fluoreszierten (Abbildung 8-5 F).



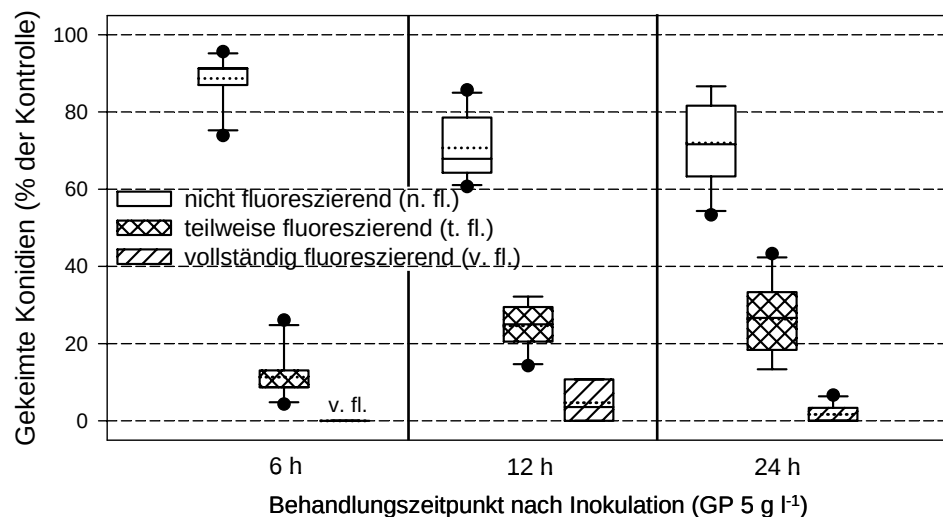
**Abbildung 8-23. Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von GP ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien.**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach angegebener Inkubationszeit wieder abgespült. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender, gekeimter Konidien wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl der gekeimten Konidien der unbehandelten Kontrolle.



**Abbildung 8-24. Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von GP (5 g l<sup>-1</sup>) auf die Vitalität gekeimter Konidien.**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach angegebener Inkubationszeit wieder abgespült. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender, gekeimter Konidien wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl der gekeimten Konidien der unbehandelten Kontrolle.

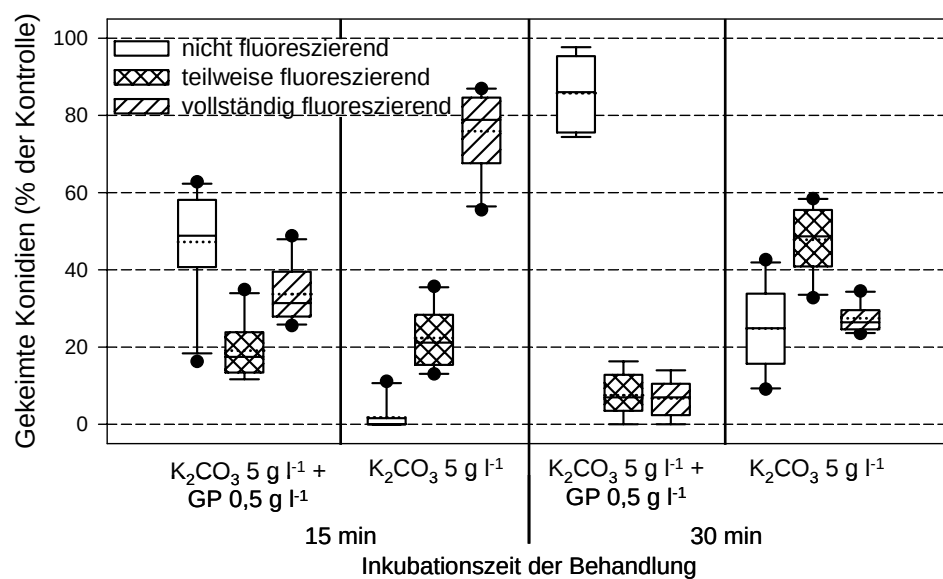


**Abbildung 8-25. Einfluss des Behandlungszeitpunktes nach Inokulation auf die Wirkung von GP (5 g l<sup>-1</sup>) auf die Vitalität gekeimter Konidien.**

Die Behandlungen wurden 6, 12 bzw. 24 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender, gekeimter Konidien wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl der gekeimten Konidien der unbehandelten Kontrolle.

### 8.3.1.3 Kaliumcarbonat + Glucopon 215 CSUP

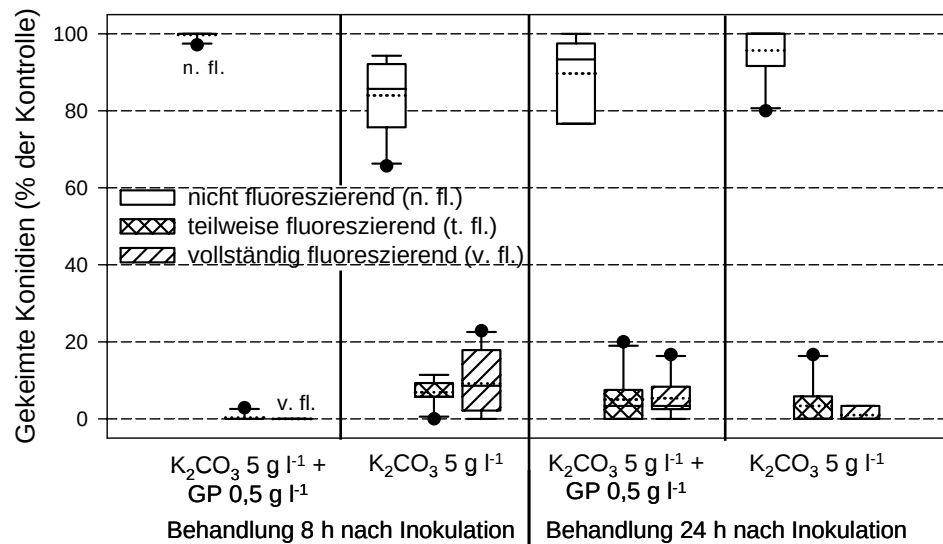
In Kombination zeigten Kaliumcarbonat und GP, trotz jeweils niedriger Konzentrationen, eine deutlich bessere Wirkung als die jeweilige Substanz alleine (vergleiche Abschnitt 8.3.1.3 mit Abschnitt 8.3.1.1 und Abschnitt 8.3.1.2). Die Effekte der beiden Substanzen auf die Vitalität gekeimter Konidien waren sowohl abhängig von der Inkubationsdauer der Behandlung, als auch vom Behandlungszeitpunkt (Abbildung 8-26 und Abbildung 8-27). Im Vergleich war die Wirkung der Kombination aus Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) und GP ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) immer besser als die Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) alleine.



**Abbildung 8-26. Einfluss der Inkubationszeit der Behandlung auf die Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) + GP ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Vitalität gekeimter Konidien im Vergleich zu Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ).**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach angegebener Inkubationszeit wieder abgespült. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender, gekeimter Konidien wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl der gekeimten Konidien der unbehandelten Kontrolle.





**Abbildung 8-27. Einfluss des Behandlungszeitpunktes nach Inokulation auf die Wirkung von Kaliumcarbonat (5 g l<sup>-1</sup>) + GP (0,5 g l<sup>-1</sup>) auf die Vitalität gekeimter Konidien im Vergleich zu Kaliumcarbonat (5 g l<sup>-1</sup>) alleine.**

Die Behandlungen wurden 8 bzw. 24 h nach Inokulation appliziert, nicht wieder abgespült und für weitere 24 h inkubiert. Die Prozentsätze nicht, teilweise bzw. vollständig fluoreszierender, gekeimter Konidien wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen den Prozentsatz der jeweiligen Kategorie bezogen auf die Anzahl der gekeimten Konidien der unbehandelten Kontrolle.

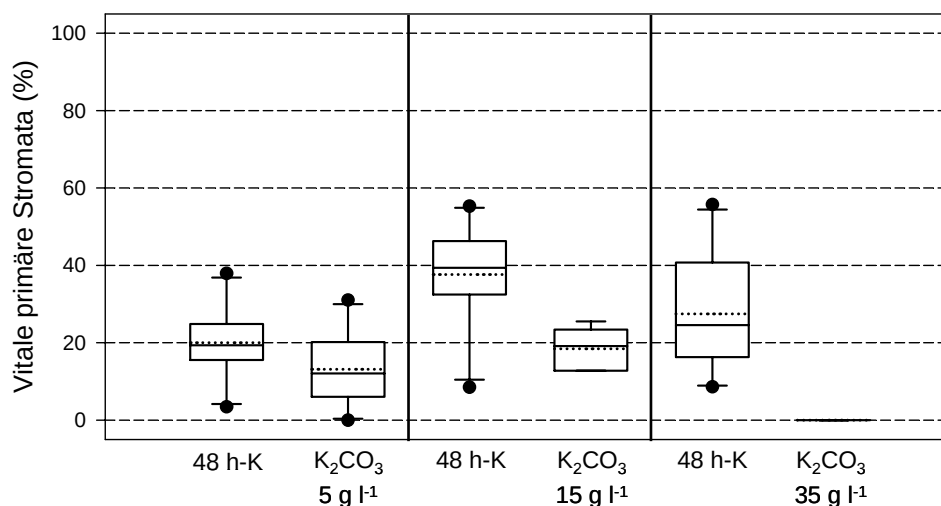
### 8.3.2 Postinfektionelle Wirkung

#### 8.3.2.1 Kaliumcarbonat

Auch bezüglich des Prozentsatzes vitaler primärer Stromata zeigten die Wirkungen der Behandlungen mit Kaliumcarbonat eine Abhängigkeit von der Konzentration und dem Behandlungszeitpunkt (Abbildung 8-28 und Abbildung 8-29).

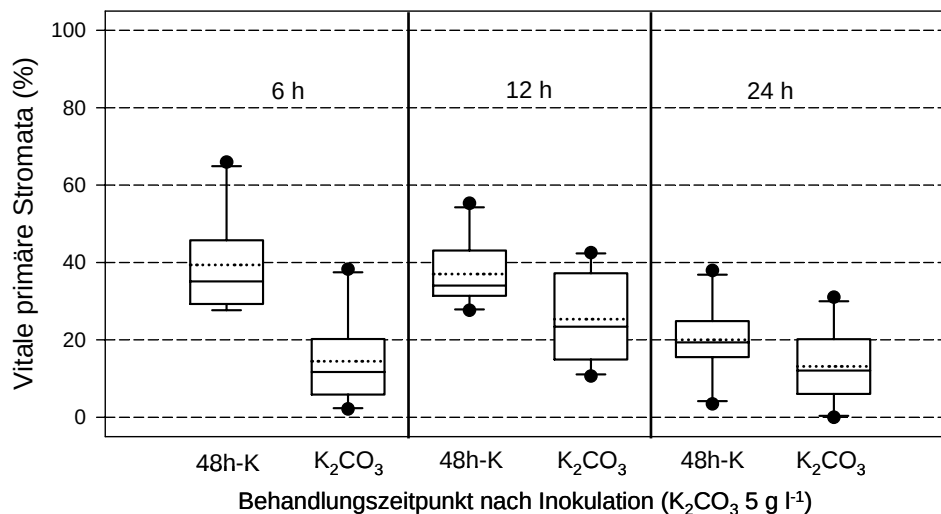
Bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation und 15minütiger Inkubationszeit konnte eine Konzentration von  $5 \text{ g l}^{-1}$  den Prozentsatz vitaler primärer Stromata gegenüber der 48 h-Kontrolle nur unwesentlich reduzieren (20,0 % (Stabw.  $\pm 9,4$  %) zu 13,2 % (Stabw.  $\pm 9,1$  %)) (Abbildung 8-28). Bei einer Konzentration von  $15 \text{ g l}^{-1}$  wurde der Prozentsatz vitaler primärer Stromata um etwa 50 % gegenüber der 48 h-Kontrolle reduziert (37,7 % (Stabw.  $\pm 13,0$ ) zu 18,4 % (Stabw.  $\pm 5,2$  %)). In der höchsten getesteten Konzentration von  $35 \text{ g l}^{-1}$  konnte der Prozentsatz sogar auf Null reduziert werden.

Bei den verschiedenen Behandlungszeitpunkten, deren Einfluss bei einer Konzentration von  $5 \text{ g l}^{-1}$  getestet wurde, war die Wirkung bei einer Applikation 6 Stunden nach Inokulation am stärksten (Abbildung 8-29). Der Prozentsatz vitaler primärer Stromata wurde um über 60 % gegenüber der 48 h-Kontrolle reduziert (39,4 % (Stabw.  $\pm 12,5$ ) zu 14,7 % (Stabw.  $\pm 11,5$  %)).



**Abbildung 8-28. Einfluss der Konzentration auf die postinfektionelle Wirkung von Kaliumcarbonat (5 g l<sup>-1</sup>) auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation.**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 48 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle.



