

## **Reduzierung kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel im ökologischen Weinbau: Untersuchungen zu innovativen Kupferformulierungen mit hohem Reduktionspotential und Entwicklung von Strategien zu deren gezielter Anwendung gegen die Rebenperonospora**

**Reduction of copper containing plant protection products in ecological viticulture: Investigation of innovative copper formulation with high reduction potential and development of stringent strategies for their use**

**FKZ: 09OE057**

**Projektnehmer:**

Staatliches Weinbauinstitut Freiburg  
Merzhauserstraße 119, 79100 Freiburg  
Tel.: +49 761 40165-07  
Fax: +49 761 40165-70  
E-Mail: [poststelle@wbi.bwl.de](mailto:poststelle@wbi.bwl.de)  
Internet: [www.wbi-bw.de](http://www.wbi-bw.de)

**Autoren:**

Weitbrecht, Karin; Schmidt, Carsten, Kassemeyer, Hanns-Heinz

Gefördert durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages im Rahmen des Bundesprogramms Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft.

Die inhaltliche Verantwortung für den vorliegenden Abschlussbericht inkl. aller erarbeiteten Ergebnisse und der daraus abgeleiteten Schlussfolgerungen liegt beim Autor / der Autorin / dem Autorenteam. Bis zum formellen Abschluss des Projektes in der Geschäftsstelle Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft können sich noch Änderungen ergeben.

---

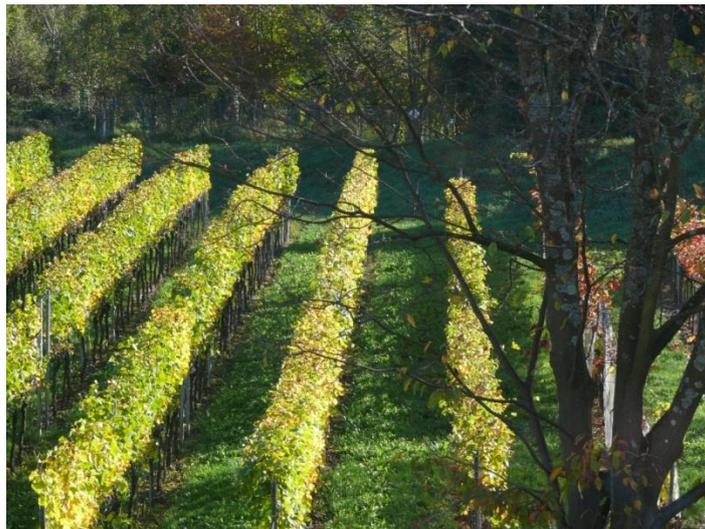
## **ABSCHLUSSBERICHT**

DES VORHABENS 512-06.01-28090E057

**REDUZIERUNG KUPFERHALTIGER  
PFLANZENSCHUTZMITTEL IM ÖKOLOGISCHEN WEINBAU:**

**UNTERSUCHUNGEN ZU INNOVATIVEN  
KUPFERFORMULIERUNGEN MIT HOHEM  
REDUKTIONSPOTENTIAL UND ENTWICKLUNG VON  
STRATEGIEN ZU DEREN GEZIELTER ANWENDUNG GEGEN  
DIE REBENPERONOSPORA**

---



Laufzeit des Vorhabens: 1.1.2011-31.12.2013

Ausführende Stelle und Zuwendungsempfänger:

Staatliches Weinbauinstitut

Abteilung Biologie

Merzhauser Straße 119

79100 Freiburg im Breisgau

Am Projekt beteiligte Kooperationspartner:

Biozentrum/Pharmazentrum der Universität Basel (<http://pages.unibas.ch/zmb/>)

Agrolytix GmbH Erlangen (<http://agrolytix.com/>)

---

Forschungsgruppe Lipide und Liposome an der Klinik für Tumorbiologie Freiburg

Autoren des Abschlussberichts: Dr. Karin Weitbrecht  
Dr. Carsten Schmidt  
Prof. Dr. Hanns-Heinz Kassemeyer

Daten beigetragen durch Elena Kotsaki im Rahmen eines Praktikums; Lucia Schreiner im Rahmen ihrer Masterarbeit.

## KURZFASSUNG

---

### **REDUZIERUNG KUPFERHALTIGER PFLANZENSCHUTZMITTEL IM ÖKOLOGISCHEN WEINBAU: Untersuchungen zu innovativen Kupferformulierungen mit hohem Reduktionspotential und Entwicklung von Strategien zu deren gezielter Anwendung gegen die Rebenperonospora**

Dr. Karin Weitbrecht, Dr. Carsten Schmidt, Prof. Dr. Hanns-Heinz Kassemeyer

Kontakt.: Staatliches Weinbauinstitut Freiburg, Abteilung Biologie, Merzhauserstr. 119, 79100 Freiburg, [Karin.Weitbrecht@wbi.bwl.de](mailto:Karin.Weitbrecht@wbi.bwl.de), [Hanns-Heinz.Kassemeyer@wbi.bwl.de](mailto:Hanns-Heinz.Kassemeyer@wbi.bwl.de)

Kupfer ist ein vor allem in der ökologischen Landwirtschaft und dort viel in Sonderkulturen eingesetztes Pflanzenschutzmittel. Gerade in großflächigen Sonderkulturen wie Wein, Apfel oder Hopfen wird Kupfer im ökologischen Anbau gegen spezifische Krankheitsbilder erfolgreich eingesetzt: z.B. den Falschen Mehltau des Weins bzw. des Hopfens und den Erreger des Apfelschorfs (*Venturia inequalis*).

Der Einsatz von Kupfer als Pflanzenschutzmittel führt zu einer Anreicherung dieses Schwermetalls in den Böden. In Weinbergböden wurde gezeigt, dass die Belastung Auswirkungen auf alle im Boden lebenden Organismen (Bodenzoönose) und auch Kleinsäuger und Vögel haben kann. Große Kupfermengen führen zu einer reduzierten Biodiversität, was dem ökologischen Gedanken direkt entgegensteht. Das Problem wird dadurch verstärkt, dass es im ökologischen Bereich kaum eine Alternative zum Einsatz von Kupfer gibt.

In unserem Projekt wurden im Laufe von drei Jahren mehrere unterschiedliche Kupfersalze und auch etliche formulierte Kupferpräparate (mikroverkapseltes Kupfer) an Weinreben getestet um ihr Kupferminimierungspotential zu erforschen.

Unsere Versuche haben gezeigt, dass man um eine optimale Wirksamkeit von Kupfer gegen den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) der Weinrebe zu erreichen, eine hohe Verfügbarkeit von Kupferionen, durch beispielsweise leicht lösliche Stoffe wie Kupfersulfat, mit einer guten Blatthafung kombinieren muss. Eine Mikroverkapselung ist ein Weg dies zu erreichen. Für unsere Versuche hat die Firma Agrolytix GmbH, Erlangen, ein mikroverkapseltes Präparat auf Kupfersulfatbasis hergestellt, die sogenannten CuCaps. Hierbei wurde das Kupfersulfat in Fett verkapselt.

Im Jahr 2012 hatte das Präparat alle Voraussetzungen erfüllt, in die nächste Testphase zu gehen. Anfang 2013 hat die Firma Agrolytix GmbH die Freisetzungskinetik des Kupfersulfats aus den Kapseln optimiert, so dass eine langanhaltende Wirkung auf den Blättern erreicht wurde. Entsprechend wurde dieses Präparat unter Praxisbedingungen im Staatsweingut Freiburg am Standort Blankenhornsberg getestet. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass das Präparat CuCaps an Weinblättern eine äquivalente Wirkung zum verwendeten Referenzprodukt (Cuprozin progress) hatte und selbst in einer geringeren Aufwandmenge von etwa 1.2 kg Kupfer pro Hektar und Jahr noch gute Wirksamkeit zeigte. Zusätzlich erwies sich, dass das mikroverkapselte Präparat signifikant besseren Schutz vor Neuinfektionen an Gescheinen und Trauben bot, als das kommerziell erhältliche Vergleichsprodukt.

In Laborexperimenten zeigte das Prüfpräparat sehr gute Haftungseigenschaften und Abwaschstabilität.

Während des BÖLN-Projekts wurden weitere Anwendungspartner aus unterschiedlichen landwirtschaftlichen Bereichen geworben: einerseits Dr. Christian Scheer vom Kompetenzzentrum Bodensee, andererseits Dr. Florian Weihrauch von der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL). Beide setzten die CuCaps im Rahmen von Kupferminimierungsversuchen im Apfel- respektive Hopfenanbau

ein und stellten ihre positiven Ergebnisse unter anderem auf dem Kupferfachgespräch in Berlin vor (2012/2013). Dies zeigt, dass wir mit den CuCaps dazu beitragen könnten im gesamten ökologischen Landbau die ausgebrachten Kupfermengen weiter zu minimieren.

Zusätzlich wurden während der Projektlaufzeit unterschiedliche Misch- und Ersatzstoffe für Kupfer getestet. Bei diesen Experimenten wurde festgestellt, dass die Ausbringung von Kupfer zusammen mit Netzschwefel eine verbesserte Wirkung gegen *P. viticola* mit sich bringt. Außerdem fanden wir eine transiente Wirkung von Hopfenextrakt auf den Falschen Mehltau der Weinrebe.

Auch das in Kooperation mit der Tumorbilogie Freiburg entwickelte Hexadecylphosphocholin wurde im Rahmen des Projektes untersucht und unter Freilandbedingungen geprüft und es zeigte dort sehr gute Wirksamkeit gegen den *P. viticola*.

Wir betrachteten im Projektverlauf auch etliche andere Naturstoffe, die in Voruntersuchungen mit Essigsäurebakterien Wirksamkeit zeigten, von denen aber keines eine gut reproduzierbare Wirkeffizienz in Blattscheibenassays hatte. Folglich wurden diese nach der ersten Prüfung nicht weiter im Projektverlauf untersucht.

Alles in allem stehen am Ende dieses Projekts mit den CuCaps ein Präparat, das, weiter entwickelt, den Eintrag von Kupfer in den Boden von Sonderkulturen verringern könnte, und drei potentielle Kupfermisch- oder Ersatzstoffe (Netzschwefel, Hopfenextrakt, HePC), deren Wirkungsweise und generelle Wirksamkeit weiter untersucht werden sollten.

---

#### SHORT VERSION:

---

### **Reduction of copper containing plant protection products in ecological viticulture: Investigation of innovative copper formulation with high reduction potential and development of stringent strategies for their use**

Copper is prevalently used in organic agriculture in several specialized crops as a plant protection product. Especially large-scale specialized cultures like apple, hops and wine are dependent upon copper containing plant protection products to protect their crops against a variety of pathogens. Copper is mainly used against oomycota like the Downy Mildew of hops or grape and the agent of the apple scap (*Venturia inequalis*).

Using copper in this fashion leads to heavy metal accumulation in soils of these cultures. In highly impacted vineyard soils a negative effect on soil organisms, small mammals and birds has previously been shown by other groups. Large amounts of copper in the soil have been implicated to reduce biodiversity of soil organisms like earthworms and microorganisms. Thus copper as a plant protection agent stands in stark contrast to the idea behind organic farming. This problem is amplified in organic agriculture as there are literally no alternatives to the use of copper containing fungicides.

In our Project we tested the effect of several different copper salts and copper containing compound on grape Downy Mildew (*P. viticola*) to identify their copper minimizing potential. Our experiments showed that for an optimal effect against grape Downy Mildew an easily soluble copper salt like copper sulfate combined with a good adhesion to grape leafs yields the best results. Microencapsulation of copper is one way to achieve this. For our experiments copper sulfate was encapsulated in a fat capsule by the Agrolytix GmbH which resulted in our so called CuCaps. In 2012 this compound was ready move into the next phase of testing. An optimization of the release

kinetics of copper ions from the capsules gave us slow release capsules. With these we could perform a successful test in the field. The slow release formula guarantees a long lasting effect on leaves. The field test was performed on site at the Blankenhornsberg in fields of the state's vineyard (Staatsweingut Freiburg) under field and praxis conditions. We could show that the CuCaps had an equivalent effect compared to a commercially available product (Cuprozin progress). Even with a reduced application rate of app. 1.2kg pure copper per year and hectare we still had a good reduction of infection rate and strength. Additionally the CuCaps led to a significantly lower infection rate and strength of flower clusters and grapes compared to the commercially available product. We also tested the rainfastness under laboratory conditions. The results showed good adhesion and a good resistance to being washed off.

During the project several cooperation partners were convinced to also use the CuCaps in their respective projects. Dr. Christian Scheer from the "Kompetenzzentrum Obstbau-Bodensee" and Dr. Florian Weihrauch from the "Landesanstalt für Landwirtschaft" agreed to test our CuCaps in their cultures. Both presented their positive findings during the "Kupferfachgespräch" in 2012 and 2013. This shows that the CuCaps could be used not only in viticulture but in other crop plants as well and could add to the efforts of minimizing the introduction of copper into the soil in organic farming in general.

We also studied substances which could be used as additives to or replacements of copper containing plant protection agents. Our experiments showed that the addition of wettable sulfur (Netzschwefel) can increase the efficiency of copper-based plant protection substances but also shows an effect against *P. viticola*. We also found that an ethanolic extract of hops had a protective effect against the Downy Mildew but this was only transient. Another good candidate as a replacement or additive substance was hexadecylphosphocholin which was a result of cooperation with the clinic for tumor biology in Freiburg. This substance was tested under field conditions and showed a good effect.

Additionally we also looked at a wide variety of other natural products which showed antimicrobial properties in our acetic acid bacteria screenings but none of those had a sufficient or stably reproducible effect on *P. viticola*. Thus they were excluded from further analysis.

All things considered this project resulted in the CuCaps as a compound which could lead to a further decrease in copper application in wine and other crops. It also yielded three substances (wettable sulfur, hops extract, HePC) which could further this process as additives or replacements and should be analyzed further.

## INHALTSVERZEICHNIS

---

Abkürzungsverzeichnis .....	8
Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis .....	11
1. Einführung.....	12
1.1 Gegenstand des Vorhabens.....	12
1.2 Ziele und Aufgabenstellung des Projekts,.....	12
1.3 Planung und Ablauf des Projektes .....	12
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde .....	14
3. Material und Methoden.....	16
3.1. Substanzen.....	16
3.2. Methoden.....	16
3.2.1 Screening mit Essigsäurebakterien.....	16
3.2.2 In vivo Beobachtungen und Behandlungen von Zoosporen und Paramecium.....	17
3.2.3 Blattscheiben und Topfpflanzenversuche.....	17
3.2.4 Messung der ausgebrachten Kupfermengen mittels AAS.....	18
3.2.5 Statistik und Datenanalyse .....	18
3.2.6 Versuchsaufbau und Methodik des Freilandversuchs .....	19
4. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse.....	22
4.1 Daten zur Wirkungsweise von unformuliertem Kupfersulfat und Erste tests potentieller Misch und Ersatzstoffe (2011-2012) .....	22
4.1.1 Screening von Substanzen auf anti-mikrobielle Wirkung.....	22
4.1.2 In vivo Tests der Wirkung unterschiedlicher Salze auf Zoosporen von <i>Plasmopara viticola</i> .....	23
4.1.3 In vivo Effekt von Kupfersulfat und Aluminiumsulfat auf Zoosporen von <i>Plasmopara viticola</i> und Paramecium .....	25
4.1.4 Mischpartner-Hopfenextrakt.....	28
Temperaturabhängige Wirkung von Kupfer.....	35
4.2 Formulierung und Charakterisierung eines Testpräparats (2012-2013).....	36
4.2.1 Verbesserung der Eigenschaften und Freisetzungskinetik der CuCaps .....	36
4.2.2 Freilandversuche 2012 (Daten von Kooperationspartnern) .....	38
4.2.3 Eigenschaften der 2013er Kapselcharge CuCaps.....	41
4.2.4 Abwaschstabilität der CuCaps.....	43
4.2.5 Gewächshausversuche .....	45
4.2.6 Spritzstrategie.....	47
4.2.7 Freilandversuche mit der 2013 er Kapselcharge CuCaps.....	49
4.4 Weitere Labortests von Misch- und Ersatzstoffen (2013).....	53

4.5 Freilandtests mit einem potentiellen Kupferersatz- oder Mischstoff(2013 Daten erhoben von Prof. Dr. Hanns-Heinz Kassemeyer und der Mittelprüfung des WBI) .....	57
5. Diskussion der Ergebnisse.....	59
5.1 Kupferformulierung.....	59
5.2 Kupferwirkung.....	59
5.3 Applikationsstrategie .....	60
5.4 Misch- und Ersatzstoffe.....	61
6. Angaben zum voraussichtlichen Nutzen und zur Verwertbarkeit der Ergebnisse.....	63
7. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; Hinweise auf weiterführende Fragestellungen .....	64
8. Zusammenfassung .....	65
9. Literaturverzeichnis.....	67
10. Übersicht über alle im Berichtszeitraum vom Projektnehmer realisierten Veröffentlichungen zum Projekt.....	69
Anhang: Erfolgskontrollbericht.....	70

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

AWM	Aufwandmenge
CC	CuCaps
CP	Cuprozin progress
Cu	Kupfer
dpi	Days past inoculation (Tage nach Inokulierung)
Fa.	Firma
mg(ai)/l	Milligramm aktive Ionen pro Liter
mM	Millimolar

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 1 Aufbau und Leseanleitung eines Boxplots (F. Krummenauer et al, 2007).....	19
Abbildung 2 Übersicht über die Versuchsfläche: Grau ist die betriebsüblich gespritzte Fläche, orange die Flächen die mit Cuprozin progress gespritzt wurden sowie die dazugehörigen Kontrollen, Blau sind die Flächen, die mit der vollen Aufwandmenge von 3 kg/h CuCaps gespritzt wurde und grün die Flächen, die nur mit 2/3 der Menge CuCaps behandelt wurde.....	20
Abbildung 3 Verklebter Filter nach der Testspritzung im Gerät der Mittelprüfung.....	20
Abbildung 4 Wachstum von <i>Acetobacter aceti</i> nach Behandlung mit verschiedenen Pflanzenextrakten. Die Anzahlangaben auf der y Achse sind in Millionen Bakterien pro ml Medium. Die Zeit ist in dpi: Tagen nach der Infektion angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte der angefertigten Triplikate. ...	22
Abbildung 5 <i>In vivo</i> Test unterschiedlicher Salze als potentielle Mischpartner für Kupfer. Hierbei sind die Konzentrationen von links nach rechts von hoch nach niedrig geordnet. Dargestellt ist hier der Mittelwert aus dem Verhalten mehrerer Sporen. <b>A</b> Reaktion der Zoosporen auf unterschiedliche Salze in unterschiedlichen Konzentrationen; <b>B</b> Reaktion von Zoosporen auf Aluminiumsulfat in unterschiedlichen Konzentrationen nach unterschiedlichen Einwirkzeiten. Die unterschiedlichen Boniturschemata beachten! .....	24
Abbildung 6 Wirkung von Aluminiumsulfat in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Befallsstärken von <i>Plasmopara viticola</i> auf Blattscheiben 5 Tage nach der Inokulation der Rebsorte Müller-Thurgau. Dargestellt sind drei separate Versuchswiederholungen mit Mittelwert und Standardabweichung. Aluminiumsulfatkonzentrationen sind in mM angegeben.....	25
Abbildung 7 Effekt von Kupfersulfat auf Zoosporen des Falschen Mehltaus in unterschiedlichen Konzentrationen nach unterschiedlichen Einwirkzeiten. Die Boniturklassen entsprechen denen aus Tabelle 1.....	26
Abbildung 8 Lichtmikroskopische Untersuchung des Effekts von Kupfersulfat auf Paramecium: <b>A</b> Vor der Behandlung; <b>B</b> Nach Kontakt mit Kupfersulfat, weiße Pfeile zeigen Membranausstülpungen an; <b>C</b> Nach längerem Kontakt mit Kupfersulfat. ....	27
Abbildung 9 Lichtmikroskopische Untersuchung des Effekts von Aluminiumsulfat auf Paramecium: <b>A</b> Vor der Behandlung; <b>B</b> Nach Kontakt mit Aluminiumsulfat; <b>C</b> Nach längerem Kontakt mit Aluminiumsulfat weiße Pfeile zeigen Membranausstülpungen an.....	27

Abbildung 10 Durch mikroskopische Bonitur festgestelltes Wirkungsgradminimum mit Standardabweichung von Hopfenextrakt (RV0407-51) auf die Zoosporen von <i>Plasmopara viticola</i> . Angegeben sind hier der prozentuale Anteil der Hopfenextrakt Stammlösung (40%) nicht die absolute Konzentration.....	28
Abbildung 11 Drei Durchgänge zum Test der protektiven Wirkung des Hopfenextrakts RV0407-51 auf Blattscheiben 5 Tage nach der Inokulation mit <i>P. viticola</i> . Gezeigt wird die auf den Mittelwert der zugehörigen Kontrolle normalisierte Befallsstärke in Prozent als die Datenverteilung widerspiegelnder Boxplot. Angegeben sind hier der prozentuale Anteil der Hopfenextrakt Stammlösung (40%) nicht die absolute Konzentration. n=36 .....	29
Abbildung 12 Zusammenfassung des Tests der protektiven Wirkung des Hopfenextrakts.....	30
Abbildung 13 <b>A</b> Befallsstärke und <b>B</b> Befallshäufigkeit bei einer Infektion 7 Tage nach der Wirkstoffapplikation mit Standardabweichung. Es wurde eine 0,3% Hopfenextraktlösung (Ho) der Stammlösung verwendet was einer absoluten Konzentration von 0,12% bzw. 0,14% Ho entspricht...	31
Abbildung 14 Versuch zur systemischen Abwehr von <i>Plasmopara viticola</i> für eine Infektion am Tag der Applikation. Für alle drei Versuchsdurchgänge <b>A, C, E</b> ist die Befallsstärke in % mit Standardabweichung angegeben. Zu jedem Versuchsdurchgang ist die Befallshäufigkeit in % zugeordnet <b>B, D, F</b> . Es wurde eine 0,3%iger und 0,35%iger Hopfenextraktlösung (Ho) der Stammlösung verwendet, was einer absoluten Konzentration von 0,12% bzw. 0,14% Ho entspricht. Vergleichsmittel war in den ersten 2 Versuchen <b>A, B, C, D</b> das protektive Mittel Folpan bei dem keine systemische Wirkung auftritt, weswegen auch nicht berücksichtigt wurde. Im 3. Versuch (e, f) wurde das systemische Vergleichsmittel Fonganil verwendet .....	32
Abbildung 15 Versuch zur systemischen Abwehr von <i>Plasmopara viticola</i> für eine Infektion einen Tag nach der Applikation. Für alle drei Versuchsdurchgänge <b>A, C, E</b> ist die Befallsstärke in % mit Standardabweichung angegeben. Zu jedem Versuchsdurchgang ist die Befallshäufigkeit in % zugeordnet <b>B, D, F</b> . Es wurde eine 0,3%iger und 0,35%iger Hopfenextraktlösung (Ho) der Stammlösung verwendet was einer absoluten Konzentration von 0,12% bzw. 0,14% Ho entspricht. Vergleichsmittel war in den ersten 2 Versuchen <b>A, B, C, D</b> das protektive Mittel Folpan bei dem keine systemische Wirkung auftritt, weswegen sie auch nicht berücksichtigt wurde. Im 3. Versuch <b>E&amp;F</b> wurde das systemische Vergleichsmittel Fonganil verwendet.....	34
Abbildung 16 Einfluss der Temperatur auf die Letalität von Kupfer; Versuch mit Einzelsporen von <i>Plasmopara viticola</i> . Boniturklassen in diesem Versuch entsprechen denen aus Tabelle 1. Die Mengenangaben entsprechen mg Kupfer pro Liter Flüssigkeit. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der Boniturklassen. Bei 15°C/25 und 1mg Kupfer pro Liter waren in allen Replikaten alle Sporen geplatzt, weshalb keine Standardabweichung vorhanden ist.....	35
Abbildung 17 <b>A</b> :Verteilung von CuCaps auf einem elektronenmikroskopischen Probenhalter. Die Agrolytix GmbH misst auf diese Weise Partikelgrößen aus um die ideale Größenverteilung zu erhalten. <b>B</b> : Eine frühe Kapselcharge auf einem <i>Vitis vinifera</i> cv Müller Thurgau Blatt (*=CuCap) direkt neben einem Stomata <b>C&amp; D</b> : CuCaps auf einem <i>Vitis Vinifera</i> cv Müller Thurgau Blatt mit zusätzlicher Infektion durch <i>Plasmopara viticola</i> . Der Pfeil markiert ein ausgetrocknetes Sporangium des Oomyceten. A Freundlicherweise von Dr. Stefan Schwab zur Verfügung gestellt, B, C und D wurden in Zusammenarbeit mit dem ZMB der Universität Basel aufgenommen. ....	37
Abbildung 18 Freisetzungskinetik von Kupferionen aus den Fettkapseln(CuCaps). A01 stellt die Freisetzungskinetik aus dem Jahr 2012 dar A42 die optimierte Kinetik, die schwarze Linie stellt eine Ideal-Kinetik dar. Darstellung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Schwab (Agrolytix GmbH).....	38