**Abbildung 8-29. Einfluss des Behandlungszeitpunktes auf die postinfektionelle Wirkung von Kaliumcarbonat (5 g l<sup>-1</sup>) auf die Anzahl vitaler primärer Stromata.**

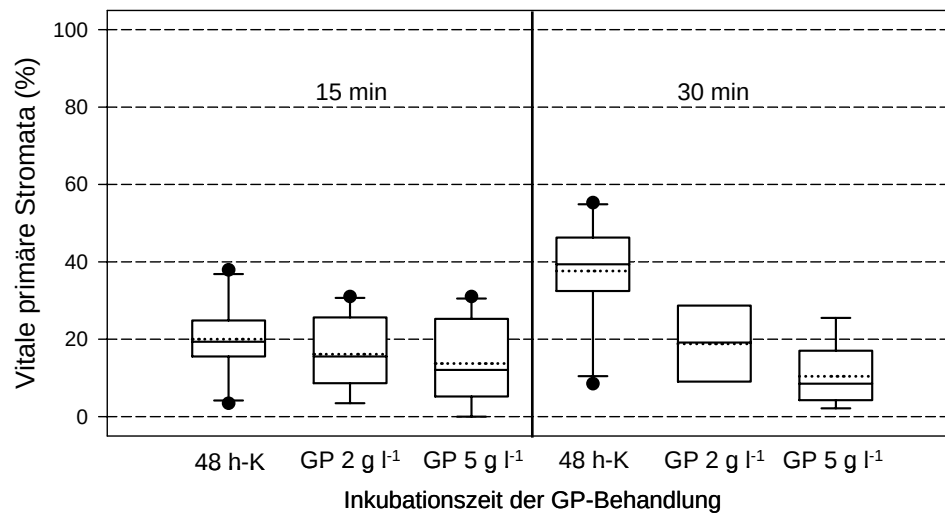
Die Behandlungen wurden 6, 12 bzw. 24 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 48 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle.

### 8.3.2.2 Glucopon 215 CSUP

Die Wirkungen der Behandlungen mit GP zeigten auf den Prozentsatz vitaler primärer Stromata eine Abhängigkeit von der Konzentration aber insbesondere von der Inkubationsdauer der Behandlung und zum Behandlungszeitpunkt (Abbildung 8-30 und Abbildung 8-31).

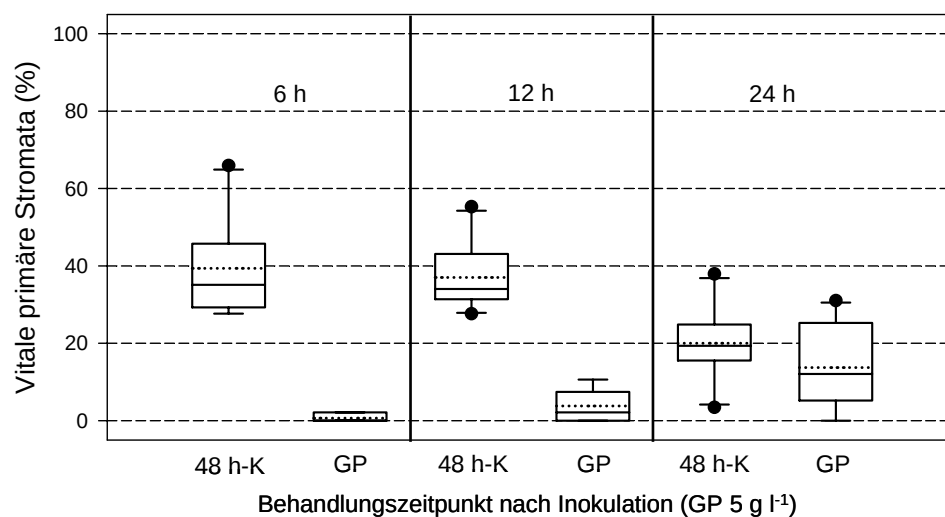
Bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation und 15minütiger Inkubationszeit konnte GP in den Konzentrationen 2 und 5 g l<sup>-1</sup> den Prozentsatz vitaler primärer Stromata gegenüber der 48 h-Kontrolle kaum reduzieren (20,0 % (Stabw. ± 9,4 %) zu 16,1 % (Stabw. ± 9,6 %) und zu 13,7 % (Stabw. ± 10,9 %)) (Abbildung 8-30). Bei 30minütiger Inkubationszeit waren die Effekte deutlicher. Der Prozentsatz vitaler primärer Stromata wurde bei einer Konzentration von 2 g l<sup>-1</sup> um etwa 50 % und bei einer Konzentration von 5 g l<sup>-1</sup> um etwa 70 % gegenüber der 48 h-Kontrolle reduziert (37,7 % (Stabw. ± 13,0) zu 18,8 % (Stabw. ± 10,6 %) und zu 10,4 % (Stabw. ± 8,0 %)).

Bei den verschiedenen Behandlungszeitpunkten, deren Einfluss bei einer Konzentration von 5 g l<sup>-1</sup> getestet wurde, war die Wirkung bei einer Applikation 6 Stunden nach Inokulation am stärksten (Abbildung 8-31). Der Prozentsatz vitaler primärer Stromata wurde um fast 100 % gegenüber der 48 h-Kontrolle reduziert (39,4 % (Stabw. ± 12,5) zu 0,6 % (Stabw. ± 1,0 %)).



**Abbildung 8-30. Einfluss der Konzentration sowie der Inkubationszeit der Behandlung mit GP auf die postinfektionelle Wirkung auf die Anzahl vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 24 Stunden nach Inokulation.**

Die Behandlungen wurden 24 h nach Inokulation appliziert und nach angegebener Inkubationszeit wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 48 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle.

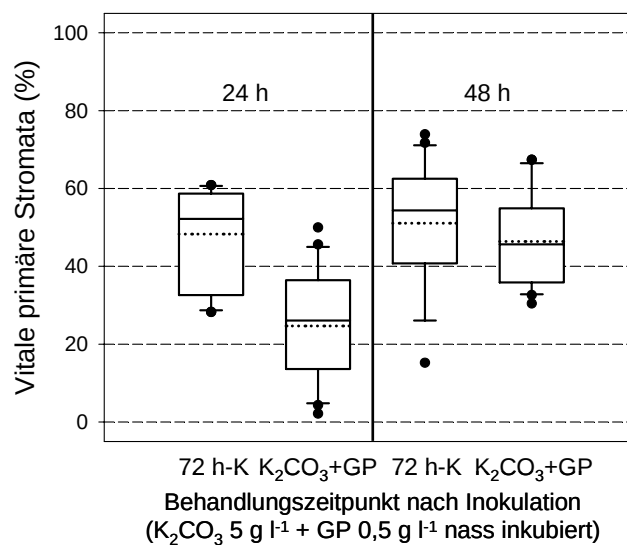


**Abbildung 8-31. Einfluss des Behandlungszeitpunktes auf die postinfektionelle Wirkung von GP (5 g l<sup>-1</sup>) auf die Anzahl vitaler primärer Stromata.**

Die Behandlungen wurden 6, 12 bzw. 24 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 48 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle.

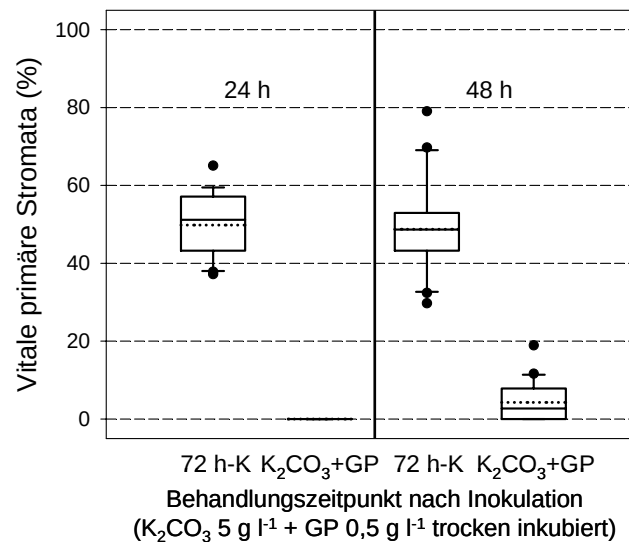
### 8.3.2.3 Kaliumcarbonat + Glucopon 215 CSUP

Die Effekte von Kaliumkarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) und GP ( $0,5 \text{ g l}^{-1}$ ) in Kombination wurden bei Behandlungen 24 und 48 Stunden nach Inokulation ermittelt, wobei in einem Fall die Inkubation nach erfolgter Behandlung unter nassen und im anderen Fall unter trockenen Bedingungen erfolgte (Abbildung 8-32 und Abbildung 8-33). Dabei zeigte sich, dass der Effekt der Behandlung deutlich stärker war, wenn die Behandlungslösung nach erfolgter Applikation eintrocknete (Abbildung 8-32 und Abbildung 8-33). Wurde die Behandlung 24 Stunden nach Inokulation durchgeführt und trocknete an, so reduzierte sich der Prozentsatz vitaler primärer Stromata gegenüber der 72 h-Kontrolle auf Null.



**Abbildung 8-32. Einfluss des Behandlungszeitpunktes auf die postinfektionelle Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) + GP ( $2 \text{ g l}^{-1}$ ) auf die Anzahl vitaler primärer Stromata.**

Die Behandlungen wurden 24 bzw. 48 h nach Inokulation appliziert und nach 15 Minuten Inkubation wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 72 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle.



**Abbildung 8-33. Einfluss des Behandlungszeitpunktes auf die postinfektionelle Wirkung von Kaliumcarbonat (5 g l<sup>-1</sup>) + GP (2 g l<sup>-1</sup>) auf die Anzahl vitaler primärer Stomata bei trockenen Inkubationsbedingungen.**

Die Lösungen wurden 24 bzw. 48 h nach Inokulation appliziert und trockneten im Luftstrom ein. Die Anzahl vitaler primärer Stomata wurde 72 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stomata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle.

## 9 Diskussion

### 9.1 Abschnitt A: Wirkungsweise von Kupferverbindungen

#### 9.1.1 Protektive Wirkung von Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid sowie den Filtraten von Kupferhydroxid und Kupferoxid

Die Ergebnisse der Versuche zur protektiven Wirkung von Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Kupferoxid erscheinen zunächst eindeutig, da alle drei Verbindungen die Keimung sowie die Atmung der Konidien ab einer Konzentration von  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  vollständig hemmten (Tabelle 8-1). Trotzdem werfen die Ergebnisse einige Fragen auf. Zum Einen liegen die Löslichkeiten von Kupferhydroxid und Kupferoxid weit unter  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ . Die Wasserlöslichkeit von Kupferhydroxid beträgt  $3 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  und Kupferoxid ist wasserunlöslich (TOMLIN 1997). Daher befanden sich selbst bei Kupferhydroxid weniger als  $1 \text{ mmol Cu}^{2+}\text{-Ionen l}^{-1}$  in Lösung, was nur 3 % entspricht. Der ungelöste Rest der Verbindungen lag in Form fester Partikel vor (Abbildung 8-2 D+E). Diese Tatsache schließt vor allem für Kupferoxid aus, dass die gelösten  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen für die Wirkung verantwortlich sein können. Es stellt sich somit die Frage, wie die Wirkungen von Kupferhydroxid und Kupferoxid anders erklärt werden können (Abschnitt 3.5.1.1). Zum Anderen zeigte sich ein möglicher Unterschied auch in den Wirkungen von Kupfersulfat und den schwer- bzw. unlöslichen Kupferverbindungen bei den Ergebnissen der Vitalfärbung mit FDA (Tabelle 8-1).

Protektive Behandlungen mit Kupfersulfat verhinderten die Sporenkeimung und eliminierten die Fluoreszenz der ungekeimten Sporen nach Anfärbung mit FDA bzw. CTC. Das bedeutet, dass ab einer Konzentration von  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  keine Esteraseaktivität mehr vorlag bzw. es zu Beschädigungen des Plasmalemmas gekommen war und, dass die Atmung in den Mitochondrien zum Erliegen gekommen war (Abschnitt 5). Bei Behandlungen mit Kupferhydroxid und Kupferoxid müssen in einigen Sporen zumindest die Cytoplasmamembranen noch intakt gewesen sein und es muss es noch aktive Esterasen gegeben haben, da bei der niedrigsten Konzentration jeweils rund 1/3 der ungekeimten Konidien nach Anfärbung mit FDA noch fluoreszierten (Tabelle 8-1). Diese Ergebnisse implizieren, dass Kupfersulfat zumindest auf Esterasen und Membranen toxischer wirkt als Kupferhydroxid und Kupferoxid. Dieser Effekt ist vermutlich auf die höhere Wasserlöslichkeit von Kupfersulfat zurückzuführen, der eine höhere Konzentration von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen bedingt. Auch die Ergebnisse der Versuche mit den Filtraten deuten darauf hin, dass der Effekt auf die Cytoplasmamembranen und Esterasen von der Konzentration der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen abhängig ist (Tabelle 8-2). So verursachte das Filtrat von Kupferhydroxid eine leichte



Keimhemmung und konnte die Bildung von Appressorien verhindern, wobei aber alle gekeimten Konidien und deren Keimschläuche nach FDA-Färbung fluoreszierten (Abbildung 8-2 F). Die Konzentration an  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im Überstand bzw. im Filtrat der Kupferhydroxid-Suspension betrug  $3 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ , wohingegen die geringste Konzentration in den Kupfersulfat-Behandlung bei  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  lag, was um einen Faktor von 33 höher ist. Offensichtlich war die Konzentration der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen im Filtrat von Kupferhydroxid zu gering, um die Keimung und die Fluorescein-Fluoreszenz vollständig zu hemmen. Allerdings reichte die Konzentration aus, um die Bildung von Appressorien und somit den Beginn des Infektionszyklusses zu verhindern. Das Filtrat der Kupferoxid-Suspension hatte keine Wirkung (Tabelle 8-2), was bestätigt, dass die Konzentration der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, wie es aus der Literatur zu erwarten war (RÖMPP 1995), offensichtlich praktisch Null war.