Abbildung 19 <b>A:</b> Phytotoxizitätsreaktion von Hopfen auf die erste Testcharge der CuCaps. Die roten Pfeile zeigen auf die großflächigen Nekrosen. <b>B:</b> Prozentualer Anteil der Befallenen Dolden im Freilandversuchs des LfL. Der rote Kreis markiert die Versuche mit den CuCaps. Abbildung wurde von Dr. Florian Weihrauch freundlicherweise zur Verfügung gestellt.....	39
Abbildung 20 Befallsstärke der <i>P. viticola</i> Infektion von Blattscheiben 7 Tage nach der Inokulation mit den Sporangien des Pathogen bei unterschiedlichen Behandlungen. Übersicht über die 4 Einzelversuche(obere Reihe von links nach rechts Versuch 1 und 2, untere Reihe von links nach rechts Versuch 3 und 4), Diese Versuche wurden zur Berechnung der Effizienz herangezogen. n=36/Versuch .....	41
Abbildung 21 Kupfermengen auf den einzelnen 144 cm <sup>2</sup> Platten gemessen mittels Atomabsorptionsspektroskopie. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei technischen Wiederholungsmessungen. Kupfermengen sind in mg Kupfer pro Liter aufgetragen. Die Zahlen neben den Substanzbezeichnungen geben die in der Spritzbrühe angesetzte Menge an aktiven Ionen in mg/l wieder. CC=CuCaps; CP=Cuprozin progress .....	42
Abbildung 22 Effizienz der CuCaps Charge A65 in unterschiedlichen Dosierungen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 4 normalisierten und verrechneten Versuchen. Als Kontrollen dienten Cuprozin progress, Dehydol, das den CuCaps zugesetzte Tensid, und eine unbehandelte Kontrolle.....	43
Abbildung 23 Adhäsion einer Kupferkapsel(CuCap) an ein Weinblatt der Rebsorte Müller-Thurgau nach Einwirkung von erhöhten Temperaturen (35°C) unter dem Kryo-Rasterelektronenmikroskop..	44
Abbildung 24 Normalisierte Befallsstärke der Infektion mit <i>P. viticola</i> von gewaschenen und ungewaschenen Blattscheiben 5 Tage nach der Inokulation: Boxplot der drei Wiederholungen zusammengefasst. Es wurden für diesen Versuch große Blattscheiben mit 2.5 cm Durchmesser verwendet. n=36.....	45
Abbildung 25 Befallsstärke ganzer Blätter 7 Tage nach Inokulation mit <i>P. viticola</i> im ersten (A) und im zweiten (B) Topfpflanzenversuch. Dargestellt als Boxplot. Die Blätter wurden nach der Inkubationszeit abgenommen und fotografiert, die Befallsstärke wurde digital ausgemessen. CC= CuCaps; CP= Cuprozin progress. Zahlen entsprechen den Mengenangaben in mg(ai)/l. n>28.....	46
Abbildung 26 Nekrosehäufigkeit und Stärke in Prozent 7 Tage nach Inokulation mit <i>P. viticola</i> . Rote Punkte ohne Fehlerbalken entsprechen den Nekrosehäufigkeiten, die Boxplots entsprechen den Nekrosestärken. CC= CuCaps; CP= Cuprozin progress. Zahlen entsprechen den Mengenangaben in mg(ai)/l. n >28 Blätter .....	47
Abbildung 27 Jahresübersicht 2013 für Wetter, Blattzunahme, Befallsrisiko mit <i>P. viticola</i> aus Vitimeteo ( <a href="http://www.vitimeteo.de/pero/pero.shtml">http://www.vitimeteo.de/pero/pero.shtml</a> ). Es sind phänologische Ereignisse: Austrieb, Blüte, Traubenschluss (TS) und Reife über die Zunahme der Blattfläche eingetragen. Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gottfried Bleyer.....	49
Abbildung 28 Befallsstärke und -häufigkeit von <i>P. viticola</i> auf den Trauben des Versuchsfeldes A: in der Mitte der Vegetationsperiode; B: Nach der Abschlusspritzung. Die einzelnen Punkte zeigen die Replikate. Es wurden pro Replikat jeweils 100 Gescheine/Trauben betrachtet. Dargestellt ist hier immer der Mittelwert.....	51
Abbildung 29 <b>A</b> Blattinfektionen Abschlussbonitur aufgegliedert in Befallshäufigkeit und Befallsstärke. Dargestellt sind hier Mittelwert und Standartabweichung.....	52
Abbildung 30 Normalisierte Infektionsstärken auf Blattscheiben 5 Tage nach der Inokulation mit Falschem Mehltau. Boxplot aller 4 Datensätze der Blattscheibenversuche; CuCaps 100 mg(ai)/l),	

Nonanal mit 2%w/w, Nonanal und Kupfer gemeinsam verkapselt in den gleichen AWM wie Einzelstoffe(CC+Nonanal(zusammen)), CP= Cuprozin progress 100 mg(ai)/l, unbehandelte Kontrolle, n= 144 .....	54
Abbildung 31 Effekt von Kupfer und Netzschwefel auf die Infektionsstärken von <i>P. viticola</i> auf Blattscheiben 5 Tage nach Inokulation mit dem Pathogen. Boxplot von 4 Datensätzen, normalisiert. Cuprozin= Cuprozin progress flüssig mit 100 mg(ai)/l, CuCaps mit 100 mg(ai)/l; Schwefel= 0,9% Kumulus WG Netzschwefel ; n=144 .....	55
Abbildung 32 Synergieversuch auf Blattscheiben. Befallsstärke von <i>P. viticola</i> auf Blattscheiben 5 Tage nach der Inokulation mit dem Pathogen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Substanz A = 0,1% Phosphorige Säure, Substanz B= 0,002% der Beta-Säuren Fraktion aus Hopfenextrakt, 100 mg (ai) CuCaps, n= 36.....	56
Abbildung 33 Strukturformel von Hexadecylphosphocholin .....	57

---

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1 Boniturschema für <i>in vivo</i> Versuche.....	23
Tabelle 2 Gesamtaufwandmengen an Reinkupfer pro Hektar und Jahr im Freilandversuch 2013, die geplanten Werte entsprechen den maximal zugelassenen Aufwandmengen, die ausgebracht worden wären, wenn die Witterung konstant schlecht gewesen wäre.....	48
Tabelle 3 Boniturergebnisse des Freilandversuches mit HePC im Vergleich zu anderen Versuchen derselben Flächen. BS= Befallsstärke, BH Befallshäufigkeit Dargestellt sind immer beide Bonituren...	58

---

# 1. EINFÜHRUNG

---

---

## 1.1 GEGENSTAND DES VORHABENS

---

Ziel dieses Projektes war die Entwicklung einer Strategie den Kupfereintrag im ökologischen Weinbau zu minimieren. Hierbei wurde besonders Wert auf neue innovative Formulierungen gelegt, im Falle des vorliegenden Projekts handelt es sich hierbei um mikroverkapseltes Kupfer.

---

## 1.2 ZIELE UND AUFGABENSTELLUNG DES PROJEKTS,

---

Reduzierung des Eintrags von Kupfer durch:

- Neue Kupferpräparate mit reduziertem Cu-Gehalt und gleichzeitig hohem Wirkungspotential gegen die Rebenperonospora.
- Wirkungsverbesserung durch innovative Formulierungen und den Zusatz von Mischpartnern.
- Erfüllung sämtlicher Anforderungen des ökologischen Landbaus an die neuen Kupferpräparate, Formulierungen und Mischpartner.
- Strategien zum gezielten Einsatz der neuen Kupferpräparate gegen Rebenperonospora im ökologischen Weinbau.

Übertragbarkeit der neuen Kupferpräparate in den gesamten ökologischen Landbau.

---

## 1.3 PLANUNG UND ABLAUF DES PROJEKTES

---

Das Vorhaben bestand aus drei Arbeitspaketen, in denen neue Wege zur Reduzierung kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel im ökologischen Weinbau erarbeitet werden sollten:

1. Entwicklung innovativer Kupferverbindungen  
Es wurden im Projekt Untersuchungen zur Wirkungsweise des Kupfers auf den Falschen Mehltau der Weinrebe angestellt, hierbei wurden verschieden lösliche Kupferpräparate eingesetzt und das wirksamste für die weitere Arbeit ausgewählt.
2. Entwicklung und Prüfung neuartiger Formulierungen von Kupferpräparaten und Zusatz von Mischungspartnern  
Die Mikroverkapselung mit Fett wurde als die aussichtsreichste Methode ausgewählt und entsprechend verkapselte Chargen des Kupfersulfats wurden von der Agrolytix GmbH zur Prüfung produziert. Es wurden unterschiedliche Mischpartner getestet, dabei wurden zwei vielversprechende Kupfermisch- oder Ersatzstoffe gefunden und diverse potentielle Mischpartner wie Schwefel oder Aluminiumsulfat sorgfältig im Labormaßstab geprüft.
3. Erstellung eines Wirkungsprofils und Evaluierung des Reduktionspotentials der neuartigen Kupferpräparate  
Es wurden entsprechende Experimente im Labor- und Gewächshausmaßstab durchgeführt, hierbei stellte sich heraus, dass die Austrittszeit der Kupferionen aus der Kapsel noch optimiert werden mussten. Erst danach konnte das letzte Arbeitspaket in Angriff genommen werden.

4. Strategien zum gezielten Einsatz der neuartigen Kupferpräparaten und deren Validierung unter Praxisbedingungen

Es wurde ein Freilandversuch auf einer ökologisch bewirtschafteten Fläche mit 3 Wiederholungspartellen unter Praxisbedingungen durchgeführt, bei dem nach VitiMeteovorhersage (<http://www.vitimeteo.de/pero/pero.shtml>) und Entwicklungszustand der Reben, die Pflanzenschutzmittel appliziert wurden.

## 2. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND, AN DEN ANGEKNÜPFT WURDE

---

Kupfer besitzt eine hohe Wirksamkeit gegen die Rebenperonospora (Mohr et al. 2007). Bereits geringe Mengen an Kupferionen sind in der Lage, Sporangien bzw. Zoosporen des Erregers zu abzutöten und Infektionen effektiv zu unterbinden. Die vorliegenden Kupferpräparate setzen allerdings unkontrolliert Kupfer frei und werden daher auch relativ rasch von der Pflanzenoberfläche abgewaschen. Eine hinreichende Wirksamkeit der Präparate kann derzeit nur durch einen Überschuss an Kupfer erzielt werden. Daher führen die derzeit üblichen Anwendungskonzentrationen zu einer Anreicherung von Kupfer in Weinbergsböden (Strumpf et al. 2009) und zu Auswirkungen auf die Bodenzönose (Riepert, 2009) sowie auf Kleinsäuger und Vögel.

Kupfer ist ein Spurenelement, das von Pflanzen benötigt wird aber in höheren Konzentrationen Schäden hervorrufen kann. Es handelt sich hierbei um eine Reaktion der Pflanze auf, im Fall von Kupfer, ein Schwermetall, das Zellschäden an der DNA/RNA, Lipiden und Proteinen der Pflanze durch zyklisches Reduzieren und Oxidieren von  $\text{Cu}_2^+$  zu  $\text{Cu}^+$  und die damit verbundenen Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auslösen kann. Durch die ROS kann auch eine generelle Stressreaktion ausgelöst werden. In Pflanzen wie z.B. Mais wurden diese Effekte genauer untersucht: In Mais können erhöhte Kupferkonzentrationen im Boden zu einer Abnahme der Biomasse und starkem oxidativen Stress führen. Hierbei werden Peroxidasen, Enzyme die bei oxidativem Stress eine Schutzfunktion erfüllen, aktiviert, die aber bei hohen Kupferkonzentrationen nicht mehr in der Lage sind der Pflanze einen Schutz vor dem oxidativen Stress zu gewähren (Mocquot 1996). Außerdem ist bekannt, dass hohe Dosen Kupfer die Fähigkeit der Pflanze Photosynthese zu betreiben über eine Schädigung des Photosystems II beeinträchtigen kann. Hierbei wirken die Kupferionen nicht in der Atmungskette sondern scheinen direkt die beteiligten Proteine des Photosystems zu beeinträchtigen (Mohatny 1989). Es können also durch Kupferanreicherungen im Boden von stark bewirtschafteten Flächen unerwünschte Nebenwirkungen für Pflanzen auftreten. Aber es kann auch durch eine übermäßige Applikation von Kupfer zu einer unerwünschten Reaktion kommen, die sich durch Nekrosen und Chlorosen auf den Blättern bemerkbar macht, die sogenannte Phytotoxizitätsreaktion (Phytotox).

Im ökologischen Weinbau kann derzeit auf den Einsatz von Kupferpräparaten nicht verzichtet werden und es stehen derzeit keine Alternativen zur Verfügung, um Kupfer zu ersetzen. Dies konnte auch in einem EU-Projekt zum Ersatz von Kupfer im ökologischen Wein- und Apfelanbau (EU-Projekt No. 501452, <http://www.rep-co.nl>) gezeigt werden. Eine Möglichkeit, den Eintrag von Kupfer auf ein umweltverträgliches Maß zu minimieren, ist die Entwicklung neuer Formulierungen mit gezielter Freisetzung der Cu-Ionen. Ansätze, den Aufwand an Kupfer zu minimieren, sind neuartige Formulierungen und Mischpartner, welche die Eigenschaften von Kupfer auf der Zielfläche optimieren.

Kupferpräparate sind im ökologischen Weinbau derzeit unverzichtbar, um die Weinrebe vor Schäden durch die Rebenperonospora zu schützen und Ertrag und Qualität zu sichern. Aufgrund der Anreicherung von Kupfer im Ökosystem und der Wirkung auf Bodenorganismen und terrestrische Organismen muss der Eintrag von Kupfer auf ein umweltverträgliches Niveau reduziert werden. Dieses Ziel kann durch innovative Kupferverbindungen, Formulierungen und Mischpartner erreicht werden.

In dem Vorhaben wurden Kupferverbindungen, Formulierungen und Mischpartner entwickelt, mit denen der Kupfereintrag im ökologischen Weinbau deutlich reduziert werden könnte. Präparate, die in Labor- und Gewächshausversuchen eine hohe Wirksamkeit gegen Rebenperonospora zeigten, wurden in der Praxis unter den Bedingungen des ökologischen Weinbaus erprobt. Strategien zur gezielten Anwendung dieser Präparate. Präparate und Strategien mit Reduktionspotential sollten nach erfolgreicher Prüfung in den ökologischen Weinbau eingeführt werden. Dadurch würde ein wesentlicher Beitrag zur Reduktion des Kupfereintrags im ökologischen Weinbau geleistet.

---

## 3. MATERIAL UND METHODEN

---

---

### 3.1. SUBSTANZEN

---

Verwendete Substanzen:

Agar-Agar, Kobe Fraktion 1 (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe)  
Aluminiumsulfat (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe)  
Benzoessäure (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe)  
CuCaps (wirksamer Bestandteil: Kupfersulfatpentahydrat (Agrolytix GmbH, Erlangen)  
Cuprozin progress flüssig (wirksamer Bestandteil: Kupferhydroxid)(Spiess-Urania, Hamburg)  
Dehydol (zur Verfügung gestellt von Agrolytix GmbH)  
Eugenol (DSM Nutrions)  
Hopfenextrakt RV0407-51 (DSM Nutrions)  
Hopfenextrakt (Hopsteiner)  
Kupfersulfatpentahydrat (Merck, Darmstadt)  
Kupfersulfatstandardlösung (Merck, Darmstadt)  
Natriumacetat (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe)  
Natriumchlorid (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe)  
Netzschwefel Kumulus WG (BASF Pflanzenschutz, Limburgerhof)  
Nonanal (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verkapselt durch die Agrolytix GmbH, Erlangen  
Salicylsäure (DSM Nutrions)  
Salzsäure 30% Suprapur (Merck, Darmstadt)  
t-Zimtaldehyd (DSM Nutrions)  
Thymol (DSM Nutrions)  
WL Nutrient Broth (Difco)

Verwendete Organismen:

*Vitis vinifera* cv. Müller-Thurgau  
*Plasmopara viticola* (Hausstamm des WBI und Freilandsammlungen)

---

### 3.2. METHODEN

---

---

#### 3.2.1 SCREENING MIT ESSIGSÄURBAKTERIEN

---

Um eine allgemeine anti-mikrobielle Wirksamkeit von Substanzen zu testen wurden Lösungen von Essigsäurebakterien (*Acetobacter aceti*) mit der Substanz versetzt und deren Wachstum bei 21°C-24°C über 5 Tage mit einem Coulter Counter von Beckmann überprüft. Hierfür wurde eine Stamm-lösung Essigsäure Bakterien in WL-Medium angezogen. Nach 4 Tagen wurde die Bakterienkonzentration bestimmt und jeweils 2500 000 Bakterien auf 20 ml angeimpft und mit entsprechenden Konzentrationen der Prüfsubstanz versetzt. Es wurden über eine Periode von 5 Tagen täglich 50µl der Proben abgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Ansätze wurden jeweils in Triplikaten gemacht. Ein Teil der Substanzen wurden freundlicherweise von der Firma DSM Nutritions zur Verfügung gestellt.

---

### 3.2.2 IN VIVO BEOBACHTUNGEN UND BEHANDLUNGEN VON ZOOSPoren UND PARAMECIUM

---

Von mit *P. viticola* befallenen Blättern wurden mit destilliertem Wasser Sporangien abgespült. Diese wurden bei 24°C und Weißlicht für 20 min-1h inkubiert. Danach wurden die geschlüpften Zoosporen mit Kupfer behandelt, so dass der tatsächliche Reinkupferanteil in der endgültigen Lösung auf dem Objektträger 0,08 mg/l, 0,07 mg/l, 0,06 mg/l, 0,05 mg/l, 0,04 mg/l, 0,03 mg/l, 0,02 mg/l und 0,01 mg/l betrug. Abschließend konnte die Wirkung des Kupfers unter dem Mikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena) beobachtet werden. Für die Temperaturversuche wurde eine Kälte/Wärmekammer(LTS 120 Heating/Freezing Stage von Linkam Scientific Instruments LTD) verwendet. Diese Stadien wurden nach zwei, fünf und zehn Minuten geschätzt und als Wirkung des Kupfers in Tabellen abgetragen. Zu jeder Versuchsvariablen Temperatur und Zeit wurden sechs Wiederholungen durchgeführt.

Es wurden Pantoffeltierchen aus Mischkulturen in einem Glas für 2-3 Wochen, warm und hell, ohne direktes Sonnenlicht, angezogen und danach auf Objektträger transferiert. Hier wurden die vorhandenen Pantoffeltierchen mit Einzelkristallen Kupfersulfat oder Aluminumsulfat behandelt und ihre Reaktion dokumentiert

---

### 3.2.3 BLATTSCHNEIBEN UND TOPFPFLANZENVERSUCHE

---

Einerseits wurde die Wirkung der Kapselsuspension auf das Pathogen mit Hilfe von Blattscheibentests untersucht. Hierfür wurden junge Blätter von unbehandelten Pflanzen (Müller-Thurgau) geerntet. Anschließend wurden die Blätter mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Ethanol desinfiziert (30s), um die Blattunterseite grob von nekrotrophen Pathogenen zu reinigen. Für die Blattscheibentests wurden aus den gewaschenen Blättern mit einem Korkbohrer Blattscheiben von gleicher Blattfläche hergestellt. Anschließend wurden die Blattscheiben jedes Blattes gleichmäßig über alle Behandlungen verteilt. Pro Behandlung wurden jeweils 36 Blattscheiben in eine Petrischale mit sterilem Wasseragar (1% Agar-Agar) gelegt. Auf dem Wasseragar wurden die Blattscheiben für die Dauer des Versuchs am Leben erhalten. Es wurde durchgehend die Rebsorte *Vitis vinifera* cv. Müller Thurgau verwendet, da diese eine der empfindlicheren klassischen Rebsorten ist.

Diese Platten wurden mit einem Applikationsgerät von Schachtner mit den entsprechenden Mitteln behandelt. (Geschwindigkeit 2,25km/h; Spritzdruck 3 Bar, Spritzhöhe 60 cm, Flachdüse, (Spritzmenge ca. 6ml/m<sup>2</sup> bei 2.25km/h))

Anschließend wurde auf die Unterseite aller Blattscheiben je 100µl einer Sporangiensuspension mit 35.000 Sporen/ ml pipettiert.

Die infizierten Blattscheiben in ihren Petrischalen wurden in einem Klimaraum bei 25°C mit einem Tag-Nachtrhythmus von 14h:6h für 5-7 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Blattscheiben

nach ihrer Befallsstärke bewertet, wobei die befallene Fläche als Hauptkriterium herangezogen wurde. Hierfür wurden die Blattscheiben fotografiert, die Flächen der Blattscheiben mit „Fiji „ automatisiert ausgemessen und die korrespondierenden Infektionsflächen ebenfalls in „Fiji“ von Hand vermessen.

Des Weiteren wurden Topfpflanzenversuche im temperierten Gewächshaus durchgeführt, hierbei wurden jeweils drei Pflanzen mit der automatischen Applikationsanlage von Schachtner eingesprüht und ca. 6h später mit einer Sporensuspension mit ca. 30000 Sporen/ml infiziert, über Nacht mit einer Plastiktüte bedeckt um Idealbedingungen für eine Infektion zu schaffen und nach einer Woche mit Wasser eingesprüht und über Nacht eingetütet um die Sporulation auszulösen.

Danach wurden alle Blätter der Pflanzen, die nicht in dieser Woche zugewachsen sind, Zuwachspunkte vorher mit einer Maxzange markiert, geerntet, fotografiert und sowohl Befallshäufigkeit als auch Befallsstärke und Größe der aufgetretenen Nekrosen wurden ausgewertet. Befallsstärke wurde mit „Fiji“ ausgemessen ebenso wie die Nekrotestärke.

---

#### 3.2.4 MESSUNG DER AUSGEBRACHTEN KUPFERMENGEN MITTELS AAS

---

Zur Kontrolle der Blattscheibenversuchen wurde in jedem Fall, in dem Kupfer verwendet wurde, für jede Konzentration eine leer Platte mit eingesprüht, diese wurde nach dem Trocknen mit 10ml 1M HCl (suprapur) ausgewaschen, zusammen mit einer nicht eingesprühten leeren Platte. Die Kupfermengen in diesen Lösungen wurden mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt und auf die Plattengröße zurück gerechnet.

---

#### 3.2.5 STATISTIK UND DATENANALYSE

---

Die erhobenen Daten wurden in der Software R (Version 3.0.1 „Good Sport“) auf Normalverteilung und gleiche Varianzen geprüft, waren diese gegeben wurden die Daten mit einem T-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Signifikanzlevel war hier ein p-Wert von 0,05. Bei unterschiedlichen Varianzen wurde ein Welch-Test verwendet um Signifikanz von Unterschieden zu prüfen.

Die Wahl der Darstellung fiel für diesen Bericht hauptsächlich auf zwei Methoden: Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen verwendet, wenn die erhobenen Datenmengen einen Rückschluss auf eine Normalverteilung der Daten zuließen.

Bei kleineren Datensätzen wird hier meist ein sogenannter Boxplot verwendet, der die Verteilung aller Daten übersichtlich visualisiert und den Median, der im Fall einer Normalverteilung dem Mittelwert entsprechen sollte, als Strich in den Boxen anzeigt. Die Box selbst zeigt die 50% zentralen Messwerte die Ausläufer das 1. Und 3. Quartil der Messwerte. Ausreißer sind als Punkte oberhalb oder unterhalb der entsprechenden Ausläufer notiert.

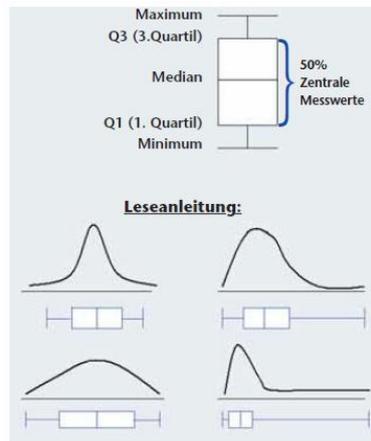


Abbildung 1 Aufbau und Leseanleitung eines Boxplots (F. Krummenauer et al, 2007)

Daten von Versuchswiederholungen mit unterschiedlicher Befallsstärke in den Kontrollen wurden auf die mittlere Befallsstärke ihrer Kontrolle normalisiert, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen.

Effizienzberechnung: Wirkungsgrade wurden nach Abbot et al berechnet (Abbot et al, 1925)

---

### 3.2.6 VERSUCHSAUFBAU UND METHODIK DES FREILANDVERSUCHS

---

Die Freilandversuche im Jahr 2013 wurden nicht von der Mittelprüfung des Staatlichen Weinbauinstituts Freiburg durchgeführt, sondern freundlicherweise von den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Staatsweinguts Freiburg in Ihringen am Kaiserstuhl. Es wurde eine komplette Fläche für den Versuch zur Verfügung gestellt (Fläche 41 Balschental). Die Versuchsfläche wurde in Versuchspartzen unterteilt, jeweils drei Partzen pro Variante á 3 Reihen und 9 Partzen Kontrollen.

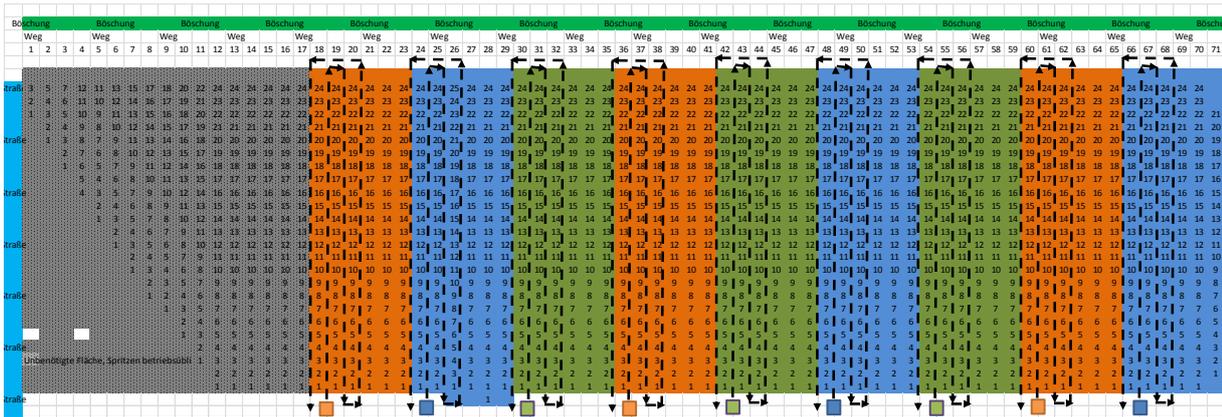


Abbildung 2 Übersicht über die Versuchsfläche: Grau ist die betriebsüblich gespritzte Fläche, orange die Flächen die mit Cuprozin progress gespritzt wurden sowie die dazugehörigen Kontrollen, Blau sind die Flächen, die mit der vollen Aufwandmenge von 3 kg/h CuCaps gespritzt wurde und grün die Flächen, die nur mit 2/3 der Menge CuCaps behandelt wurde.

In diesen Parzellen wurde jeweils nur die mittlere Reihe bonitiert, da es sich bei dem in der Praxis verwendeten Spritzgerät nicht um eine Tunnelspritze sondern ein Gerät mit herkömmlichen Axialgebläse handelte, was zu einer größeren Abdrift von Spritzmittel führt. Diese größere Abdrift machte auch eine erhöhte Anzahl an Kontrollreihen als Puffer notwendig (9 bonitierte Kontrollreihen, 27 Kontrollreihen insgesamt)

Es war nicht möglich die CuCaps mit der Tunnelspritze (Parzellenspritzgerät) der Mittelprüfung auszubringen, da hier im Spritzmittelbehälter Druck aufgebaut wird, was zu einer Separation der festen CuCaps aus der angesetzten Suspension führt.



Abbildung 3 Verklebter Filter nach der Testspritzung im Gerät der Mittelprüfung

Im Feld wurde Anfang Juli eine künstliche Infektion mit *P. viticola* gesetzt, um eine ausreichende Befallsstärke zu garantieren. Hierbei wurden in jeder auszuwertenden Reihe an 4 Trieben jeweils zwei Blätter infiziert, über Nacht mit einer feuchten Tüte bedeckt, um ideal Infektionsbedingungen zu schaffen und am nächsten Morgen wieder von dieser befreit.

Das Versuchsfeld wurde en détail zweimal bonitiert, einmal während der Vegetationsperiode bei einer Befallshäufigkeit in den Kontrollen von 30% und einmal 3 Wochen nach der Abschluss-spritzung. Zu beiden Terminen wurde sowohl die Infektion der Blätter als auch der Gescheine, bzw. Trauben beurteilt. Vor und zwischen den Bonituren wurden Epidemie-Erhebungen durchgeführt

## 4. AUSFÜHRLICHE DARSTELLUNG DER WICHTIGSTEN ERGEBNISSE

### 4.1 DATEN ZUR WIRKUNGSWEISE VON UNFORMULIERTEM KUPFERSULFAT UND ERSTE TESTS POTENTIELLER MISCH UND ERSATZSTOFFE (2011-2012)

#### 4.1.1 SCREENING VON SUBSTANZEN AUF ANTI-MIKROBIELLE WIRKUNG

Um das große Spektrum der Naturstoffe einzuschränken auf Substanzen, die eine anti-mikrobielle Wirkung zeigen, wurde hier der Ansatz verwendet ein vorhergehendes Screening der Substanzen mit Essigsäurebakterien zu machen. Hierbei wurden Inhaltsstoffe von Pflanzen wie Thymol, einem der Hauptbestandteile der ätherischen Öle von Thymian, Oregano und Bohnenkraut, Benzoesäure, die ein Bestandteil vieler Baumharze ist, oder Eugenol, einem Öl aus Gewürznelken, getestet. Dargestellt ist hier nur eine Auswahl der geprüften Stoffe.