Bei Behandlungen mit den Kupferhydroxid-Suspensionen wurde die Sporenkeimung verhindert und die Fluorescein-Fluoreszenz nahm mit steigender Suspensionskonzentration ab (Tabelle 1), obwohl die Konzentration gelöster Ionen konstant blieb. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Konzentration freier  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen nicht alleine für die Wirkung verantwortlich sein kann.

Bei der Inokulation wurde die Sporensuspension auf die Stelle des eingetrockneten Behandlungsrückstandes pipettiert (Abschnitt 7.3.1.1). Die ungekeimten Konidien waren somit von Kupferhydroxid und Kupferoxid-Partikeln umgeben (Abbildung 8-2 D+E). Kupferhydroxid löste sich im Tropfen bis zur Sättigung der Lösung. Wenn  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Aufnahme in die Spore aus der Lösung entfernt werden, werden neue  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen gelöst, bis die Sättigung wieder erreicht ist. Dieses Szenario, das der Hypothese von PICKERING (1912) entspricht (Abschnitt 3.5.1.1), reicht allerdings alleine nicht aus, um die Daten zu erklären, die eine abnehmende Anzahl fluoreszierender Sporen bei steigender Kupferhydroxid-Konzentration und keinen konstanten Effekt zeigen. Es bleiben zwei Möglichkeiten, die Daten zu erklären: (I) Der fungizide Effekt ist diffusionsabhängig, so dass Partikel in der Nähe der Spore  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, die von der Spore aufgenommen wurden, schneller nachliefern. (II) Die Verfügbarkeit von Kupfer aus den Rückständen wird durch den direkten Kontakt zwischen dem Rückstand und der Membran der Spore und deren Exsudaten erhöht.

Die erste der beiden Hypothesen kann ausgeschlossen werden, da Diffusionskoeffizienten in Wasser sehr hoch sind und die Distanzen zwischen den Sporen und den Partikeln nur im Mikrometerbereich liegen (Abbildung 8-6 D+E). Anhand der Zeit-Strecken-Abhängigkeit des Fick'schen Gesetzes lässt sich berechnen, dass die Zeit, die benötigt wird, ein neues

Gleichgewicht herzustellen weniger als eine Sekunde beträgt (NOBEL 1983). Zudem würde Hypothese I auch als Erklärung für die mit Kupferoxid erzielten Ergebnisse versagen. Da Kupferoxid praktisch unlöslich ist, kann Wasser nicht als Transportmedium für  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen dienen, um die Strecke zwischen Spore und Kupferoxidrückstand zu überbrücken.

Kupferoxid war aber sehr wirksam und so bleibt nur Hypothese II, das heißt, dass der Kontakt zwischen Kupferpartikeln und Spore für deren fungizide Wirkung essentiell ist und Exsudate der Sporen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen aus den schwer- bzw. unlöslichen Kupferverbindungen lösen. Auf die mögliche Bedeutung des Kontaktes zwischen Spore und Rückstand, wie sie in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, wurde schon in der sehr frühen Literatur hingewiesen (ADERHOLD 1899, BARKER UND GIMINGHAM 1911, GIMINGHAM 1911). Wie Abbildung 8-2 D+E zeigt, nimmt die Anzahl der Partikel, die an der Spore anhaften bzw. sich in deren Nähe befinden mit steigender Konzentration zu. Die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit solcher Kontakte (kleinere Partikel, bessere Verteilung) sollte daher auch das Ziel bei der Formulierung schwer bzw. unlöslicher Kupferfungizide sein. Welche Bedeutung den Exsudaten pilzlicher Sporen zukommt, die die Verfügbarkeit des Kupfers und somit die Toxizität der Kupferverbindungen erhöhen, wurde ebenfalls bereits in früheren Studien untersucht (Abschnitt 3.5.1.1).

### 9.1.2 Postinfektionelle Wirkung von Kupfersulfat und Kupferhydroxid

#### 9.1.2.1 Postinfektionelle Wirkung von Kupfersulfat und Kupferhydroxid bei Inkubation in Wassertropfen auf Kutikularmembranen

Kupferhydroxid und Kupfersulfat zeigten unter den Bedingungen des *in vitro* Testsystems eine postinfektionelle Wirkung gegen Konidien von *V. inaequalis*, sofern das Inokulum nach der Behandlung mit Wasser bedeckt war. Sowohl Behandlungen mit Kupferhydroxid als auch Behandlungen mit Kupfersulfat töteten bereits ausgebildete primäre Stromata und konnten den Prozentsatz vitaler primärer Stromata gegenüber der 24 bzw. 48 h-Kontrolle signifikant reduzieren (Abbildung 8-3 und Abbildung 8-4)

Konidien benötigen bei 20°C 8 Stunden, um eine Infektion hervorzurufen (STENSVAND ET AL. 1997). Dass heißt, dass Kupferhydroxid in den Konzentrationen 116 und 231 mg l<sup>-1</sup> noch 16 Stunden nach Infektion (24 Stunden nach Inokulation) alle primären Stromata abtötete (Abbildung 8-3). Bei diesen Konzentrationen wurde auch noch 40 Stunden nach Infektion (48 Stunden nach Inokulation) eine sehr gute Wirkung bzw. hochsignifikante Reduzierung des Prozentsatzes vitaler primärer Stromata gegenüber der Kontrolle erzielt (Abbildung 8-4).

Behandlungen mit Kupfersulfat waren durchweg weniger effektiv als Behandlungen mit Kupferhydroxid, vor allem, da sie nicht in der Lage waren, alle primären Stromata abzutöten (Abbildung 8-3 und Abbildung 8-4). Kupfersulfat ist sehr gut wasserlöslich und das Kupfer befand sich in den getesteten Konzentrationen immer vollständig in Lösung, wohingegen sich bei Kupferhydroxid nur ein geringer Teil des Kupfers in Lösung befand. Es ist daher davon auszugehen, dass beim Spülen das gesamte gelöste Kupfersulfat entfernt wurde. Allerdings war die Wirkung von Kupfersulfat selbst dann schlechter, wenn die Behandlung erst nach 24 Stunden gespült wurde.

Kupferhydroxid hat eine Wasserlöslichkeit von  $2,9 \text{ mg l}^{-1}$  (TOMLIN 1997). Bei einem Kupfergehalt von 65 % befanden sich somit bei allen getesteten Konzentrationen rund  $1,9 \text{ mg Cu}^{2+}\text{-Ionen l}^{-1}$  in Lösung. Bei einer Wasserlöslichkeit von  $239,5 \text{ g l}^{-1}$  und einem Kupfergehalt von 40 % (TOMLIN 1997) reichten die Konzentrationen gelöster  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen bei Kupfersulfat von  $12 \text{ mg l}^{-1}$  ( $29 \text{ mg Kupfersulfat l}^{-1}$ ) bis maximal  $139 \text{ mg l}^{-1}$  ( $348 \text{ mg l}^{-1}$ ). Kupferhydroxid tötete bei einer Konzentration von  $116 \text{ mg l}^{-1}$  16 Stunden nach Infektion alle primären Stromata, wobei von den  $75 \text{ mg Kupfer l}^{-1}$ , die dabei appliziert wurden, nur  $1,9 \text{ mg l}^{-1}$  in Form von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen vorlagen (Abbildung 8-3). Da Kupfersulfat bei der höchsten Konzentration, bei der  $139 \text{ mg l}^{-1}$  in Form von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen vorlagen, nicht den gleichen Effekt erzielte, kann vermutet werden, dass die Wirkung von Kupferhydroxid nicht allein durch die Konzentration freier  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen erklärt werden kann.

Unter den Bedingungen des *in vitro* Testsystems auf CM können Exsudate der Wirtspflanze oder  $\text{CO}_2$  und Ammonium aus Regenwasser bzw. Tau als Lösungsvermittler ausgeschlossen werden. Es bleiben daher nur die Exsudate der Spore als Ursache der besseren Wirkung von Kupferhydroxid. Die Bedeutung des Kontaktes zwischen der Spore und den ungelösten Partikeln des applizierten Kupfersalzes wurde bereits diskutiert (Abschnitt 9.1.1). Auch bei den postinfektionellen Behandlungen mit Kupferhydroxid war zu beobachten, dass die Partikel vorzugsweise an der Spore anhafteten und durch den Spülvorgang nicht entfernt wurden (Abbildung 8-5 D).

#### 9.1.2.2 Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid bei Inkubation in Wassertropfen auf Blattscheiben

Die kleinste effektive Kupferhydroxid-Konzentration von  $116 \text{ mg l}^{-1}$  wurde auch auf BS getestet. Da auf BS keine Vitalfärbung der Stromata möglich war, konnte nur die Gesamtanzahl der Stromata ermittelt werden. Diese unterschied sich 72 Stunden nach Inokulation bei einer Kupferhydroxid-Behandlung 16 Stunden nach Infektion nicht

signifikant von der Anzahl der Stromata einer Kontrolle, die bereits 24 Stunden nach Inokulation ausgezählt wurde (Abbildung 8-6). Das heißt, dass die Kupferhydroxid-Behandlung die Ausbildung neuer Stromata verhindern konnte. Vermutlich tötete die Behandlung die vorhandenen Stromata ab, so dass diese sich im Vergleich zur 72 h-Kontrolle in ihrer Größe nicht weiterentwickeln konnten (vergleiche Abbildung 8-7 A+B mit Abbildung 8-7 C+D und Abbildung 8-8 A).

#### 9.1.2.3 Postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid bei trockener Inkubation auf Kutikularmembranen

Auch bei diesem Experiment wurde die kleinste effektive Kupferhydroxid-Konzentration von  $116 \text{ mg l}^{-1}$  getestet. Die Behandlungen wurden erst 40 Stunden nach Infektion bzw. 48 Stunden nach Inokulation appliziert, da sich in dieser Zeit ausreichend Stromata gebildet hatten, die eine gute Unterscheidung der Effekte ermöglichten.

Trockneten die Oberflächen der CM nach Applikation der Lösungen ab und stand bis zum Ende der Inkubationszeit kein tropfbares Wasser mehr zur Verfügung, so zeigte Kupferhydroxid keine Wirkung und konnte die Anzahl vitaler primärer Stromata gegenüber der bei gleichen Bedingungen inkubierten Kontrolle nicht signifikant reduzieren (Abbildung 8-9). Die Anzahl vitaler primärer Stromata, der unter trockenen Bedingungen inkubierten Behandlung sowie der entsprechenden Kontrolle, lagen signifikant unter dem Prozentsatz der unter normalen Bedingungen (d. h. im Tropfen) inkubierten Kontrolle. Das Fehlen von tropfbarem Wasser verhinderte weitere Penetrationsereignisse und somit die Ausbildung weiterer Stromata. Es setzte aber auch die Wirkung von Kupferhydroxid herab, da diese bei Nässe signifikant besser war.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Kupferhydroxid nur dann toxisch ist, wenn die Partikel, die in Kontakt mit der Spore stehen, von einem Wasserfilm bedeckt sind. Das heißt, dass die Spore anscheinend nur, wenn tropfbares Wasser zur Verfügung steht, in der Lage ist, Exsudate auszuscheiden, die toxische Kupferkomplexe bilden. Die Wahrscheinlichkeit, dass in der Spore eine toxische Konzentration von Kupfer erreicht wird, die das primäre Stroma abtötet, nimmt mit zunehmender Länge der Nässeperiode zu. Wie lang eine solche Nässeperiode mindestens sein muss, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. 24 Stunden waren ausreichend, aber es ist zu vermuten, dass die minimale Nässeperiode, die nötig ist, um primäre Stromata zu töten, auch von der Menge der Kupferpartikel abhängig ist, die an der Konidie, dem Keimschlauch bzw. dem Appressorium anhaften.

Die primären Stromata wurden getötet, obwohl sie keinen Kontakt mit diesen Partikeln hatten. Die gebildeten Kupferkomplexe müssen folglich von der Konidie bzw. dem Keimschlauch und dem Appressorium durch die Infektionsspore in das primäre Stroma transloziert worden sein. Eine solcher Transport erfordert, dass das Kupfer in der Spore mobil ist und nicht in unlöslicher Form ausgefällt wird. Die höhere Toxizität der Kupferkomplexe (Abschnitt 3.5.1.1, Abschnitt 9.1.1 und Abschnitt 9.1.2) könnte mit ihrer besseren Translozierbarkeit zusammenhängen. Die schlechtere Wirksamkeit von Kupfersulfat könnte dadurch bedingt sein, dass durch die sehr hohen Konzentrationen von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen die Bildung und Ausscheidung von Exsudaten sehr schnell zum Erliegen kommt und weniger mobile Kupferkomplexe gebildet werden. Diese Hypothese setzt voraus, dass freie  $\text{Cu}^{2+}$  Ionen in Sporen und Keimhyphen weniger mobil sind als die Kupferkomplexe.

### **9.1.3 Wirkung von Kupfersulfat und Kupferoxid bei Behandlungen auf Wasseragar**

Konidien bildeten auf Wasseragar keine Appressorien aus, sondern keimen lediglich mit sehr langen Keimschläuchen aus (Abbildung 8-10 und Abbildung 8-12). Ein Infektionszyklus wie auf CM oder Blattscheiben kann mit diesem System folglich nicht simuliert werden. Aus diesem Grunde wurde im Zusammenhang mit diesem System auch auf die Verwendung der Begriffe „protektiv“ und „postinfektionell“ verzichtet.