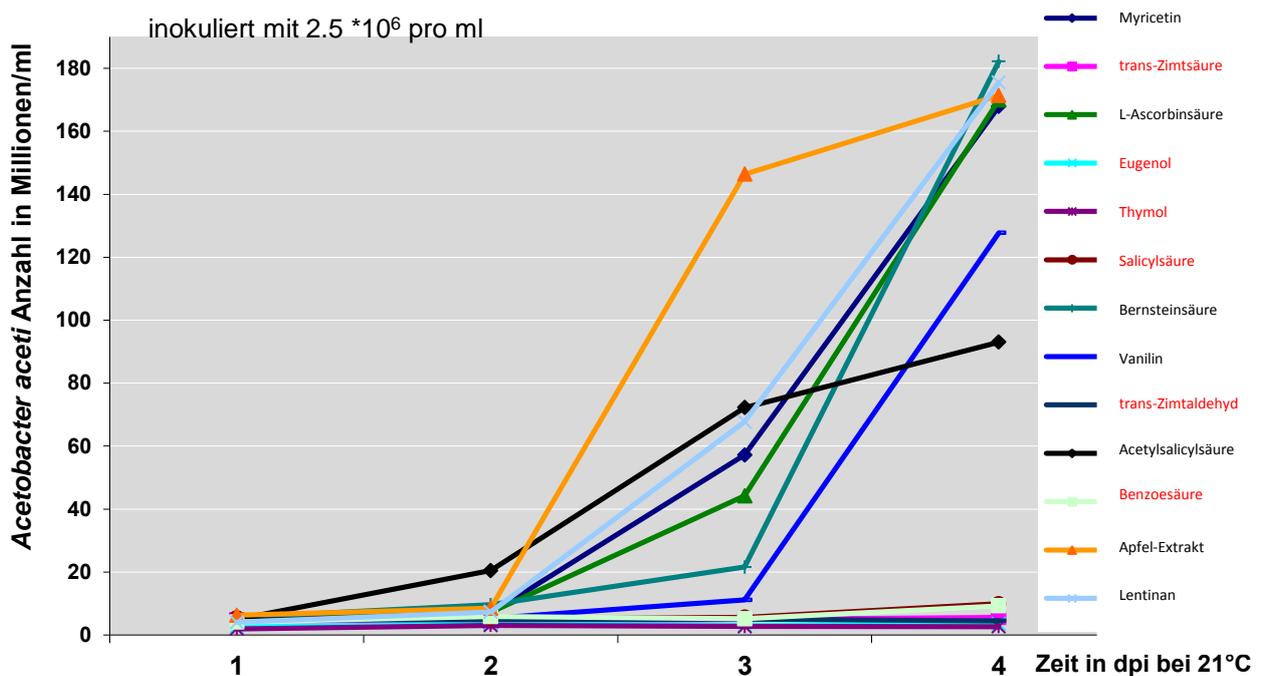


Abbildung 4 Wachstum von *Acetobacter aceti* nach Behandlung mit verschiedenen Pflanzenextrakten. Die Anzahlangaben auf der y Achse sind in Millionen Bakterien pro ml Medium. Die Zeit ist in dpi: Tagen nach der Infektion angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte der angefertigten Triplikate.

In Abbildung 4 sieht man, dass es etliche Pflanzenextrakte gibt, die das Wachstum von *Acetobacter* hemmen. Die rot unterlegten Substanzen wurden als Kandidaten für weitere Untersuchungen

selektiert, da sie in diesem Experiment einer starken Hemmung des Bakterienwachstums führten. Diese Substanzen wurden in einem separaten Projekt näher untersucht. Hier stellte sich allerdings heraus, dass eine Wirkung gegen den Falschen Mehltau zwar in vielen Fällen vorhanden war, allerdings deren Wirkungsgrad zu gering oder das Ergebnis nicht gleichmäßig reproduzierbar war, weshalb sie nicht detaillierter untersucht wurden.

---

#### 4.1.2 IN VIVO TESTS DER WIRKUNG UNTERSCHIEDLICHER SALZE AUF ZOOSPoren VON *PLASMOPARA VITICOLA*

---

Es wurden Lebendbeobachtungen zum Einfluss unterschiedlicher Salze in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Hierbei wurden die lebenden, geschlüpften Zoosporen unter dem Mikroskop mit entsprechenden Mengen der Salze versetzt (Abb. 5) das Verhalten der Mehrheit der Zoosporen wurden mittels eines Boniturschemas (Tabelle 1) bewertet. Ab Boniturklasse 3 ist davon auszugehen, dass die Zoosporen absterben.

Tabelle 1 Boniturschema für *in vivo* Versuche

<b>Boniturschema</b>	
Spore platzt	5
Spore bläht sich auf	4
Spore enzystiert sich schnell	3
Spore kreiselt	2
Spore schwimmt irregulär	1
Spore schwimmt unbeeinflusst	0

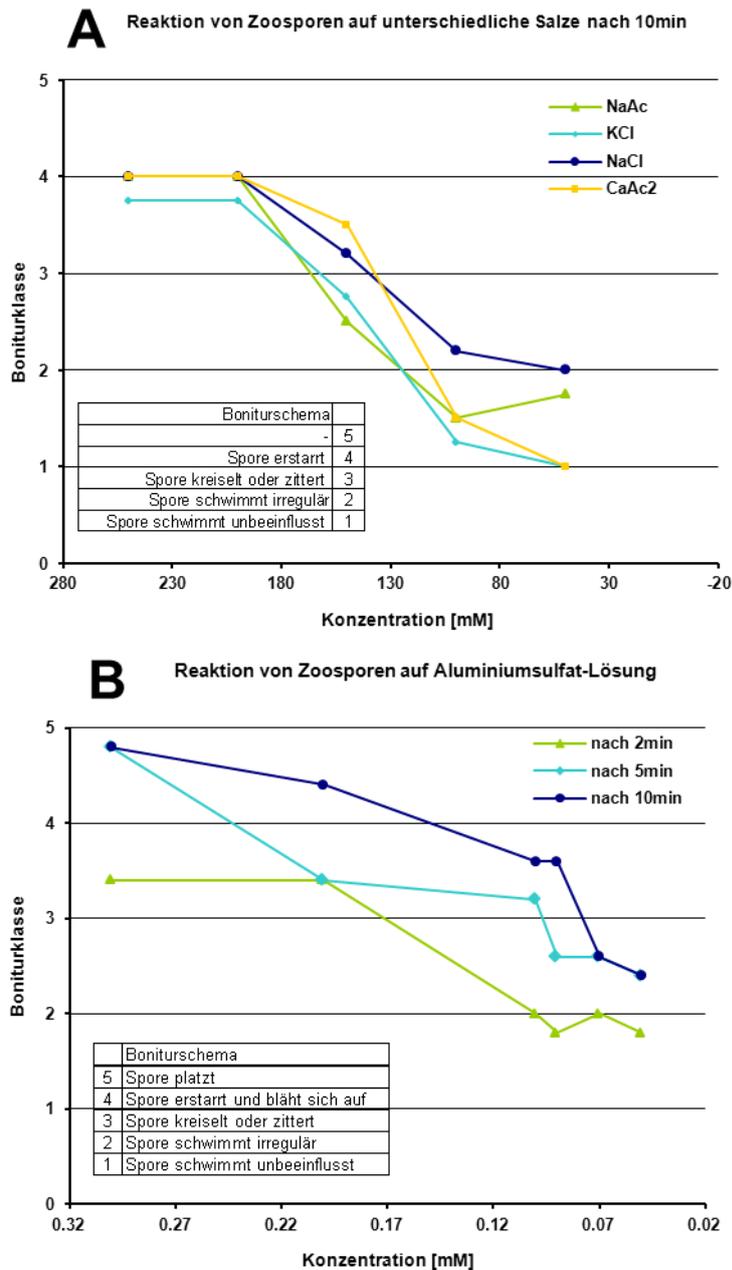


Abbildung 5 *In vivo* Test unterschiedlicher Salze als potentielle Mischpartner für Kupfer. Hierbei sind die Konzentrationen von links nach rechts von hoch nach niedrig geordnet. Dargestellt ist hier der Mittelwert aus dem Verhalten mehrerer Sporen. **A** Reaktion der Zoosporen auf unterschiedliche Salze in unterschiedlichen Konzentrationen; **B** Reaktion von Zoosporen auf Aluminiumsulfat in unterschiedlichen Konzentrationen nach unterschiedlichen Einwirkzeiten. Die unterschiedlichen Boniturschemata beachten!

In Abb. 5 werden vergleichend die Ergebnisse dieser Untersuchung präsentiert. Die verwendeten Salze lassen sich in zwei Kategorien einordnen: Substanzen, die auch in höheren Konzentrationen nicht zum Platzen der Zoosporen führen und solche bei denen die Zoosporen schon in geringen

Mengen abgetötet werden. Aluminiumsulfat gehört zu den Substanzen, die Zoosporen in kurzer Zeit zum Platzen bringen und damit eine vergleichbare Wirkung wie Kupfersulfat in *in vivo* Tests zeigen.

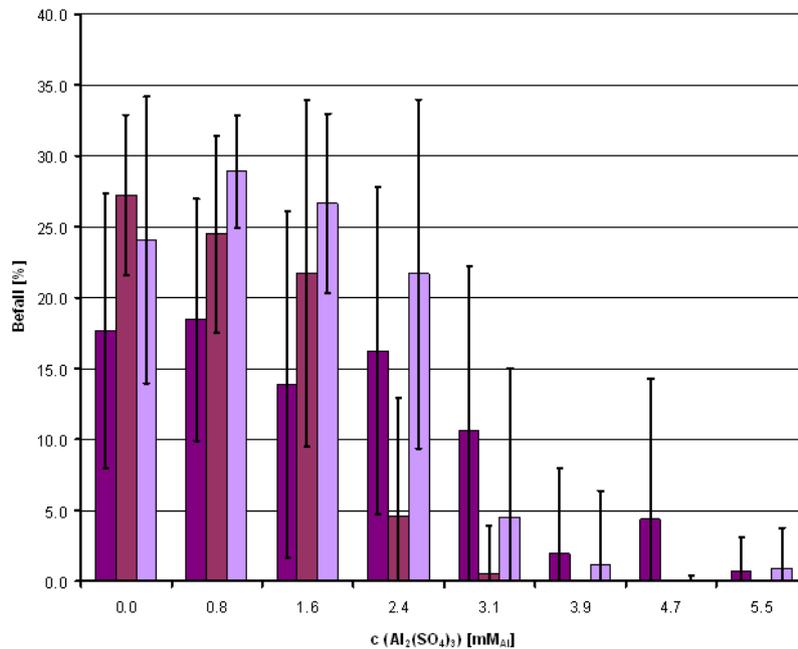


Abbildung 6 Wirkung von Aluminiumsulfat in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Befallsstärke von *Plasmopara viticola* auf Blattscheiben 5 Tage nach der Inokulation der Rebsorte Müller-Thurgau. Dargestellt sind drei separate Versuchswiederholungen mit Mittelwert und Standardabweichung. Aluminiumsulfatkonzentrationen sind in mM angegeben.

In Abbildung 6 wurde Aluminiumsulfat in Blattscheibentests verwendet, um auch im makroskopischen Bereich auf Wirksamkeit des Salzes zu testen. Die drei Versuchswiederholungen sind hierbei nebeneinander aufgetragen. Die Versuche unterscheiden sich leicht in den Befallsstärken der Kontrollen. Ein Absinken der Infektionsstärken ist deutlich im zweiten Versuch bereits bei 2.4 mM Aluminiumsulfat zu erkennen, bei Versuchen 1 und 3 bei 3.1 mM Aluminiumsulfat. Entsprechend könnte man eine Abbruchkante der Infektion bei 3.1 mM Aluminiumsulfat postulieren. Dies entspricht einer Aufwandmenge von 250 mg Aluminiumsulfat/l

#### 4.1.3 IN VIVO EFFEKT VON KUPFERSULFAT UND ALUMINIUMSULFAT AUF ZOOSPOREN VON *PLASMOPARA VITICOLA* UND *PARAMECIUM*

Um zu klären wie Kupfer und Aluminium auf die Zoosporen des Falschen Mehltaus der Weinrebe wirken wurden mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen Zoosporen behandelt und beobachtet. Da die Zoosporen sehr klein und labil sind, wurden für genauere Untersuchungen, ob die lo-

nen aufgenommen werden und durch Störung der kontraktile Vakuole zum Platzen führen oder ob es sich um allgemeine Membranschädigungen handelt, Pantoffeltierchen herangezogen, da sich diese leichter beobachten lassen.