Insgesamt funktionierte die Methode in sofern gut, als dass sich die Sporen auf der planen Oberfläche gut verteilten und nicht verklumpten oder auf den Grund der Macroplatte absanken. Ein Zusammenklumpen hätte die Keimung verhindert und ein Absinken auf den Grund, das Überführen in die Messküvette, da die gekeimten Sporen auf Kunststoffoberflächen fest anhaften. Grundsätzlich funktionierten auch das Anfärben mit FDA und das Messen der Fluorescein-Fluoreszenz mit dem Spektralfotometer. Allerdings gab es auch einige Probleme, die im Prinzip alle mit den Behandlungen im Zusammenhang stehen: (I) Bei der Applikation von Lösungen kommt es zu Verdünnungseffekten, da diese in den Wasseragar hinein diffundieren. (II) Bei der Applikation von Suspensionen sinken feste Partikel in den Wasseragar ein. (III) Einige Substanzen fluoreszieren bei der verwendeten Exzitationswellenlänge selbst oder es treten Löschungseffekte auf.

Ein Verdünnungseffekt (I) lag bei Kupfersulfat vor, wobei sich dieser bei den verwendeten Konzentrationen nicht entscheidend auf den Effekt auswirkte. Bei Behandlungen vor Inokulation wurde die Keimung der Sporen vollständig verhindert, was den Ergebnissen auf CM entspricht (vergleiche Tabelle 8-1 mit Abschnitt 8.1.3.1 und Abbildung 8-10 C). Unter

dem Mikroskop zeigte sich zudem, dass die ungekeimten Sporen nicht fluoreszierten. Die dennoch gemessene Fluorescein-Fluoreszenz ist dabei auf die geringe Stabilität der FDA-Lösung zurückzuführen (Abschnitt 7.2.6.1).

Ein Einsinken der Suspensionspartikel (II) war bei den Behandlungen mit Kupferoxid vor Inokulation zu erkennen (Abbildung 8-12 D-F), was gleichzeitig den schlechten Effekt der Behandlung im Vergleich zu Behandlungen bei gleichen Konzentrationen auf CM erklärt (vergleiche Tabelle 8-1 mit Abbildung 8-10). Da durch das Absinken der Partikel kein guter Kontakt zu den Sporen hergestellt werden konnte, zeigte die Konzentration von Kupferoxid einen deutlichen Einfluss auf die Länge der Keimschläuche und somit auf die Fluorescein-Fluoreszenz (Abschnitt 9.1.1, Abschnitt 9.1.2.1 und Abschnitt 9.1.2.3).

Das dritte Problem trat bei den verwendeten Substanzen nicht auf, führte aber zum Ausschluss zahlreicher anderer Substanzen, die ursprünglich für zusätzliche Messungen vorgesehen waren.

Die Ergebnisse der Versuche, bei denen die Behandlungen 22 Stunden nach Inokulation erfolgten, stimmen insofern mit den Ergebnissen der Versuche auf CM überein, als dass Kupfersulfat und somit die gelösten  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen sehr toxisch auf Esterasen bzw. die Membranintegrität wirkten und sich für Kupferoxid eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit der Fluorescein-Fluoreszenz zeigte (vergleiche Tabelle 8-1 und Abbildung 8-11).

#### **9.1.4 Vergleich der Versuche auf Kutikularmembranen, Blattscheiben und Wasseragar**

Bei einem Vergleich der drei verwendeten Systeme erwies sich das auf CM basierende Testsystem insgesamt als sehr vorteilhaft.

Die Experimente auf BS dienten als zusätzliche Kontrolle der auf CM erzielten Ergebnisse, die eine postinfektionelle Wirkung von Kupferhydroxid und Kupfersulfat gezeigt hatten (Abschnitt 9.1.2.1 und Abschnitt 9.1.2.2). Die Idee war, sich mit BS den *in vivo* Bedingungen ein Stückchen anzunähern, wobei die auf CM erzielten Ergebnisse letztendlich bestätigt werden konnten. Neben der sehr viel aufwendigeren Methode, erwies sich bei den Versuchen auf BS als Nachteil, dass keine Vitalfärbung angewendet und somit keinerlei Aussagen über die Vitalität der Stomata getroffen werden konnten. Die Versuche auf BS machten aber auch deutlich, dass Untersuchungen postinfektioneller Wirkungen mit dem auf CM basierenden Testsystem nur bis zu einem bestimmten Stadium den natürlichen Infektionsprozess widerspiegeln. Bei Verwendung von CM ist die subkutikuläre Entwicklung nach der Ausbildung des primären Stomas abgeschlossen bzw. entspricht dann nicht mehr der

Entwicklung im Blatt (vergleiche Abbildung 8-7 A-C mit Abbildung 8-8 C+D und Abbildung 8-9). Das liegt vermutlich daran, dass dem Pathogen auf CM außer Kutin keine weiteren Substrate oder Nährstoffe zur Verfügung stehen. Das auf CM basierende Testsystem war aber sehr gut geeignet bis zur Ausbildung des primären Stromas auch postinfektionelle Wirkungen zu untersuchen.

Die Ermittlung von Effekten der getesteten Kupferverbindungen mittels der Quantifizierung der Fluorescein-Fluoreszenz war mit einigen bereits genannten Problemen verbunden (Abschnitt 9.1.3). Das System kommt zwar ohne das zeitaufwändige Zählen der Sporen aus, entfernt die Sporen aber zugleich sehr weit von ihrem natürlichen Lebensraum und dem natürlichen Infektionszyklus. Die Untersuchung der postinfektionellen Wirkungen einer Substanz wäre damit zum Beispiel nicht möglich. Hinzu kommt, dass eine alleinige Anwendung des Systems zu Fehlschlüssen hätte führen können, wie Vergleiche mit den auf CM erzielten Ergebnissen gezeigt haben (Abschnitt 9.1.3). Insgesamt kann daher gesagt werden, dass sich die Mühe des Zählens auszahlt, da das auf CM basierende Testsystem die natürlichen Lebensbedingungen bzw. die natürliche Entwicklung des Pathogens sehr gut widerspiegelt, was schließlich die Ergebnisse einfacher und besser interpretierbar macht.

#### **9.1.5 Generierung von ROS in Suspensionen von Kupferhydroxid und Kupferoxid**

Die fungizide Wirkung von Zinkoxid ist in der Literatur belegt (SAWAI UND YOSHIKAWA 2004) und konnte in eigenen Experimenten, bei denen Suspensionen protektiv appliziert wurden bestätigt werden. In den Zinkoxid-Suspensionen, die als Positivkontrollen dienten, wurden wie aus der Literatur zu erwarten war, hohe Lumineszenzwerte (RLU) und somit große Mengen an ROS gemessen (Abbildung 8-14). Bei Zugabe von Katalase reduzierten sich die RLU-Werte in den Bereich der Negativkontrolle ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  + PMAC). Daraus kann geschlossen werden, dass die ROS in den Zinkoxid-Suspensionen hauptsächlich in Form von Wasserstoffperoxyd ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) vorlagen, da  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Katalase zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  umgesetzt wird (AEBI 1987).

In den Suspensionen von Kupferhydroxid und Kupferoxid waren hingegen nur zu vernachlässigende Mengen an ROS nachweisbar (Abbildung 8-14), womit ausgeschlossen werden kann, dass in den Suspensionen gebildete ROS an der Wirkung der beiden Substanzen beteiligt sind. Das heißt, dass Kupfer in Form von Ionen oder Komplexen in die Spore aufgenommen werden muss, um toxisch zu wirken.

### 9.1.6 Zusammenfassende Diskussion von Abschnitt A: Auswirkungen auf die Schorfkontrolle mit Kupfer unter Feldbedingungen

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse bieten wichtige Anhaltspunkte, Strategien zur Kupferminimierung zu verbessern. In erster Linie zeigen sie auch die Grenzen solcher Strategien und begründen diese.

Die Ergebnisse zeigen, dass nur sehr geringe Mengen an Kupfer nötig sind, um die Spore am Auskeimen zu hindern. Bei leichtlöslichen Substanzen wie Kupfersulfat beruht die Wirkung auf den freien  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen. Dabei war eine Konzentration von  $3 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$  ausreichend, um die Bildung von Appressorien zu verhindern (Abschnitt 9.1.1 und Tabelle 8-2). Eine Konzentration von  $1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$  war ausreichend, um die Atmung zum Erliegen zu bringen (Abschnitt 9.1.1 und Tabelle 8-1). Nimmt man eine Konzentration von  $1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$  als Grundlage, so würden bei einer Wasseraufwandmenge von  $1000 \text{ l ha}^{-1}$  theoretisch lediglich 16 g Kupfersulfat bzw. 6,4 g Kupfer nötig sein, um alle Sporen am Keimen zu hindern. Aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit ist Kupfersulfat als protektives Fungizid allerdings ungeeignet, da es bei Regen sofort abgewaschen würde. Unklar ist dabei zudem, wie lange die Inkubationszeit der Behandlung sein müsste. Dass diese eine wichtige Rolle spielt, haben die Ergebnisse der Versuche zur postinfektionellen Wirkung von Kupfersulfat gezeigt. Bei Inkubationszeiten von 15 Minuten wurden wesentlich schlechtere Effekte erzielt, als bei Inkubationszeiten von 24 Stunden (Abschnitt 9.1.2.1, Abbildung 8-3 und Abbildung 8-4). Trocknete die CM sofort nach der Behandlung ab, so wurde mit Kupferhydroxid gar kein Effekt erzielt (Abschnitt 9.1.2.3 und Abbildung 8-9). Die Effekte der protektiven Behandlungen wurden erst 24 Stunden nach Inokulation ausgewertet. Die nötige Inkubationszeit für protektive Behandlungen liegt bei den getesteten Konzentrationen folglich bei maximal 24 Stunden.

Im Gegensatz zu Kupfersulfat sind Kupferhydroxid und Kupferoxid sowie andere schwer- oder unlösliche Kupferverbindungen für eine protektive Strategie gut geeignet, da sie gut an der Kutikula von Früchten und Blättern haften. Zudem kann die Regenfestigkeit der Partikel durch die Formulierung verbessert werden. Wie die Ergebnisse gezeigt haben, ist der direkte Kontakt zwischen den Sporen und den Kupferpartikeln essentiell (Abschnitt 9.1.1, Abschnitt 9.1.2.3 und Abschnitt 9.1.3). Die Kupferkonzentrationen, die benötigt werden, um in Form von Kupferkomplexen fungizid wirksam zu sein, sind dabei sehr gering. Um die ausgebrachten Kupfermengen in der Praxis zu reduzieren, sollte versucht werden möglichst kleine Kupferpartikel so auf Blättern und Früchten zu verteilen, dass die Wahrscheinlichkeit des Kontaktes zur Spore maximiert wird. Kolloidales Kupfer, dessen Partikelgröße im



Submikrometerbereich liegt, sollte ausreichende Mengen Kupfer zur Komplexbildung liefern. Aber auch bei optimaler Verteilung würden wahrscheinlich mehr als 6,4 g Kupfer ha<sup>-1</sup> nötig sein, da nicht alle Partikel Kontakt zu Sporen haben und immer nur ein Teil des Kupfers in den Partikeln an der Toxizität beteiligt ist. Der nötige Kontakt zur Spore schränkt die Möglichkeiten zur Kupferminimierung mit schwer- und unlöslichen Kupferverbindungen allerdings auch ein. Daraus folgt nämlich, dass der Neuzuwachs immer ungeschützt ist bzw., dass das Kupfer sehr oft nachgelegt werden muss, um den Neuzuwachs zu schützen.

An diesem Punkt, der in der Praxis bekannt ist (Abschnitt 3.5.1), setzen Strategien zur gezielten Applikation von Kupfer an. Wird erst dann appliziert, wenn auch tatsächlich mit einer Infektion zu rechnen ist, können dadurch zahlreiche Applikationen und somit Kupfer gespart werden. Aber auch dieser Strategie sind Grenzen gesetzt, vor allem, wenn davon ausgegangen wird, dass Kupfer keine postinfektionelle Wirkung hat. Dies hätte zur Folge, dass eine Applikation, wenn der Regen schon eingesetzt hat, vor Abschluss einer Infektionsperiode abgeschlossen sein muss. Bei einer Durchschnittstemperatur von 10°C stünden einem Anbauer in der Ascosporensaison nach STENSVAND ET AL. (1997) lediglich 11 Stunden zur Verfügung, um all seine Anlagen zu behandeln. Mit der herkömmlichen Applikationstechnik ist dies praktisch nicht möglich (STEFFEK 1999). Eine postinfektionelle Wirkung, wie sie in der vorliegenden Arbeit für Kupferhydroxid nachgewiesen wurde (Abschnitt 9.1.2.1), würde dieses Zeitfenster erheblich vergrößern. Mit Kupferhydroxid konnte noch 16 Stunden nach Abschluss einer Infektionsperiode ein 100%iger Effekt erzielt werden (Abbildung 8-3), was einer Verdreifachung der Infektionsperiode entspricht. Für das oben genannte Beispiel würde das bedeuten, dass dem Anbauer statt 11 Stunden 33 Stunden zur Verfügung stünden. Leider wird eine postinfektionelle Wirkung nur dann erzielt, wenn Spore und Kupferpartikel möglichst lange von einem Wasserfilm bedeckt sind (Abschnitt 9.1.2.3 und Abbildung 8-9). Da die Blätter im Freiland nach einem Regen erfahrungsgemäß sehr schnell abtrocknen, insbesondere, während des Tages, kann eine gezielte Strategie, bei der die Spritzungen noch über den Abschluss der Infektionsperiode hinaus erfolgen, nicht empfohlen werden.