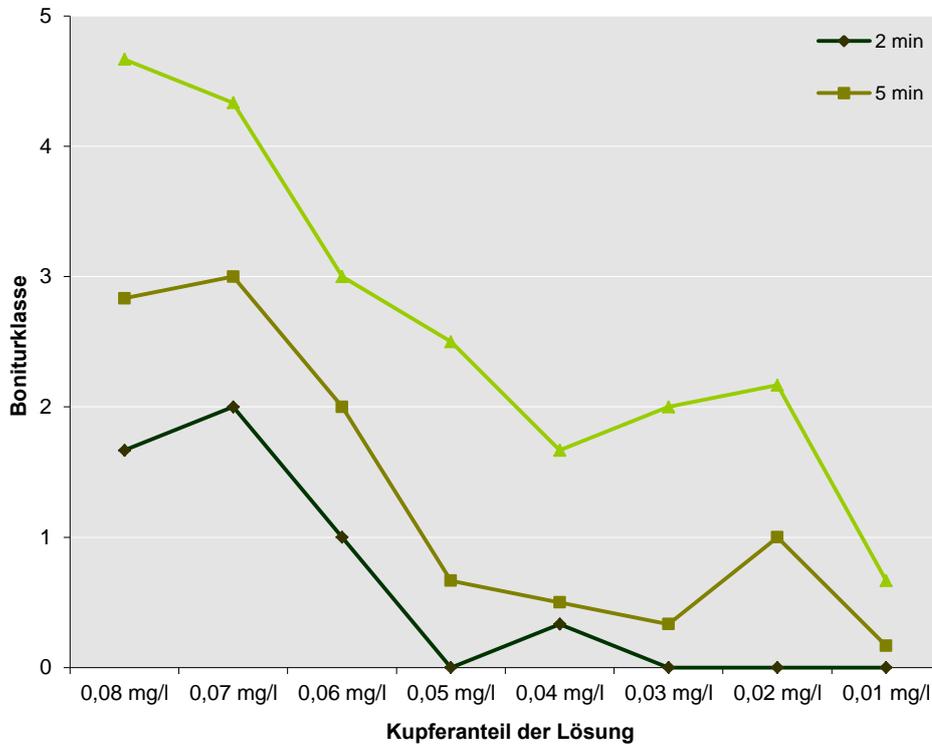


Abbildung 7 Effekt von Kupfersulfat auf Zoosporen des Falschen Mehltaus in unterschiedlichen Konzentrationen nach unterschiedlichen Einwirkzeiten. Die Boniturklassen entsprechen denen aus Tabelle 1

Man sieht in Abbildung 7, dass bereits geringe Mengen von Kupfer in Lösung einen Effekt auf die Beweglichkeit und das Überleben von Zoosporen von *P. viticola* haben. Bereits 0,06 mg Kupfer pro Liter lassen die Zoosporen kreiseln, was ein Anzeichen dafür ist, dass die Zoosporen absterben werden. Ab 0,07 mg/l ist davon auszugehen, dass die Wirkung bereits nach 10 Minuten letal ist.

Die mit Kupfersulfat oder Aluminiumsulfat behandelten Pantoffeltierchen zeigten ein sehr ähnliches Bild.

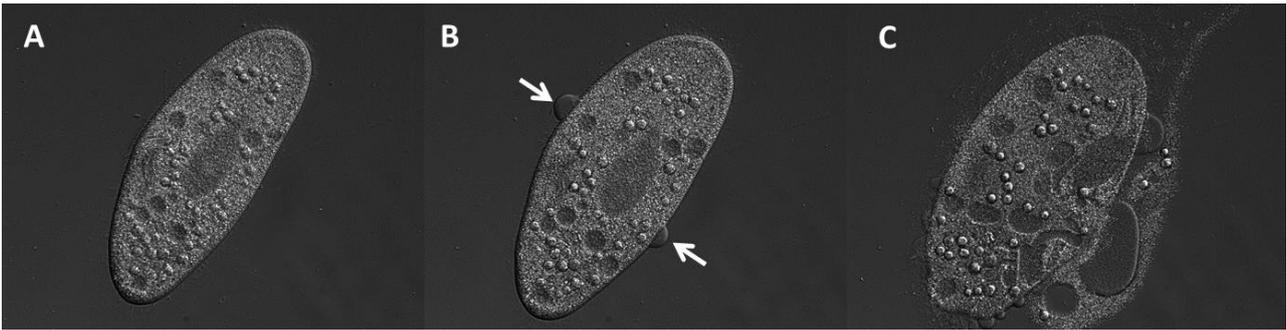


Abbildung 8 Lichtmikroskopische Untersuchung des Effekts von Kupfersulfat auf Paramecium: **A** Vor der Behandlung; **B** Nach Kontakt mit Kupfersulfat, weiße Pfeile zeigen Membranausstülpungen an; **C** Nach längerem Kontakt mit Kupfersulfat.

Paramecium zeigt bereits nach kurzer Einwirkzeit eine Reaktion auf Kupfersulfat (Abb. 8). Erst bläht sich das Pantoffeltierchen auf (Abb. 8B), dann bilden sich Membranausstülpungen (Abb. 8B) und schließlich reißt die Plasmamembran (Abb. 8C), was praktisch zum sofortigen Tod der Zelle führt. Während des gesamten Vorgangs war die pulsierende Vakuole intakt.

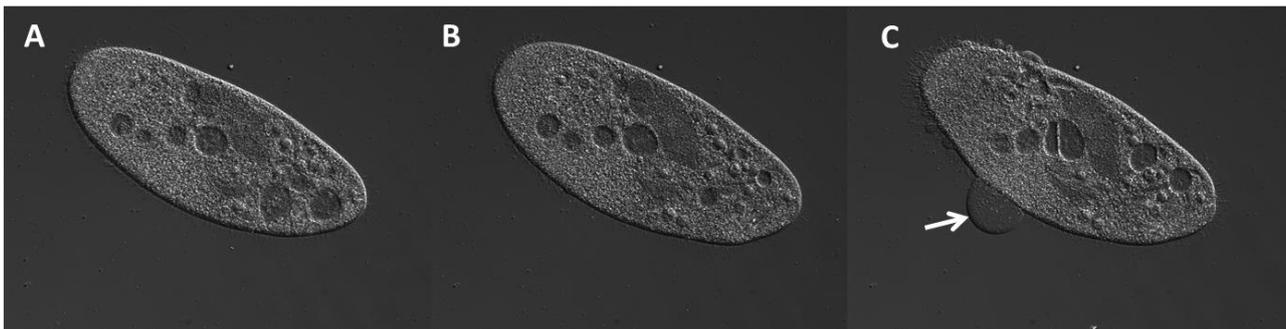


Abbildung 9 Lichtmikroskopische Untersuchung des Effekts von Aluminiumsulfat auf Paramecium: **A** Vor der Behandlung; **B** Nach Kontakt mit Aluminiumsulfat; **C** Nach längerem Kontakt mit Aluminiumsulfat weiße Pfeile zeigen Membranausstülpungen an.

Aluminiumsulfat zeigt auf Paramecium einen ähnlichen Effekt wie Kupfersulfat. Auch hier kommt es nach kurzer zu einem Aufblähen der Zelle (Abb. 9B) und danach zu Membranausstülpungen und dem durch den Membranintegritätsverlust bedingten Tod (Abb. 9C).

Bei beiden Stoffen war bis zum Zeitpunkt der Membranausstülpung und des Reißens der Membran die pulsierende Vakuole aktiv, was eher darauf schließen lässt, dass Membranschäden zum Tod der Zellen führen und nicht eine Schädigung der Vakuolen.

---

#### 4.1.4 MISCHPARTNER-HOPFENEXTRAKT

---

Da die Kupferreduzierung hauptsächlich die ökologische Landwirtschaft betrifft, wurden Pflanzenextrakte als Mischpartner in Betracht gezogen. Hierbei hat sich Hopfenextrakt, dessen biozide Wirkung schon seit längerem bekannt ist und auch in unterschiedlichen Formen bereits eingesetzt wird, als vielversprechender Kandidat herausgestellt.

#### MIKROSKOPISCHES WIRKUNGSGRADMINIMUM

---

Die Ergebnisse des mikroskopischen Versuches zeigen deutlich, dass Hopfenextrakt gegenüber den Sporen von *P. viticola* wirksam ist (Abb. 10). Die Beeinflussung der Sporen setzt bei  $1,25 \cdot 10^{-6}$  ein und wirkt ab  $1,25 \cdot 10^{-5}$  immer letal.

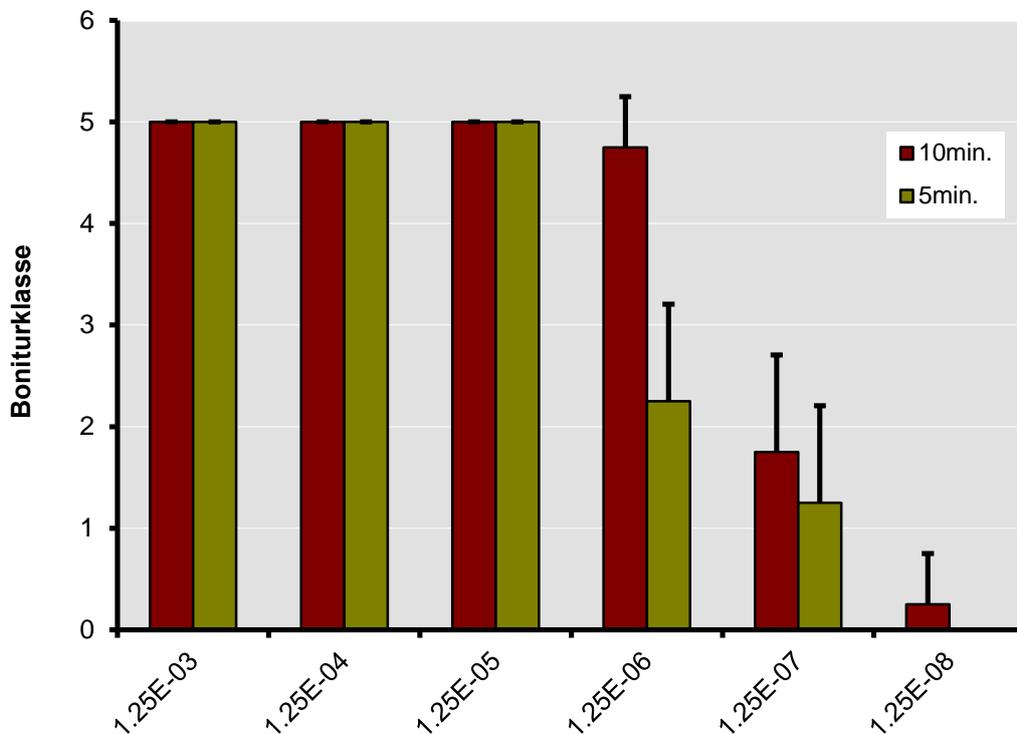


Abbildung 10 Durch mikroskopische Bonitur festgestelltes Wirkungsgradminimum mit Standardabweichung von Hopfenextrakt (RV0407-51) auf die Zoosporen von *Plasmopara viticola*. Angegeben sind hier der prozentuale Anteil der Hopfenextrakt Stammlösung (40%) nicht die absolute Konzentration.

## PROTEKTIVE WIRKUNG

Nach diesem positiven Ergebnis wurden Blattscheibentests durchgeführt um eine protektive Wirkung des Hopfenextrakts zu untersuchen.

Die einzelnen Versuche zeigten in allen Durchgängen ein sehr unterschiedliches Bild (Abb. 10). Im ersten Versuch (Abb. 11 rote Reihe) konnte der durchschnittliche Befall im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle durch die Applikation einer 0,1% - 0,35% Hopfenextraktlösung bis um die Hälfte reduziert werden. Im zweiten (Abb. 11 grüne Reihe) und dritten (Abb. 11 blaue Reihe) Versuch gelang es sogar den durchschnittlichen Befall deutlich, bis unter ein Viertel des Normalbefalls, zu reduzieren.

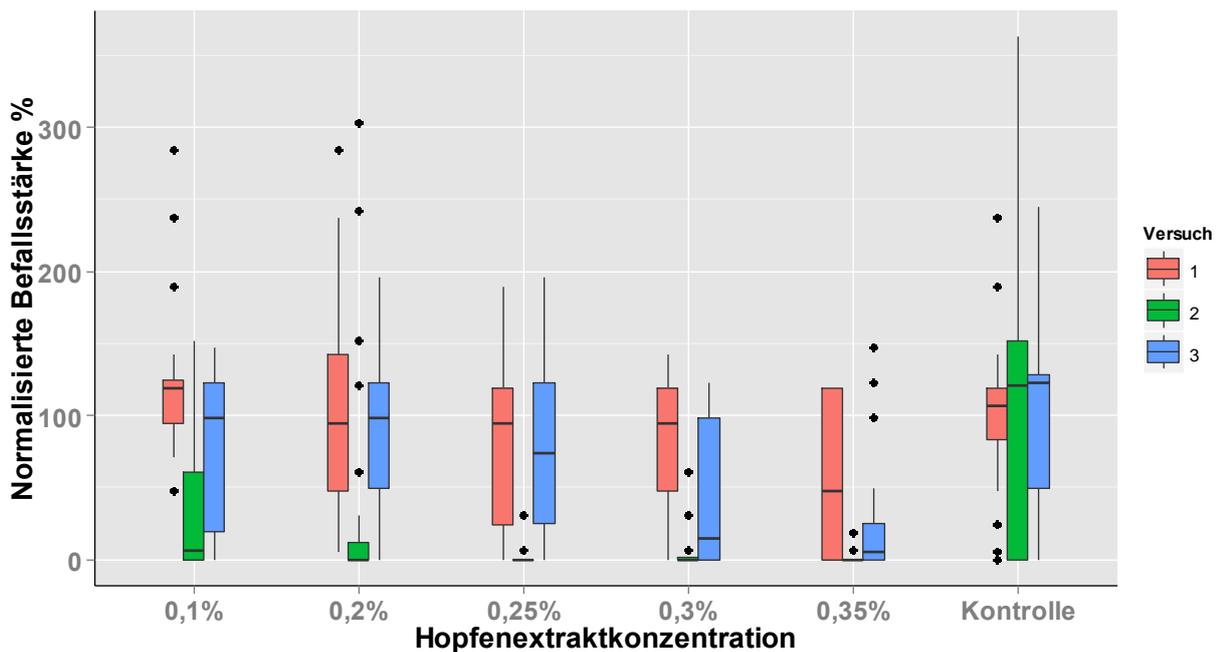


Abbildung 11 Drei Durchgänge zum Test der protektiven Wirkung des Hopfenextrakts RV0407-51 auf Blattscheiben 5 Tage nach der Inokulation mit *P. viticola*. Gezeigt wird die auf den Mittelwert der zugehörigen Kontrolle normalisierte Befallsstärke in Prozent als die Datenverteilung widerspiegelnder Boxplot. Angegeben sind hier der prozentuale Anteil der Hopfenextrakt Stammlösung (40%) nicht die absolute Konzentration. n=36

Fasst man diese Ergebnisse zusammen ergibt sich für diesen Hopfenextrakt (Abb. 12) ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Konzentration des Hopfenextrakts und der Verringerung der normalisierten Befallsstärke:

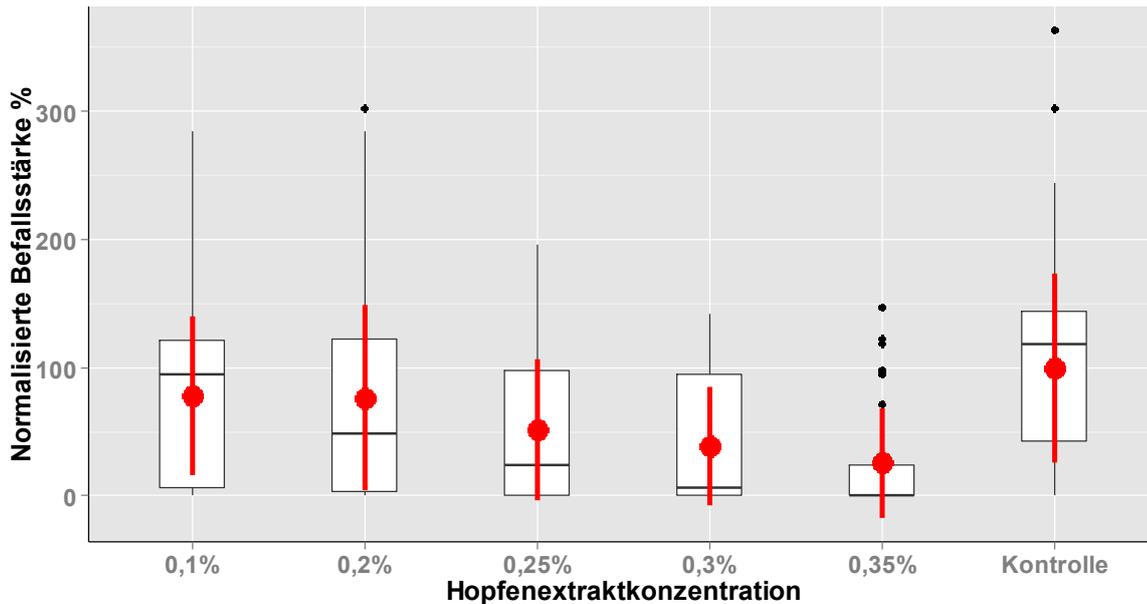


Abbildung 12 Zusammenfassung des Tests der protektiven Wirkung des Hopfenextrakts RV0407-51 auf Blattscheiben. Gezeigt wird die auf den Mittelwert der zugehörigen Kontrolle normalisierte Befallsstärke 5 Tage nach der Inokulation in Prozent als die Datenverteilung widerspiegelnder Boxplot und als Mittelwert mit Standardabweichung (roter Punkt mit Balken). Angegeben sind hier der prozentuale Anteil der Hopfenextrakt Stammlösung (40%) nicht die absolute Konzentration. n=108

Das Fazit aus diesen Experimenten ist, dass der Extrakt RV0407-51 in den Blattscheibenversuchen eine protektive Wirkung gegen *P. viticola* zeigt.

## PROTEKTIVE LANGZEITWIRKUNG

Da die Bestandteile des Hopfenextraktes flüchtig sein können, wurden Versuche gemacht um eine protektive Langzeitwirkung nachzuweisen.

Hier zeigten die mit Hopfenextrakt behandelten Blätter eine Woche nach der Behandlung keine reduzierte Befallsstärke mehr (Abb. 13). Die Befallshäufigkeit war jedoch etwas niedriger als bei unbehandelten Blättern. Das Vergleichsmittel Folpan reduzierte im Gegensatz zum Hopfenextrakt die Befallshäufigkeit um mehr als das Achtfache und die Befallsstärke um das Sechsfache gegenüber der Kontrolle.

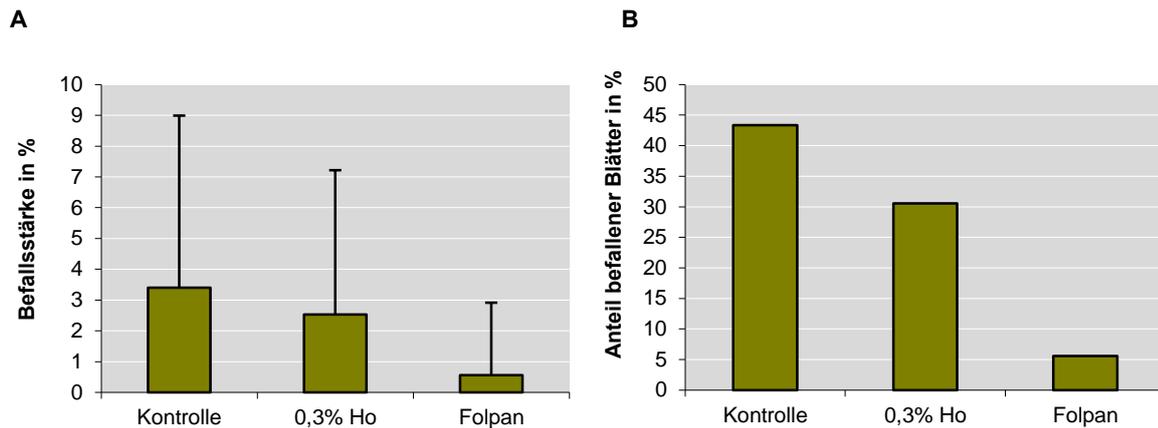


Abbildung 13 **A** Befallsstärke und **B** Befallshäufigkeit bei einer Infektion 7 Tage nach der Wirkstoffapplikation mit Standardabweichung. Es wurde eine 0,3% Hopfenextraktlösung (Ho) der Stammlösung verwendet was einer absoluten Konzentration von 0,12% bzw. 0,14% Ho entspricht.

## SYSTEMISCHE WIRKUNG

Die Versuche zur systemischen Wirkung von Hopfenextrakt wurden an ganzen Pflanzen durchgeführt, indem nur ein Teil der Belaubung behandelt, aber die gesamte Pflanze infiziert wurde. Erfolgte die Infektion noch am Tag der Behandlung, zeigten beide Konzentrationen des Hopfenextrakts in allen Versuchen eine protektive Wirkung auf den behandelten Blättern (Abb. 14a, 14c, 14e).

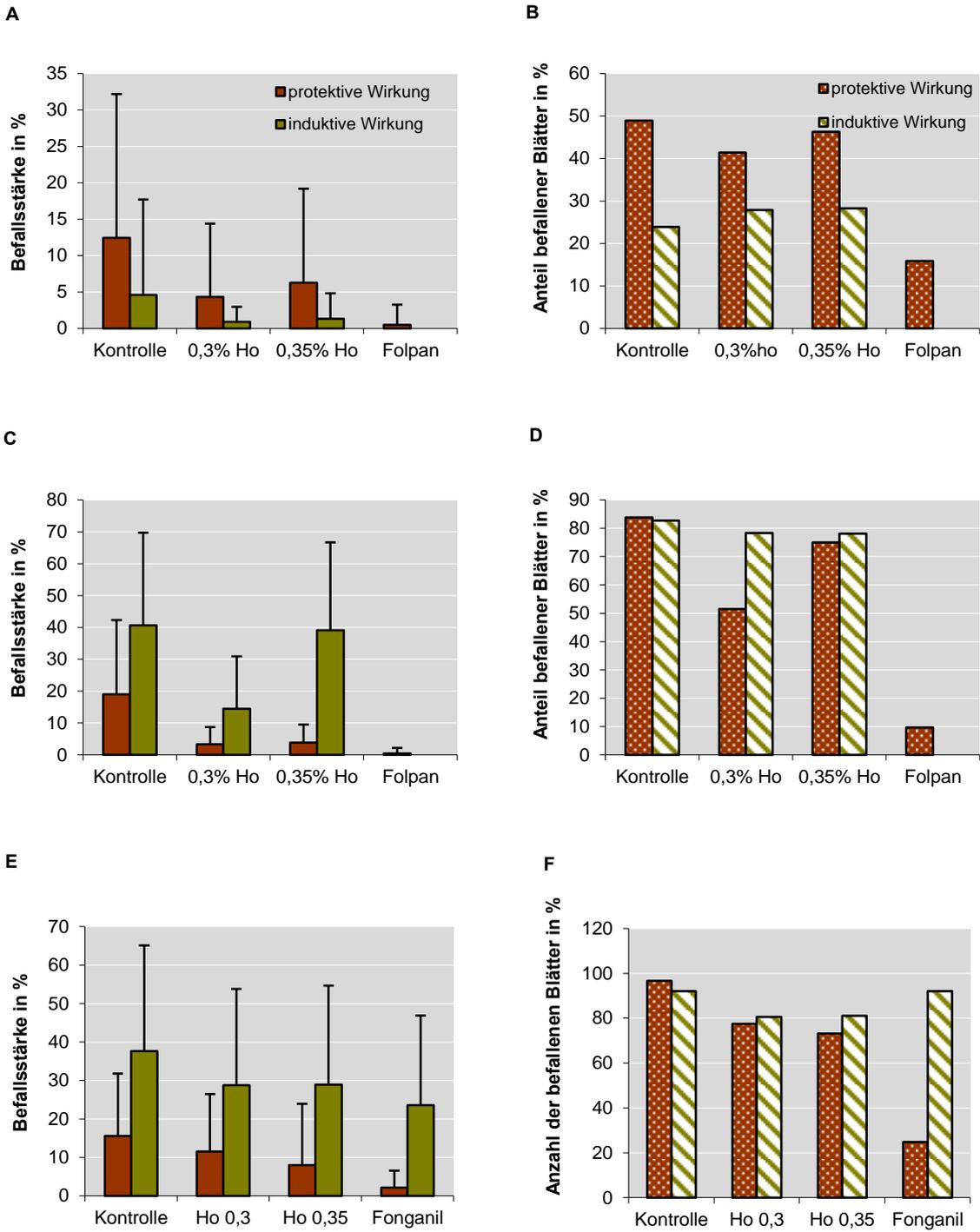


Abbildung 14 Versuch zur systemischen Abwehr von *Plasmopara viticola* für eine Infektion am Tag der Applikation. Für alle drei Versuchsdurchgänge **A**, **C**, **E** ist die Befallsstärke in % mit Standardabweichung angegeben. Zu jedem Versuchsdurchgang ist die Befallshäufigkeit in % zugeordnet **B**, **D**, **F**. Es wurde eine 0,3%iger und 0,35%iger Hopfenextraktlösung (Ho) der Stammlösung verwendet, was einer absoluten Konzentration von 0,12% bzw. 0,14% Ho entspricht. Vergleichsmittel war in den ersten 2 Versuchen **A**, **B**, **C**, **D** das protektive Mittel Folpan bei dem keine systemische Wirkung auftritt, weswegen auch nicht berücksicht-

sichtigt wurde. Im 3. Versuch (e, f) wurde das systemische Vergleichsmittel Fonganil verwendet

Die Befallshäufigkeit wurde dabei, verglichen mit dem Vergleichsmittel, nur marginal reduziert (Abb., 14b, 14d, 14f). Bei der Betrachtung der induktiven Reaktion fällt auf, dass im ersten Versuch (Abb. 14a) der Befall und somit vermutlich der Pathogendruck mit  $< 5\%$  sehr niedrig war. Die mit Hopfenextrakt behandelten Pflanzen zeigten Befallswerte deutlich unter der Kontrolle. Die Befallshäufigkeit (Abb. 14b) wurde dabei nicht reduziert. Im zweiten Versuch (Abb. 14c) zeigte nur die 0,3%ige Hopfenlösung einen geringeren Befall als die Kontrolle. Aber auch hier präsentierten sich die Befallshäufigkeiten unverändert (Abb. 14d). Im dritten Versuch wiederholten sich diese Ergebnisse. Abbildung 10e zeigt nur marginal verringerte Befallsraten bei der Hopfenapplikation sowie dem eigentlich systemischen Vergleichsmittel bei unveränderter Befallshäufigkeit.

Erfolgte die Infektion einen Tag nach der Behandlung (Abb. 15a-f) zeigte der Hopfenextrakt keine Befallsreduktion durch eine protektive Wirkung. Einzig im dritten Versuch (Abb. 15f) kam es zu einer Reduktion der Befallshäufigkeit. Die Ergebnisse aus dem zweiten Versuch (Abb. 15c) zeigten hingegen eine erhöhte Befallsstärke auf Blättern nach vorheriger Behandlung mit 0,35%iger Hopfenextraktlösung. Das protektive Vergleichsmittel Folpan verringerte die Befallsstärke und die Befallshäufigkeit zuverlässig in allen Versuchen.

Die unbehandelten Blätter zeigten nur im zweiten Versuch (Abb.15) eine reduzierte Befallsstärke im Vergleich zur Kontrolle, jedoch eine gleich bleibende Befallshäufigkeit (Abb. 15d). Im ersten und dritten Versuch kam es zu keiner Reduktion der Befallsstärke (Abb. 15a, 15e) oder Befallshäufigkeit (Abb. 15b, 15f). Einzig das Vergleichsmittel Fonganil zeigte im dritten Versuch eine deutliche Reduktion von Häufigkeit (Abb. 15f) und Stärke des Befalls (Abb. 15e).