Auch HAMILTON (1931) konnte eine begrenzte postinfektionelle Wirkung der Bordeaux-Brühe nachweisen. Das hängt vermutlich damit zusammen, dass die Versuche unter mehr oder weniger kontrollierten Bedingungen in einer Klimakammer bzw. im Gewächshaus durchgeführt wurden (Abschnitt 3.5.1). Aufgrund der hohen relativen Luftfeuchten in der Klimakammer und im Gewächshaus sowie dem Fehlen von Wind, trockneten die Blätter wahrscheinlich nur sehr langsam ab, was ursächlich für die postinfektionelle Wirkung wäre.

Eine postinfektionelle Wirkung der Bordeaux-Brühe unter Freilandbedingungen wurde in keiner publizierten Studie kritisch untersucht oder beobachtet. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin begründet, dass Schwefelkalk als begrenzt kurativ wirkendes Mittel zur Verfügung stand und in der Folge zahlreiche synthetische Fungizide mit guter Wirksamkeit entwickelt wurden.

## 9.2 Abschnitt B: Wirkungsweise von Calciumhydroxid

Als Suspension zeigte Calciumhydroxid eine deutliche postinfektionelle Wirkung. Bei Behandlungen 16 Stunden nach Abschluss einer Infektionsperiode tötete Calciumhydroxid ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) alle vitalen primären Stromata (Abbildung 8-15). Die Wirkung war allerdings deutlich schlechter, wenn die Behandlung erst 40 Stunden nach Abschluss einer Infektionsperiode erfolgte (Abbildung 8-16). Schwefelkalk (1,5 %), der als Positivkontrolle diente, zeigte auch bei Applikationen 40 Stunden nach Abschluss einer Infektionsperiode eine sehr gute postinfektionelle Wirkung (Abbildung 8-15 und Abbildung 8-16).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Hypothese, dass die Wirkung von Calciumhydroxid auf dem hohen pH-Wert der Suspension beruht (Abbildung 8-15, Abbildung 8-16 und Abbildung 8-17). KOH-Lösungen bis pH 12 und eine Calciumcarbonat-Suspension mit pH 8,3 zeigten keine Wirkung. Ein pH-Wert  $\geq 12,4$  war nötig, um primäre Stromata zu töten bzw. um die Anzahl vitaler primärer Stromata gegenüber den unwirksamen Behandlungen signifikant zu reduzieren (Abbildung 8-15 und Abbildung 8-1). Für die Schwefelkalk-Lösung, deren pH-Wert mit 11,2 ebenfalls sehr hoch war, wird ein Beitrag des pH-Wertes zur Wirkung ausgeschlossen (GOLDSWORTHY 1928).

MENDOCA ET AL. (1994) untersuchten die Wirkungen hoher pH-Werte auf gram-negative Bakterien und zeigten dass die Pathogene durch die alkalischen Bedingungen getötet wurden. Sie vermuteten, dass eine Beschädigung der Cytoplasmamembran ursächlich für den Tod der Pathogene war und formulierten die Hypothese, dass die Beschädigung der Membran ein alles-oder-nichts Ereignis sei. Das heißt, dass die Zellen entweder zerstört oder nicht zerstört werden und mit kleinen oder gar keinen Verletzungen weiterleben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf einen ähnlichen Mechanismus für Konidien von *V. inaequalis* hin. Alkalinität bis zu pH 12 zeigte lediglich einen leichten Effekt auf die Vitalität gekeimter Konidien, die mittels FDA-Färbung bestimmt wurde (Abbildung 8-17). Bei pH 12,4 hingegen fluoreszierten lediglich rund 15 % der Konidien teilweise oder vollständig (Abbildung 8-5 E und Abbildung 8-17). Dieser Prozentsatz lebender Konidien, Keimschläuche und Appressorien korreliert gut mit einem Prozentsatz vitaler primärer Stromata von 20 % 72 Stunden nach Inokulation (Abbildung 8-15 und Abbildung 8-16). Das lässt darauf schließen, dass die fluoreszierenden Teile der gekeimten Konidien immer noch vollständig vital waren und somit den Infektionsprozess fortsetzen konnten. Die Hypothese eines alles-oder-nichts Ereignisses wird zudem durch die Ergebnisse des Experiments unterstützt, bei dem die Inkubationszeit bei pH 12,4 auf bis zu 60 Minuten verlängert wurde. Die Verlängerung der

Inkubationszeit führte zu keinem größeren Effekt, sondern lediglich zu einer Verringerung der Varianz bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten (Abbildung 8-18).

SCHULZE UND SCHÖNHERR (2003) zeigten, dass bei ausreichend hohem pH-Wert eine sehr kurze Inkubationszeit nötig ist, um alle Konidien zu töten. In der vorliegenden Arbeit reichte der Effekt der gesättigten Calciumhydroxid-Lösung nicht aus, um bei einer postinfektionellen Applikation alle primären Stromata abzutöten, obwohl der Ausgangs-pH-Wert bei 12,45 lag (Abbildung 8-17). Die Suspension hingegen reduzierte die Rate vitaler primärer Stromata auf Null. Anscheinend sank der pH-Wert der gesättigten Lösung durch die Reaktion mit dem CO<sub>2</sub> der Luft (Abschnitt 3.5.3.1) so schnell ab, dass einige der primären Stromata überleben konnten. Die Suspension enthält einen Vorrat an ungelösten Calciumhydroxid-Partikeln, der den pH-Wert von 12,45 aufrechterhält, bis sich alle Partikel aufgelöst haben. Für die Bekämpfung des Apfelschorfes mit Calciumhydroxid bedeutet dies, dass Suspensionen, die einen Vorrat an Calciumhydroxid-Partikeln enthalten, verwendet werden müssen und gesättigte Lösungen ungeeignet sind. Die Löslichkeit von Calciumhydroxid wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, liegt aber für gewöhnlich im Bereich von 1,6 g l<sup>-1</sup> (JOHANNSEN UND RADEMACHER 1999). Für eine erfolgreiche Schorfbekämpfung sollten daher mindestens 2 bis 2,5 g l<sup>-1</sup> verwendet werden.

Bei der getesteten Konzentration kann ausgeschlossen werden, dass Ca<sup>2+</sup>-Ionen oder Calciumcarbonat-Partikel zur Wirkung von Calciumhydroxid beitrugen. Bei gleichem Calciumgehalt wie die Calciumhydroxid-Suspension (5 g l<sup>-1</sup>), zeigte Calciumcarbonat (6,75 g l<sup>-1</sup>) keinen Effekt auf die Anzahl vitaler primärer Stromata (Abbildung 8-15 und Abbildung 8-16). Dies bestätigt die Ergebnisse von SCHULZE UND SCHÖNHERR (2003), bei denen ebenfalls keine Wirkung auf die Vitalität gekeimter Konidien nach Applikationen von Calciumchlorid und Calciumcarbonat festgestellt werden konnten.

KOH-Lösungen erwiesen sich als sehr wirksam. Für eine Schorfbekämpfung in der Praxis sind sie aber nicht geeignet, da die erforderlichen Konzentrationen extrem hoch sind was sehr hohe Kosten verursachen und außerdem das Nährstoffgleichgewicht der Bäume zerstören würde. Für Calciumhydroxid wurden bislang keine phytotoxischen Reaktionen beobachtet. Der Grund dafür ist, dass der pH-Wert sehr schnell absinkt und sich Calciumcarbonat und Calciumbicarbonat bilden, die beide nicht phytotoxisch sind.

### 9.2.1 Auswirkungen auf die Schorfkontrolle mit Calciumhydroxid unter Feldbedingungen

Da Calciumhydroxid keine protektive Wirkung hat (Abschnitt 3.5.3.1), muss die Ausbringung gezielt erfolgen. SCHULZE UND SCHÖNHERR (2003) konnten zeigen, dass eine Suspension gekeimte Konidien bei Behandlungen nach Inokulation sehr schnell abtötete. Die Studie von HAMILTON (1931) lieferte Hinweise, dass Calciumhydroxid auch über eine postinfektionelle Wirkung verfügt. In der vorliegenden Arbeit wurde die postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid näher untersucht und ein Zeitfenster für die postinfektionelle Wirkung ermittelt (Abschnitt 9.2). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass bei 20°C Behandlungen mit einer Suspension noch 16 Stunden nach Infektion alle primären Stromata abtöten. Das entspricht einem Zeitfenster der dreifachen Länge der Infektionsperiode. Da sich die Infektionsperioden mit sinkender Temperatur verlängern (Abbildung 3-4), ist insbesondere im Frühjahr, bei niedrigen Temperaturen, ein noch größeres Zeitfenster zu erwarten (MILLS 1944, STENSVAND ET AL. 1997). Die Wirkung von Calciumhydroxid beruht auf dem alkalischen pH-Wert von 12,45. Dieser muss über eine gewisse Zeit aufrechterhalten werden, so dass die Calciumhydroxid-Konzentration bei mindestens 2 bis 2,5 g l<sup>-1</sup> liegen sollte.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden im Versuchsbetrieb der Universität Hannover bereits erfolgreiche Feldversuche zur Bekämpfung des Apfelschorfes mit Calciumhydroxid durchgeführt. Dabei hat sich herausgestellt, dass mit der herkömmlichen Applikationstechnik keine befriedigende Schorfkontrolle mit Calciumhydroxid möglich war. Die schlechte Wirkung bei Applikation mit Sprühgeräten hat verschiedene Gründe. (I) Das Zeitfenster für die gezielten Applikationen kann nicht immer eingehalten werden. Dies kann zum Einen der Fall sein, wenn das Ende des Zeitfensters in die Nacht fällt und zum Anderen, wenn die Anlage bei länger anhaltendem Regen nicht mehr befahrbar ist bzw. wenn ein Befahren eine Zerstörung der Bodenstruktur zur Folge hätte. (II) Beim Sprühen entsteht ein sehr dünner Benetzungsfilm. (III) Beim Sprühen entstehen durch die verwendeten Düsen sehr kleine Tropfen. Im Verhältnis zum Volumen haben diese eine sehr große Oberfläche. Durch die große Kontaktfläche zur Luft und die dadurch geförderte Reaktion mit CO<sub>2</sub>, sinkt der pH-Wert möglicherweise noch vor Erreichen der Blattoberfläche unter den nötigen pH-Wert von 12,45.

Um diese Probleme zu umgehen, wurden die Suspensionen in den Freilandversuchen mit einer Überkronenberegnung ausgebracht. Diese Applikationstechnik bietet verschiedene Vorteile: (I) Die Applikationen können bei Regen und während länger anhaltender Regenperioden durchgeführt werden. (II) Große Flächen können binnen sehr kurzer Zeit

behandelt werden. (III) Die Applikation kann automatisiert werden und dadurch zu einem exakt vorgegebenen Zeitpunkt erfolgen. (IV) Die verwendeten Regner erzeugen ein sehr grobes Tropfenspektrum. (V) Die Applikationen können über einen längeren Zeitraum von 15 Minuten erfolgen, für den die Benetzung und somit die nötige Inkubationszeit für Calciumhydroxid garantiert ist.

In einem Freilandversuch im Jahr 2004 erfolgten Behandlungen mit Calciumhydroxid ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) mittels einer Überkronenberegnung (A) bei 100 % einer Mills'schen Infektionsperiode sowie (B) 6 Stunden nach Applikation von Variante A (GRIMM-WETZEL UND SCHÖNHERR 2005). In der dritten Variante (C) wurde bis zur Mitte des Jahres Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) bei 100 % einer Mills'schen Infektionsperiode ausgebracht und anschließend Calciumhydroxid, 20 Stunden nach Applikation von Variante A (Abschnitt 9.3.4). Die Früchte und Blätter der behandelten Bäume, darunter die sehr schorfanfälligen Sorten ‚Golden Delicious‘, ‚Jonagold‘ und ‚Elstar‘, waren, bei hohem Befall der unbehandelten Kontrollen, zum Ende der Saison praktisch schorffrei. Nur an den Blattunterseiten einiger Sorten fanden sich zum Teil Schorfläsionen, die aber erst zum Ende der Saison auftraten und nicht auf die Früchte übergingen. Ursache für diese Infektionen könnte eine mangelnde Benetzung der Blattunterseiten gewesen sein.

Als problematisch erwiesen sich in diesem sehr konservativ angelegten Versuch, die sehr hohen Mengen an Calciumhydroxid, die über den Versuchszeitraum ausgebracht wurden. Diese sollten sich aber durch verschiedene Maßnahmen in den Bereich des jährlichen Calciumentzuges einer Apfelanlage von 200 bis  $250 \text{ kg ha}^{-1}$  reduzieren lassen (ANONYMUS 2004), was ein wichtiges Ziel weiterer Versuche darstellt. Die Calciummenge ließe sich zum Einen durch eine Verringerung der Calciumhydroxid-Konzentration (z. B. von  $5 \text{ g l}^{-1}$  auf  $2,5 \text{ g l}^{-1}$ ) mindestens halbieren und zum Anderen durch eine Verringerung der Anzahl an Applikationen reduzieren. Die Anzahl an Applikationen kann durch die Anwendung verbesserter Prognosemodelle sowie durch weniger konservativ gewählte Infektionsperioden reduziert werden (Abschnitt 3.3).

Dass bei Calciumhydroxid keine Phytotoxizität beobachtet wurde und auch nicht zu erwarten ist, stellt einen großen Vorteil gegenüber Kupfer- und Schwefelfungiziden dar (Abschnitt 3.5.1 und Abschnitt 3.5.2). Wenn sich die guten Bekämpfungserfolge in den kommenden Versuchsjahren bestätigen, könnte dies ein wichtiger Aspekt sein, der Calciumhydroxid die Chance gibt, sich zu einer alternativen Bekämpfungsstrategie zu entwickeln.

### **9.3 Abschnitt C: Wirkungsweise von Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP**

#### **9.3.1 Kaliumcarbonat**

Bei Behandlungen mit Kaliumcarbonat konnten erst dann ähnlich gute Effekte wie mit Calciumhydroxid bzw. einem pH-Wert  $\geq 12,45$  erzielt werden, wenn entweder eine sehr hohe Konzentration, eine sehr lange Inkubationszeit oder ein sehr früher Behandlungszeitpunkt gewählt wurden. Dies galt sowohl für die Wirkung auf die Vitalität der Konidien als auch für die Wirkung auf die Anzahl vitaler primärer Stromata (Abschnitt 8.2.1 und Abschnitt 8.2.2). Eine effektive postinfektionelle Wirkung war bei Kaliumcarbonat erst bei einer Konzentration von  $35 \text{ g l}^{-1}$  zu beobachten (Abbildung 8-28). Noch 16 Stunden nach Infektion konnten alle vitalen primären Stromata abgetötet werden. Für die Schorfkontrolle in der Praxis ist diese Konzentration allerdings zu hoch, da sie den Kaliumhaushalt der Pflanze stören würde. In der niedrigsten getesteten Konzentration von  $5 \text{ g l}^{-1}$  konnte der Prozentsatz vitaler primärer Stromata bei einer Behandlung 6 Stunden nach Inokulation zwar um über 60 % gegenüber der 48 h-Kontrolle gesenkt werden (Abbildung 8-29), dieser Behandlungszeitpunkt liegt aber noch vor Abschluss der Infektionsperiode. Das heißt, dass zu diesem Zeitpunkt noch keine Infektionen erfolgt waren und es sich somit nicht um einen postinfektionellen sondern um eine protektive Wirkung handelte.

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass der Effekt von Kaliumcarbonat konzentrations- und nicht pH-Wert-abhängig ist (Abschnitt 3.5.3.2). In einem Konzentrationsbereich von  $4,4 \text{ g l}^{-1}$  bis  $70 \text{ g l}^{-1}$  wurde für Kaliumcarbonat-Lösungen ein pH-Wert von 11,4 gemessen (SCHULZE UND SCHÖNHERR 2003). Dieser liegt unter der in dieser Arbeit ermittelten Wirkungsgrenze von pH 12,45 (Abschnitt 9.2). Die Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung, die sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Studie von SCHULZE UND SCHÖNHERR (2003) beobachtet wurde, ist vermutlich auf einen osmotischen Effekt zurückzuführen. Von einer guten postinfektionellen Wirkung und einem guten Effekt auf die Vitalität gekeimter Konidien kann dabei erst ab einer Konzentration von  $35 \text{ g l}^{-1}$  ausgegangen werden (Abbildung 8-21 und Abbildung 8-28) (SCHULZE UND SCHÖNHERR 2003).

#### **9.3.2 Glucopon 215 CSUP**

Mit GP wurden insgesamt schlechte Wirkungen erzielt. Erst bei einer Konzentration von  $5 \text{ g l}^{-1}$  und einer Inkubationszeit von 120 Minuten wurden nahezu alle gekeimten Konidien getötet und fluoreszieren nicht mehr (Abbildung 8-24). Eine gute postinfektionelle Wirkung

konnte in derselben Konzentration bei Behandlungen 4 bzw. 16 Stunden nach Abschluss einer Infektionsperiode bei Inkubationszeiten von 30 bzw. 15 Minuten erzielt werden (Abbildung 8-30 und Abbildung 8-31). Die Anzahl vitaler primärer Stromata konnte dabei aber nicht auf Null reduziert werden.

Dass sich die Appressorien als besonders widerstandsfähig gegenüber den GP-Behandlungen erwiesen war eine interessante Beobachtung (Abbildung 8-7 F). Bei Behandlungen mit einer Konzentration von  $5 \text{ g l}^{-1}$  und einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden 91,4 % (Stabw.  $\pm 6,7 \%$ ) aller gekeimten Konidien abgetötet (Abbildung 8-24). Bei gleicher Behandlung hatten 48 Stunden nach Inokulation 10,4 % (Stabw.  $\pm 8,0 \%$ ) der gekeimten Konidien vitale primäre Stromata ausgebildet (Abbildung 8-30). Dass heißt, dass vermutlich alle nicht abgetöteten Appressorien den Infektionsverlauf fortsetzen konnten.

Eine mögliche Erklärung für die Widerstandsfähigkeit der Appressorien könnte die sie umgebende Schleimhülle sein (YEPES UND ALDWINCKLE 1993, SMEREKA ET AL. 1997). In der frühen Literatur wurden die Appressorien mit dem deutschen Begriff „Haftorgan“ oder der englischen Entsprechung „hold fasts“ bezeichnet (ADERHOLD 1899, KEITT UND JONES 1926). Für eben dieses Anhaften auf der Wirtsoberfläche bzw. der Wachsschicht der Kutikula ist eine Schleimhülle verantwortlich. Der Schleim, der aus Polysacchariden besteht, akkumuliert und ersetzt dabei die sich zerstörenden äußeren Zellwände des Appressoriums (SMEREKA ET AL. 1997). MÜLLER ET AL. (1999) machen eine Schädigung der Zellmembran für die toxische Wirkung von Tensiden verantwortlich. Die Polysaccharidschicht schützt vermutlich das Appressorium vor der Zerstörung der inneren Zellwand und der Cytoplasmamembran durch die Polyglycoside des Tensids und erklärt somit die beobachtete Widerstandsfähigkeit der Appressorien.

### 9.3.3 Kaliumcarbonat + Glucopon 215 CSUP

In Kombination zeigten Kaliumcarbonat und GP sowohl auf die Vitalität gekeimter Konidien als auch auf den Prozentsatz vitaler primärer Stromata wesentlich bessere Wirkungen als beide Substanzen alleine (Abschnitt 8.3.2.3). Dabei wurde die Mischung in Konzentrationen getestet, die für eine Schorfbekämpfung in der Praxis sowohl unter phytotoxischen als auch unter ökonomischen Gesichtspunkten vertretbar wären. Bei Behandlungen 16 Stunden nach Abschluss einer Infektionsperiode, die 15 Minuten nach Applikation gespült wurden, war immerhin eine 50 %ige Reduzierung vitaler primärer Stromata gegenüber der 48 h-Kontrolle möglich (Abbildung 8-32). Trockneten die Lösungen nach der Applikation an, so konnte der Prozentsatz vitaler primärer Stromata bei Behandlungen 16 bzw. 40 Stunden nach Infektion



sogar auf Null bzw. um 90 % gegenüber der 48 h-Kontrolle reduziert werden (Abbildung 8-33). Bei einem Antrocknen der Lösungen beruht ein Teil des Effektes auf der Trockenheit bzw. dem Fehlen von tropfbarem Wasser, das die Sporen benötigen, um sich weiter entwickeln zu können.

#### **9.3.4 Zusammenfassende Diskussion von Abschnitt C: Auswirkungen auf die Schorffkontrolle mit Kaliumcarbonat und Glucopon 215 CSUP unter Feldbedingungen**

Aufgrund der im Vergleich zu Calciumhydroxid geringeren Effektivität sowie möglichen Problemen mit der Phytotoxizität, ist der Einsatz von Kaliumcarbonat und GP, auch in der Kombination  $5 \text{ g Kaliumcarbonat l}^{-1} + 0,5 \text{ g GP l}^{-1}$ , bei der Schorfbekämpfung in der Praxis kritisch zu betrachten. Dennoch wurde die Wirkung von Kaliumcarbonat ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) in dem bereits beschriebenen Freilandversuch getestet (Abschnitt 9.2.1, GRIMM-WETZEL UND SCHÖNHERR 2005). Die Applikation wurde allerdings zur Mitte des Versuchszeitraumes abgebrochen, da es aufgrund des sehr harten Wassers, das zur Ausbringung verwendet werden musste, zu Ausfällungen kam, die wiederholt die Düsen verstopften. Trotzdem konnten die gezielten Behandlungen mit Kaliumcarbonat in diesem Zeitraum Primärinfektionen erfolgreich verhindern.

## 10 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen verschiedener Kupferverbindungen sowie von Calciumhydroxid, Kaliumcarbonat und dem Alkylpolyglycosid Glucopon 215 CSUP auf Konidien und frühe Entwicklungsstadien des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis* untersucht. Mit Hilfe eines *in vitro* Testsystems auf der Basis isolierter Kutikularmembranen (CM), Vitalfarbstoffen sowie begleitenden Untersuchungen, konnten wichtige Erkenntnisse über die Wirkungsmechanismen sowie die postinfektionellen Wirkungseigenschaften der Substanzen gewonnen werden. Diese Erkenntnisse ermöglichen die Entwicklung und Verbesserung von Bekämpfungsstrategien im ökologischen Obstbau.

Mit Hilfe eines Tetrazoliumsalzes wurde festgestellt, dass die Atmungskette der Mitochondrien durch Kupferverbindungen zum Erliegen kommt. Unterschiede konnten in der Wirkung leichtlöslicher sowie schwer- und unlöslicher Kupferverbindungen festgestellt werden. Die Wirkung leichtlöslicher Kupferverbindungen (Kupfersulfat) beruht demnach auf der Konzentration der gelösten  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen, die besonders toxisch auf Esterasen und die Membranintegrität wirken. Für die Wirksamkeit schwer- und unlöslicher Kupferverbindungen (Kupferhydroxid und Kupferoxid) ist der Kontakt zwischen Spore und ungelösten Kupferrückständen essentiell. Aufgrund des Kontaktes werden vermutlich toxisch wirkende Kupferkomplexe durch Sporenexsudate verfügbar gemacht.

Kupferhydroxid zeigte ab einer Konzentration von  $116 \text{ mg l}^{-1}$  eine postinfektionelle Wirkung und konnte noch bei Behandlungen 16 Stunden nach Infektion (bei  $20^\circ\text{C}$ ) alle primären Stromata abtöten. Eine postinfektionelle Wirkung konnte aber nur dann erzielt werden, wenn Inokulum und Behandlungsrückstände möglichst lange mit einem Wasserfilm bedeckt waren. Da primäre Stromata, die nicht in direktem Kontakt zu den Kupferpartikeln stehen, getötet wurden, ist vermutlich auf die hohe Mobilität der Kupferkomplexe innerhalb der pilzlichen Strukturen zurückzuführen. Wasser muss vorhanden sein, damit die Spore keimen und somit die zur Bildung der Kupferkomplexe nötigen Exsudate ausscheiden kann.

Calciumhydroxid zeigte als Suspension ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ) eine postinfektionelle Wirkung und konnte noch bei Behandlungen 16 Stunden nach Infektion (bei  $20^\circ\text{C}$ ) alle primären Stromata abtöten. Als Wirkungsmechanismus wurde der hohe pH Wert von 12,45 ermittelt. Da dieser für kurze Zeit aufrechterhalten werden muss, ist eine gesättigte Lösung ungeeignet und es sollte eine Suspension mit einer Konzentration von 2 bis  $2,5 \text{ g l}^{-1}$  verwendet werden.

Mit Kaliumcarbonat und GP konnten nur bei sehr hohen Konzentrationen bzw. langen Inkubationszeiten ausreichende postinfektionelle Wirkungen erzielt werden. Die Wirkung von

Kaliumcarbonat ist konzentrationsabhängig und beruht vermutlich auf einem osmotischen Effekt. Gegen GP zeigten sich besonders Appressorien sehr widerstandsfähig. Die Wirkung von GP beruht vermutlich auf der Zerstörung der Cytoplasmamembran, wobei die Appressorien durch ihre polysaccharidische Schleimhülle geschützt werden. Durch Mischen von Kaliumcarbonat und GP wurde die Wirkung der beiden Substanzen verbessert.

## 11 Literatur

- ADERHOLD, R. (1899):** Über die Wirkungsweise der sogenannten Bordeaux-Brühe (Kupferkalkbrühe). *Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde* **2**, 217-220 und 254-271.
- AEBI, H. E.:** *Catalase*. Seiten 237-286 in: Bergmeyer, H. U.; Bergmeyer, J. und Grassl, M.: *Methods of enzymatic analysis*. VHC Verlag, Weinheim, **1987**.
- AINSWORTH, G. C.:** *Dictionary of the fungi*. Common. Mycol. Inst., Kew, **1997**.
- AN, Z. Q. UND HENDRIX, J. W. (1988):** Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* **80**, 259-261.
- ANONYMUS:** *Boden und Pflanzenernährung im Obstbau, Weinbau und Bioanbau*. Beratungsring Laimburg, Südtirol, **2004**.
- AYLOR, D. E. (1998):** The aerobiology of apple scab. *Plant Disease* **82**, 838-849.
- AYLOR, D. E. UND ANAGNOSTAKIS, S. L. (1991):** Active discharge distance of ascospores of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **81**, 548-551.
- BARKER, B. T. P. UND GIMINGHAM, C. T. (1911):** The fungicidal action of Bordeaux mixtures. *Journal of Agricultural Science* **4**, 76-94.
- BATZER, U.; BERLING, R. UND HELM, H.-U. (2000):** Experiences with the scab simulation programme SCHORFEXPERT. *Erwerbs-Obstbau* **42**, 1-7.
- BECKER, C. M. UND BURR, T. J. (1987):** The use of fluorescein diacetate and calcofluor for determining the viability of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **77**, 1746-1746.
- BECKER, C. M. UND BURR, T. J. (1994):** Discontinuous wetting and survival of conidia of *Venturia inaequalis* on apple leaves. *Phytopathology* **84**, 372-378.
- BELZ, J. UND RUESS, F. (2001):** Effects of different plant protection strategies on yield, quality and costs of scab resistant apple varieties. *Erwerbs-Obstbau* **43**, 33-38.

- BOLAR, J. P.; NORELLI, J. L.; WONG, K. W.; HAYES, C. K.; HARMAN, G. E. UND ALDWINCKLE, H. S. (2000):** Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* **90**, 72-77.
- BÖRNER, H. (1997):** *Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 7. neubearbeitete Auflage, Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- BREEUWER, P.; DROCOURT, J. L.; BUNSCHOTEN, N.; ZWIETERING, M. H.; ROMBOUTS, F. M. UND ABEE, T. (1995):** Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1614-1619.
- BROOK, P. J. (1969):** Stimulation of ascospore release in *Venturia inaequalis* by far red light. *Nature* **222**, 390-392.
- BURCHILL, R. T. (1968):** Field and laboratory studies of effect of urea on ascospore production of *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. *Annals of Applied Biology* **62**, 297-307.
- CARISSE, O. UND DEWDNEY, M. (2002):** A review of non-fungicidal approaches for the control of apple scab. *Phytoprotection* **83**, 1-29.
- CARISSE, O.; PHILION, V.; ROLLAND, D. UND BERNIER, J. (2000):** Effect of fall application of fungal antagonists on spring ascospore production of the apple scab pathogen, *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **90**, 31-37.
- COOLEY, D. R.; GAMBLE, J. W. UND MAZOLLA, M. (1991):** Effects of sulphur and copper fungicides on fruit finish, scab, and soil acidity. *Fruit Notes* **56**, 22-23.
- CURRY, E.; JU, Z. UND DUAN, Y. (2005):** Apple scab management assisted by postharvest tree defoliation with vegetable oil emulsion. *HortTechnology* **15**, 854-858.
- DELONG, D. M.; REID, W. J. UND DARLEY, M. M. (1930):** The plant as a factor in the action of Bordeaux mixture as an insecticide. *Journal of Economic Entomology* **23**, 383-390.
- DIEREND, W. UND TENHUMBERG, L. (2000):** Organic fruit growing farms in Lower Saxony and Northrhine-Westphalia. *Erwerbs-Obstbau* **42**, 157-165.

- ELLIS, M. A.; FERREE, D. C.; FUNT, R. C. UND MADDEN, L. V. (1998):** Effects of an apple scab-resistant cultivar on use patterns of inorganic and organic fungicides and economics of disease control. *Plant Disease* **82**, 428-433.
- FALK, S. P.; GADOURY, D. M. UND SEEM, R. C. (1995):** Analysis of risk of primary apple scab infection. *Phytopathology* **85**, 1556.
- FISCHER, C. (1996):** Schorffresistenzzüchtung beim Apfel - Ergebnisse und Strategien der Resistenz. *Erwerbs-Obstbau* **38**, 71-76.
- FISCHER, C.; DIEREND, W.; FISCHER, M. UND BIER-KAMOTZKE, A. (2000):** Stability of scab resistance in apple - New results, problems and chances of its durability. *Erwerbs-Obstbau* **42**, 73-82.
- FRIIS, K.; DAMGAARD, C. UND HOLMSTRUP, M. (2004):** Sublethal soil copper concentrations increase mortality in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* during drought. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**, 65-73.
- FUJS, S.; GAZDAG, Z.; POLJSAK, B.; STIBILJ, V.; MILACIC, R.; PESTI, M. UND BATIĆ, M. (2005):** The oxidative stress response of the yeast *Candida intermedia* to copper, zinc, and selenium exposure. *Journal of Basic Microbiology* **2**, 125-135.
- GADOURY, D. M. UND MACHARDY, W. E. (1985):** Negative geotropism in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **75**, 856-859.
- GADOURY, D. M.; SEEM, R. C. UND STENSVAND, A. (1994):** Ascospore discharge in *Venturia inaequalis*. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences* **17**, 205-219.
- GADOURY, D. M.; STENSVAND, A. UND SEEM, R. C. (1998):** Influence of light, relative humidity, and maturity of populations on discharge of ascospores of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **88**, 902-909.
- GARST, R.: Alkyl polyglycosides - new solutions for agricultural applications.** Seiten 131-137 in: Hill, K. W.; von Rybinski, W. und Stoll, G.: Alkyl polyglycosides. Technology properties and applications. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, **1996**.

- GESSLER, C. UND STUMM, D. (1984):** Infection and stroma formation by *Venturia inaequalis* on apple leaves with different degrees of susceptibility to scab. *Journal of Phytopathology* **110**, 119-126.
- GIMINGHAM, C. T. (1911):** The action of carbon dioxide on Bordeaux mixture. *Journal of Agricultural Science* **4**, 69-75.
- GOLBA, B. (2002):** Alternativen zum Einsatz kupferhaltiger Präparate im Apfelanbau - Ergebnisse einer Literaturrecherche. *Berichte der BBA* **109**, 67pp.
- GOLDSWORTHY, M. C. (1928):** The fungicidal action of liquid lime sulphur. *Phytopathology* **18**, 355-360.
- GRIMM-WETZEL, P. UND SCHÖNHERR, J. (2005):** Erfolgreiche Bekämpfung des Apfelschorfes mit Kalziumhydroxid. *Erwerbs-Obstbau*, online publiziert am 18. November 2005.
- HALLIWELL, B. UND GUTTERIDGE, J. M. C.: Free radicals in biology and medicine.** 3<sup>rd</sup> edition, University Press, Oxford, **2000**.
- HAMEL, C.; FYLES, H. UND SMITH, D. L. (1990):** Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using 3 different vital stains. *New Phytologist* **115**, 297-302.
- HAMILTON, J. M. (1931):** Studies of the fungicidal action of certain dusts and sprays in the control of apple scab. *Phytopathology* **21**, 445-523.
- HAMILTON, J. M. UND KEITT, G. W. (1928):** Certain sulphur fungicides in the control of apple scab. *Phytopathology* **18**, 146-147.
- HARZER, U. UND ORTH, A. (1997):** Apfelschorfbekämpfung - Erfahrungen mit dem Schorfsimulationsprogramm RIMpro. *Obstbau* **22**, 226-235.
- HEITEFUSS, R.: Pflanzenschutz: Grundlagen der praktischen Phytomedizin.** 3. neubearbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **2000**.
- HELLMANN, M. UND STÖSSER, R. (1992):** Development of cuticle thickness and epidermal-cells of apple leaves. *Gartenbauwissenschaft* **57**, 223-227.

- HILL, K. UND ROHDE, O. (1999):** Sugar based surfactants for consumer products and technical applications. *Lipid* 1, 25-33.
- HOCHBERG, Y. (1988):** A sharper Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 75, 800-802.
- HOCK, B. UND ELSTNER, E. F.:** *Schadwirkungen auf Pflanzen*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1995.
- HOFFMANN, G. M.; NIENHAUS, F.; POEHLING, H.-M.; SCHÖNBECK, F.; WELTZIEN, H. UND WILBERT, H.:** *Lehrbuch der Phytomedizin*. 3. neubearbeitete Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, 1994.
- HOLB, I. J. UND HEIJNE, B. (2001):** Evaluating primary scab control in organic apple production. *Gartenbauwissenschaft* 66, 254-261.
- HOLB, I. J.; DE JONG, P. F. UND HEIJNE, B. (2003):** Efficacy and phytotoxicity of lime sulphur in organic apple production. *Annals of Applied Biology* 142, 225-233.
- HOLMSTRUP, M.; PETERSEN, B. F. UND LARSEN, M. M. (1998):** Combined effects of copper, desiccation, and frost on the viability of earthworm cocoons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 897-901.
- HOOD, M. E. UND SHEW, H. D. (1996):** Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. *Phytopathology* 86, 704-708.
- JIANG, J. UND ERWIN, D. C. (1990):** Morphology, plasmolysis, and tetrazolium bromide stain as criteria for determining viability of *Phytophthora* oospores. *Mycologia* 82, 107-113.
- JOHANNSEN, K. UND RADEMACHER, S. (1999):** Modelling the kinetics of calcium hydroxide dissolution in water. *Acta Hydrochem. Hydrobiol.* 27, 72-78.
- KEITT, G. W. UND JONES, L. K. (1926):** Studies of the epidemiology and control of apple scab. *Wis. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 73, 104 Seiten.
- KELDERER, M.; CESARA, C. UND LARDSCHNEIDER, E. (1997):** *Schorfregulierung: Verschiedene Kupferformulierungen - Alternativen zum Kupfer - Gezielte Behandlungen*. 8. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, 8, 9-14.



- KELDERER, M.; CESARA, C. UND LARDSCHNEIDER, E. (2000):** *Zwei Jahre Erfahrungen mit der gezielten Schorfbekämpfung durch die Oberkronenberegnung.* 9. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, **9**, 5-11.
- KELDERER, M.; LARDSCHNEIDER, E. UND MARSCHALL, K. (2004):** *Results from two years of sanitation measures to reduce apple scab in organic orchards.* 11. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, **11**, 91-95.
- KELLERHALS, M.; FOUILLET, A. UND LESPINASSE, Y. (1993):** Effect of the scab inoculum and the susceptible parent on resistance to apple scab (*Venturia inaequalis*) in the progenies of crosses to the scab resistant cv Florina. *Agronomie* **13**, 631-636.
- KIENZLE, J.; ZEYER, A. UND SCHMIDT, K. (1995):** *Field trials for the reduction of the copper concentration in organic fruit growing.* 7. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, **7**, 53-57.
- KOLLAR, A. (1998):** A simple method to forecast the ascospore discharge of *Venturia inaequalis*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **105**, 489-495.
- KRISTEN, U.; HOPPE, U. UND PAPE, W. (1993):** The pollen-tube growth test - A new alternative to the draize eye irritation assay. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* **44**, 153-162.
- KRÜGER, E.; RASIM, S.; REHMET, T. UND ZWERMANN, P. (2000):** *Reduzierung des Ascosporenpotentials von Venturia inaequalis durch Förderung der Fallaub-Zersetzung.* 9. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, **9**, 12-17.
- KUMAR, K. UND SHARMA, S. D. (1999):** Breeding scab resistant apples: New directions. *J. Genet. Breed.* **53**, 155-164.
- LEWIS, F. H. UND HICKEY, K. D. (1972):** Fungicide usage on deciduous fruit trees. *Annual Review of Phytopathology* **10**, 399-428.
- LI, B. UND XU, X. (2002):** Infection and development of apple scab (*Venturia inaequalis*) on old leaves. *Journal of Phytopathology* **150**, 687-691.

- MACHARDY, W. E. UND GADOURY, D. M. (1989):** A revision of Mills criteria for predicting apple scab infection periods. *Phytopathology* **79**, 304-310.
- MACHARDY, W. E.:** *Apple scab: Biology, Epidemiology and Management*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, **1996**.
- MACHARDY, W. E.; GADOURY, D. M. UND GESSLER, C. (2001):** Parasitic and biological fitness of *Venturia inaequalis*: Relationship to disease management strategies. *Plant Disease* **85**, 1036-1051.
- MARTIN, H.; WAIN, R. L. UND WILKINSON, E. H. (1942):** Studies upon the copper fungicides. V. A critical examination of the fungicidal value of copper compounds. *Annals of Applied Biology* **29**, 412-438.
- MCCALLAN, S. E. A. (1949):** The nature of the fungicidal action of copper and sulfur. *Botanical Review* **15**, 629-643.
- MCCALLAN, S. E. A. UND WILCOXON, F. (1936):** The action of fungous spores on bordeaux mixture. *Contributions from Boyce Thompson Institute* **8**, 151-165.
- MENDOCA, A. F.; AMOROSO, T. L. UND KNABEL, S. J. (1994):** Destruction of gram-negative food-borne pathogens by high pH involves disruption of the cytoplasmic membrane. *Applied Environmental Microbiology* **60**, 4009-4014.
- MILLER, S. L.; TORRES, P. UND MCCLEAN, T. M. (1993):** Basidiospore viability and germination in ectomycorrhizal and saprotrophic *Basidiomycetes*. *Mycological Research* **97**, 141-149.
- MILLS, W. D. (1944):** Efficient use of sulfur dusts and sprays during rain to control apple scab. *Cornell Extension Bulletin* **630**, 1-4.
- MILLS, W. D. UND LAPLANTE, A. A. (1951):** Diseases and insects in the orchard. *Cornell Extension Bulletin* **711**, 21-27.
- MONDAL, S. N. UND TIMMER, L. W. (2003):** Effect of urea, CaCO<sub>3</sub>, and dolomite on pseudothecial development and ascospore production of *Mycosphaerella citri*. *Plant Disease* **87**, 478-483.

- MORADAS-FERREIRA, P.; COSTA, V.; PIPER, P. UND MAGER, W. (1996):** The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology* **19**, 651-658.
- MÜLLER, M. T.; ZEHNDER, A. J. B. UND ESCHER, B. I. (1999):** Membrane toxicity of linear alcohol ethoxylates. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 2767-2774.
- NELSON, R. R.:** *The evolution of parasitic fitness*. Seiten 23-46 in: Horsfall, J. G. und Cowling, E. B.: *Plant Disease - An Advanced Treatise*. Vol. IV, Academic Press, New York, **1979**.
- NOBEL, P. S. N.:** *Biophysical Plant Physiology and Ecology*. Freeman & Company, San Francisco, **1983**.
- ORTEGA, F.; STEINER, U. UND DEHNE, H. W. (1998):** Induced resistance to apple scab: Microscopic studies on the infection cycle of *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Journal of Phytopathology* **146**, 399-405.
- PALM, G. (1995):** Versuche zur Bekämpfung des Schorfpilzes mit Kupferpräparaten. *Mitteilungen des OVR* **50**, 51-60.
- PALM, G. (Landwirtschaftskammer Hannover, Jork.):** Persönliche Mitteilung vom 11. Juli **2005**.
- PALM, G.; KLOPP, K. UND KRUSE, P. (2002):** *Control of Venturia inaequalis: substitutes for and reduced use of copper*. 10. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, **10**, 75-80.
- PAOLETTI, M. G.; SOMMAGGIO, D.; FAVRETTO, M. R.; PETRUZZELLI, G.; PEZZAROSSA, B. UND BARBAFIERI, M. (1998):** Earthworms as useful bioindicators of agroecosystem sustainability in orchards and vineyards with different inputs. *Applied Soil Ecology* **10**, 137-150.
- PARKER, D. M.; HILBER, U. W.; BODMER, M.; SMITH, F. D.; YAO, C. UND KOLLER, W. (1995):** Production and transformation of conidia of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **85**, 87-91.
- PICKERING, S. U. (1912):** Copper fungicides. *Journal of Agricultural Science* **4**, 273-281.

- RAW, F. (1962):** Studies of earthworm populations in orchards. 1. Leaf burial in apple orchards. *Annals of Applied Biology* **50**, 389-404.
- RECKENDORFER, P. (1936):** Über den Zerfall des Kupferkalkbrühe-Komplexes. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **46**, 418-438.
- RODRIGUEZ, G. G.; PHIPPS, D.; ISHIGURO, K. UND RIDGWAY, H. F. (1992):** Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 1801-1808.
- RÖMPP, H.:** *Römpp Chemie Lexikon*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.
- SAWAI, J. (2003):** Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal of Microbiological Methods* **54**, 177-182.
- SAWAI, J. UND YOSHIKAWA, T. (2004):** Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *Journal of Applied Microbiology* **96**, 803-809.
- SAWAI, J.; SHOJI, S.; IGARASHI, H.; HASHIMOTO, A.; KOKUGAN, T.; SHIMIZU, M. UND KOJIMA, H. (1998):** Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **86**, 521-522.
- SCHAULE, G.; FLEMMING, H. C. UND RIDGWAY, H. F. (1993):** Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile respiring bacteria in drinking-water. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 3850-3857.
- SCHELL, E. (1999):** Schorfprognoseprogramm RIMpro - dreijährige Versuchserfahrungen. *Obstbau* **24**, 157-160.
- SCHÖNHERR, J. UND RIEDERER, M. (1986):** Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. *Plant Cell Environment* **9**, 459-466.
- SCHULZE, K. UND SCHÖNHERR, J. (2003):** Calcium hydroxide, potassium carbonate and alkyl polyglycosides prevent spore germination and kill germ tubes of apple scab (*Venturia inaequalis*). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **110**, 36-45.

- SCHULZE, K.: *Entwicklung eines neuartigen in vitro Testsystems zur Überprüfung der Wirkungen von Fungiziden auf Konidienkeimung sowie Bildung von Appressorien und Penetrationshyphen bei Venturia inaequalis*. Dissertation, Universität Bonn, **2005**.
- SIEROTZKI, H.; EGGENSCHWILER, M.; BOILLAT, O.; MCDERMOTT, J. M. UND GESSLER, C. (1994): Detection of variation in virulence toward susceptible apple cultivars in natural-populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **84**, 1005-1009.
- SMEREKA, K. J.; MACHARDY, W. E. UND KAUSCH, A. P. (1987): Cellular-differentiation in *Venturia inaequalis* ascospores during germination and penetration of apple leaves. *Canadian Journal of Botany* **65**, 2549-2561.
- STEBER, J. GUHL, W.; STELTER, R. UND SCHRÖDER, R.: *Ecotoxicological evaluation of alkyl polyglycosides*. In: Hill, K. W.; von Rybinski, W. und Stoll, G.: *Alkyl polyglycosides. Technology properties and applications*. VCH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, **1996**.
- STEFFEK, R. (1999): Managing apple scab (*Venturia inaequalis*) in organic fruit growing - influence of the reduction of practical copper- and lime-sulphur dose rates. *Pflanzenschutzberichte* **58**, 7-12.
- STEINFELD, U.; SIEROTZKI, H.; PARISI, S.; POIREY, S. UND GISI, U. (2001): Sensitivity of mitochondrial respiration to different inhibitors in *Venturia inaequalis*. *Pest Management Science* **57**, 787-796.
- STENSVAND, A. UND AMUNDSEN, T. (2000): Evaluation of three copper fungicides against apple scab. *Test of Agrochemicals and Cultivars* **21**, 3-4.
- STENSVAND, A.; GADOURY, D. M.; AMUNDSEN, T.; SEMB, L. UND SEEM, R. C. (1997): Ascospore release and infection of apple leaves by conidia and ascospores of *Venturia inaequalis* at low temperatures. *Phytopathology* **87**, 1046-1053.
- SUTTON, D. K.; MACHARDY, W. E. UND LORD, W. G. (2000): Effects of shredding or treating apple leaf litter with urea on ascospore dose of *Venturia inaequalis* and disease buildup. *Plant Disease* **84**, 1319-1326.

- SZANKOWSKI, I; BRIVIBA, K.; FLESCHHUT, J.; SCHÖNHERR, J.; JACOBSEN, H.-J. UND KIESECKER, H. (2003):** Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP-gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*). *Plant Cell Reports* **22**, 141-149.
- SZKOLNIK, M. (1981):** Physical-modes of action of sterol-inhibiting fungicides against apple diseases. *Plant Disease* **65**, 981-985.
- TATE, K. G.; MANKTELOW, D. W.; WALKER, J. T. UND STIEFEL, H. (2000):** Disease management in Hawke's Bay apple orchards converting to organic production. *New Zealand Plant Protection* **53**, 1-6.
- TOMLIN, C. D. S. ED.: The Pesticide Manual.** 11<sup>th</sup> edition, British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, **1997**.
- TRAPMAN, M. (1995):** Integrierte Schorfbekämpfung - das Schorfsimulationsprogramm RIMpro. *Obstbau* **20**, 63-66.
- TRAPMAN, M. (2002):** *The post infection use of lime sulphur to control apple scab. Experiences in the Netherlands 1999-2002.* 10. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, **10**, 63-74.
- TURNER, M. L.; MACHARDY, W. E. UND GADOURY, D. M. (1986):** Germination and appressorium formation by *Venturia inaequalis* during infection of apple seedling leaves. *Plant Disease* **70**, 658-661.
- VALSANGIACOMO, C. UND GESSLER, C. (1988):** Role of the cuticular membrane in ontogenic and Vf-resistance of apple leaves against *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **78**, 1066-1068.
- VAN RHEE (1977):** Effects of soil pollution on earthworms. *Pedobiologia* **17**, 201-208.
- WAIN, R. L. UND WILKINSON, E. H. (1943):** Studies upon the copper fungicides. *Annals of Applied Biology* **30**, 379-391.
- WALLEY, F. L. UND GERMIDA, J. J. (1995):** Estimating the viability of vesicular-arbuscular mycorrhizae fungal spores using tetrazolium salts as vital stains. *Mycologia* **87**, 273-279.

- WASHINGTON, W. S.; VILLALTA, O. UND APPLEBY, M. (1998):** Control of pear scab with hydrated lime alone or in schedules with other fungicide sprays. *Crop Protection* **17**, 569-580.
- WILLIAMS, E. B. UND KUC, J. (1969):** Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Annual Review of Phytopathology* **7**, 223-&.
- YEPES, L. M. UND ALDWINCKLE, H. S. (1993):** Pathogenesis of *Venturia inaequalis* on shoot-tip cultures and on greenhouse-grown apple cultivars. *Phytopathology* **83**, 1155-1162.
- ZIMMER, J. (2002):** *Apfelschorfbekämpfung 2001 unter besonderer Berücksichtigung der Berostung*. 10. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, **10**, 86-93.

## **Eidesstattliche Erklärung**

An Eides statt versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe und dass diese oder eine ähnliche Arbeit noch an keiner anderen Stelle als Dissertation eingereicht worden ist.

Hannover, den



## Danksagung

Auf dieser Seite möchte ich allen danken, die direkt oder indirekt das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Lukas Schreiber und Herrn Prof. Dr. Jörg Schönherr für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung sowie die stete Diskussionsbereitschaft danken. Durch das mir entgegengebrachte Vertrauen und ihre Anregungen war es mir möglich, meine Promotion mit viel Freiraum und Freude zu verwirklichen.

Mein besonderer Dank gilt Katja Schulze. Ohne das von ihr entwickelte *in vitro* Testsystem und ihre Hilfe bei der Einarbeitung wäre die Umsetzung der Promotion in der Kürze der Zeit nicht möglich gewesen.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Obstbau möchte ich herzlich für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die in allen Belangen große Hilfsbereitschaft danken.

All meinen Freunden und Kommilitonen danke ich dafür, dass ich mich während meiner Studien- und Promotionszeit in Hannover so außerordentlich wohl gefühlt habe. „High the cups!“

Kristina danke ich dafür, dass es ihr stets gelang, mich zu motivieren und aufzuheitern sowie für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Nicht zuletzt gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, die die Ausbildung ihrer Söhne zum Wichtigsten in ihrem Leben gemacht haben.

Vielen Dank auch an alle, die ich hier nicht namentlich erwähnen konnte, damit die Danksagung nicht länger als die gesamte Arbeit wird.



## Veröffentlichungen

### Wissenschaftliche Zeitschriften:

**Montag, J.; Schreiber, L. und Schönherr, J. (2005):** An *in vitro* study on the post-infection activities of hydrated lime and lime sulphur against apple scab (*Venturia inaequalis*). *Journal of Phytopathology* **153**, 485-491.

**MONTAG, J.; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J. (2006):** An *in vitro* study on the post-infection activities of copper sulfate and copper hydroxide against conidia of *Venturia inaequalis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, im Druck.

**MONTAG, J.; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J. (2006):** An *in vitro* study of the nature of protective activities of copper sulphate, copper hydroxide and copper oxide against conidia of *Venturia inaequalis*. *Journal of Phytopathology*, im Druck.

### Vorträge auf Tagungen:

**MONTAG, J.; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J.: Die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Vitalitätsbestimmung von Konidien von *Venturia inaequalis*.** 42. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft, Geisenheim, 23. - 26. Februar **2005**.

**MONTAG, J.; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J.: The post-infection activities of hydrated lime against apple scab - Results of an *in vitro* study.** International Conference on Biological and Pro-Ecological Methods for Control of Diseases in Orchards and Small Fruit Plantations, Skierniewice, Poland, 29. - 31. August **2005**.

**MONTAG, J.; GRIMM-WETZEL, P.; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J.: Foliar applications of hydrated lime stop infections by apple scab if timed appropriately - Results of a first field trial.** International Conference on Biological and Pro-Ecological Methods for Control of Diseases in Orchards and Small Fruit Plantations, Skierniewice, Poland, 29. - 31. August **2005**.

**Poster:**

**MONTAG, J.; MEIER, F. UND SCHÖNHERR, J.:** *Strategien zur Minimierung der Kupferaufwandmenge bei der Bekämpfung des Apfelschorfes (Venturia inaequalis) im ökologischen Obstbau.* 41. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft, Wien, Österreich, 25. - 28. Februar **2004**.

**MONTAG, J.; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J.:** *Kurative Anwendung von Alkylpolyglykosiden, Calciumhydroxid, Kaliumcarbonat und Schwefelkalk zur Bekämpfung des Apfelschorfes (Venturia inaequalis) im ökologischen Obstbau.* 54. Jahrestagung der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, Hamburg, 20. - 23. September **2004**.

**MONTAG, J.; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J.:** *Strategien zur Minimierung der Kupferaufwandmenge bei der Bekämpfung des Apfelschorfes (Venturia inaequalis) im ökologischen Obstbau.* 54. Jahrestagung der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft, Hamburg, 20. - 23. September **2004**.

**MONTAG, J.; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J.:** *In vitro Versuche zur gezielten Bekämpfung des Apfelschorfes (Venturia inaequalis) mit Kupfersulfat, Kupferhydroxid und Schwefelkalk im ökologischen Obstbau.* 42. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft, Geisenheim, 23. - 26. Februar **2005**.

**MONTAG, J.; GRIMM-WETZEL, P.; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J.:** *In vitro Versuche zur gezielten Bekämpfung des Apfelschorfes (Venturia inaequalis) mit Calciumhydroxid und zur Wirkungsweise von Calciumhydroxid.* 42. Jahrestagung der Deutschen Gartenbauwissenschaftlichen Gesellschaft, Geisenheim, 23. - 26. Februar **2005**.

**MONTAG, J.; SCHREIBER, L. UND SCHÖNHERR, J.:** *An in vitro study on the post-infection activities of copper sulphate and copper hydroxide against apple scab (Venturia inaequalis).* International Conference on Biological and Pro-Ecological Methods for Control of Diseases in Orchards and Small Fruit Plantations, Skierniewice, Poland, 29. - 31. August **2005**.