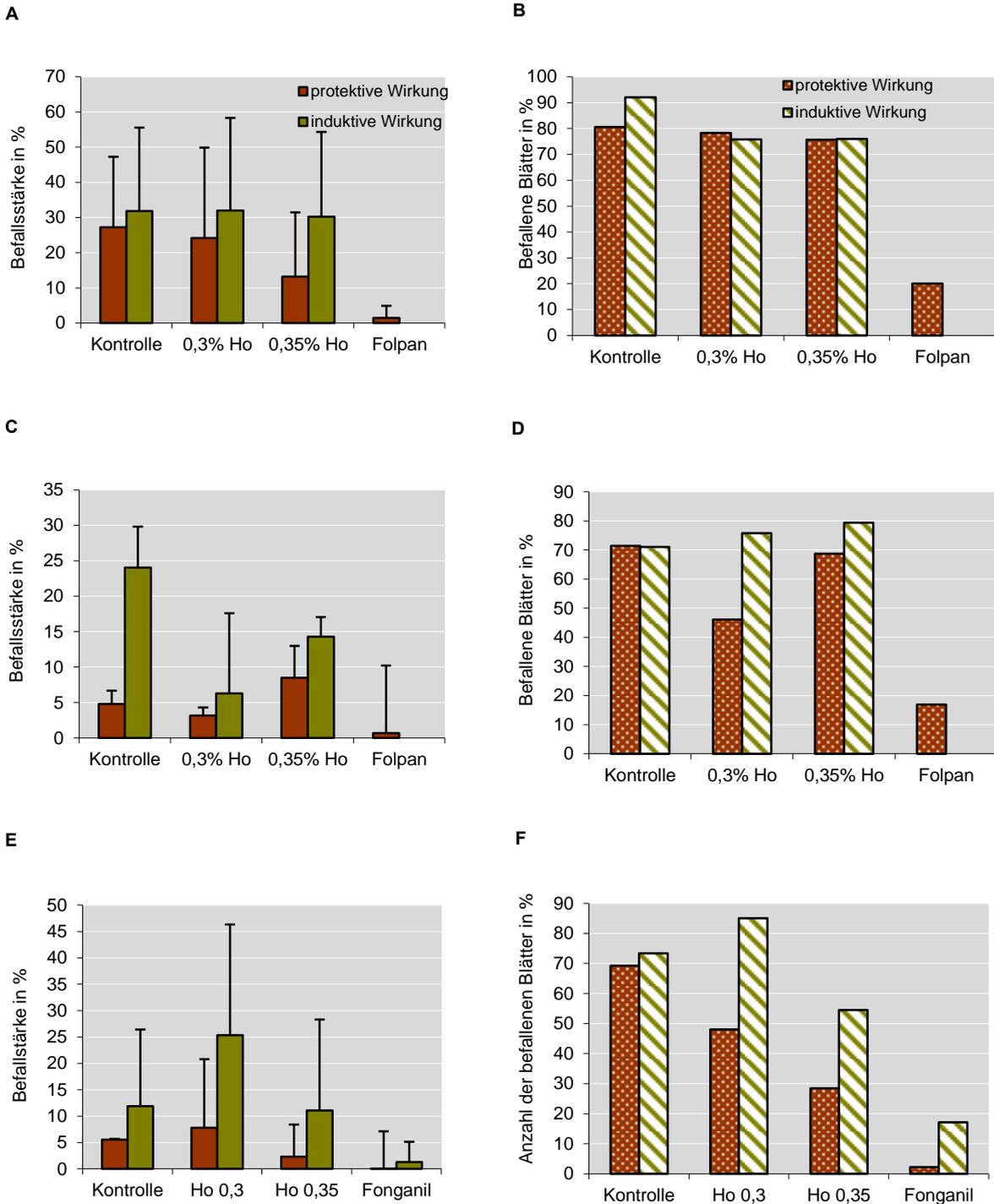


Abbildung 15 Versuch zur systemischen Abwehr von *Plasmopara viticola* für eine Infektion einen Tag nach der Applikation. Für alle drei Versuchsdurchgänge **A**, **C**, **E** ist die Befallsstärke in % mit Standardabweichung angegeben. Zu jedem Versuchsdurchgang ist die Befallshäufigkeit in % zugeordnet **B**, **D**, **F**. Es wurde eine 0,3%iger und 0,35%iger Hopfenextraktlösung (Ho) der Stammlösung verwendet was einer absoluten Konzentration von 0,12% bzw. 0,14% Ho entspricht. Vergleichsmittel war in den ersten 2 Versuchen **A**, **B**, **C**, **D** das protektive Mittel Folpan bei dem keine systemische Wirkung auftritt, weswegen sie auch nicht berücksichtigt wurde. Im 3. Versuch **E**&**F** wurde das systemische Vergleichsmittel Fonganil verwendet.

Daraus lässt sich schließen, dass die wirksamen Komponenten des Hopfenextrakts entweder leicht flüchtig sind und nach einem Tag abdampfen oder von der Pflanze aufgenommen und verstoffwechselt werden.

Für Mai 2014 ist eine Bachelorarbeit mit verkapseltem Hopfenextrakt geplant, die dies, leider bereits außerhalb der Laufzeit des BÖLN Projektes, weiter untersuchen wird.

---

### TEMPERATURABHÄNGIGE WIRKUNG VON KUPFER

---

Um zu testen, ob die Wirkung von Kupfer auch durch die Temperatur beeinflusst wird wurden *in vivo* Experimente mit Zoosporen durchgeführt. Hierbei wurden die Sporen nach 10 min Einwirkzeit unter dem Mikroskop beobachtet. Die Boniturklassen entsprechen denen aus Tabelle 1.

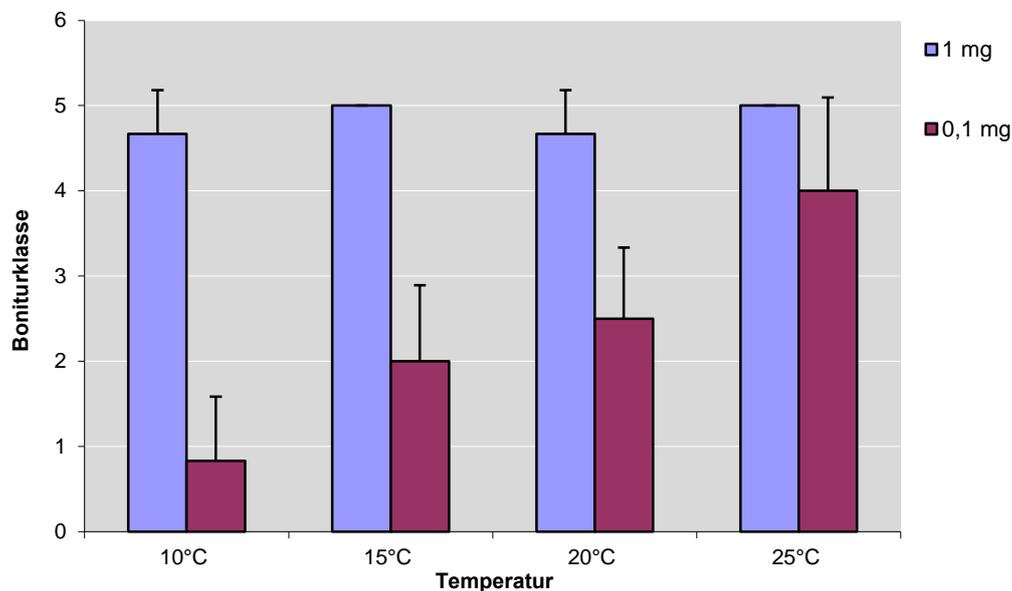


Abbildung 16 Einfluss der Temperatur auf die Letalität von Kupfer; Versuch mit Einzelsporen von *Plasmopara viticola*. Boniturklassen in diesem Versuch entsprechen denen aus Tabelle 1. Die Mengenangaben entsprechen mg Kupfer pro Liter Flüssigkeit. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der Boniturklassen. Bei 15°C/25 und 1mg Kupfer pro Liter waren in allen Replikaten alle Sporen geplatzt, weshalb keine Standardabweichung vorhanden ist.

Hierbei stellte sich heraus, dass bei geringen Konzentrationen wie 0,1mg Kupfer/l eine klare Abhängigkeit der Wirkung von der Temperatur zu beobachten war. Bei niedrigen Temperaturen zeigen sich bei geringen Kupfermengen keine Auswirkungen auf das Verhalten der Zoosporen, während bei höheren Temperaturen (20°C+) die Zoosporen eine Reaktion auf das zugegebene Kupfer zeigen. Aber erst ab 25°C kann man davon ausgehen, dass ein Großteil der Zoosporen abstirbt.

## 4.2 FORMULIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES TESTPRÄPARATS (2012-2013)

---

Nachdem aus den Versuchen mit Kupfersulfat klar war, dass die freigesetzten Kupferionen, die größte Rolle bei der Wirksamkeit spielen und schon kleine Mengen ausreichen können um Zoosporen abzutöten (Abb. 5, 7, 16), stellte sich die Frage der Formulierung. Da leicht lösliche Salze auch leicht abzuwaschen sind, waren die meisten üblichen Formulierungen, die aus zugesetzten Netz- und Haftmitteln bestehen nicht geeignet. Eine Verkapselung in Fettkapseln war in unserem Fall die Lösung dieses Problems. Der Lehrstuhl für Prozessmaschinen und Anlagentechnik der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg und die daraus entstandene Firma Agrolytix GmbH hatten bereits Erfahrung mit dieser Technik und waren zu einer Kooperation für dieses Projekt bereit. Aus dieser Zusammenarbeit entstand unser Testpräparat: die CuCaps. Dies sind Fettkapseln, die mit einer Kupfersulfatlösung beladen wurden, um eine Suspension mit Wasser herzustellen wurden die Kapseln dann mit einem Tensid (Dehydol) versetzt.

---

### 4.2.1 VERBESSERUNG DER EIGENSCHAFTEN UND FREISETZUNGSKINETIK DER CUCAPS

---

Die Agrolytix GmbH hat während der gesamten Projektdauer laufend Chargen der Kapseln analysiert und einer stetigen Verbesserung unterzogen. In Abbildung 17A sieht man ein Beispiel hierfür. Im Prozess der Herstellung werden immer wieder die Kapselgrößen der Chargen geprüft. Das WBI hat entsprechende Chargen getestet und auch in vivo Aufnahmen der CuCaps auf Blättern und in Interaktion mit dem Pathogen gemacht (Abb. 17 B, C, D).

In diesen Aufnahmen sieht man auch, dass es sich bei der Verkapselung nicht um einen Hohlkörper handelt, der mit Kupfersulfat angefüllt ist, sondern durch die verwendete Technik erhält man einen Fettpartikel, der mit Kristallnadeln des Kupfersulfats gleichmäßig durchsetzt ist (Abb. 17D an den Sternchen). In Abbildung 17C und D sind neben leeren bzw. stark dehydrierten Sporangien (Abb. 17D roter Pfeil) auch granulatartige Partikel zu sehen, bei denen es sich um die Zellinhalte der geplatzen Zoosporen handeln könnte.

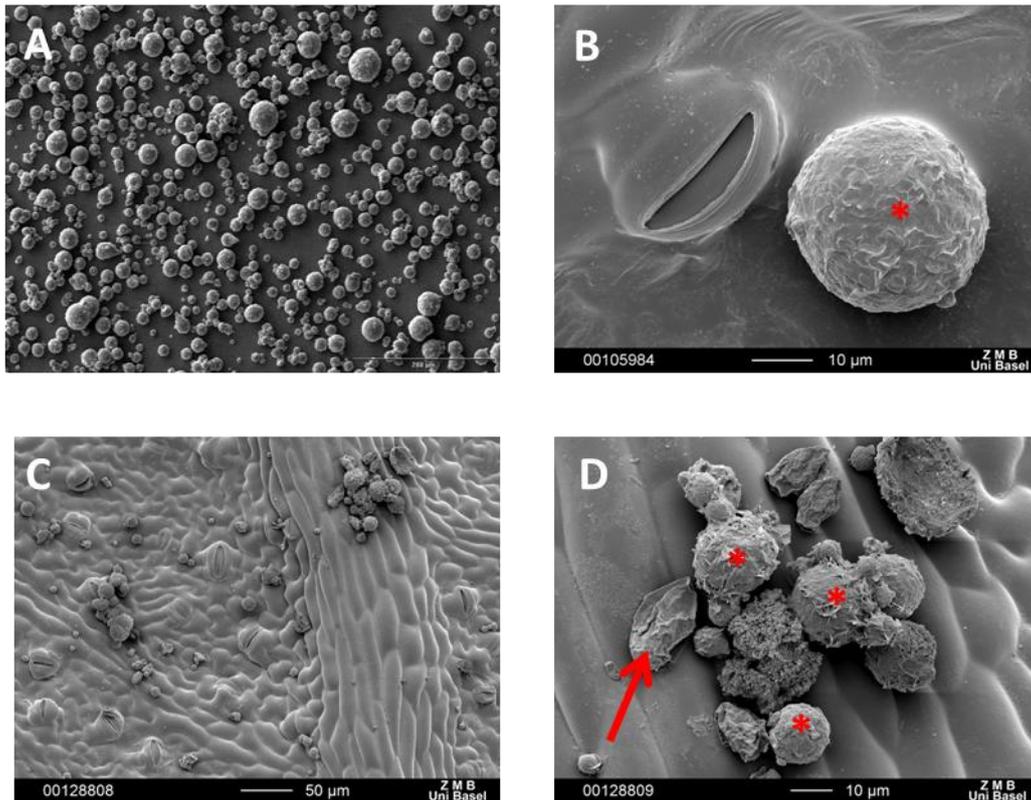


Abbildung 17 **A:**Verteilung von CuCaps auf einem elektronenmikroskopischen Probenhalter. Die Agrolytix GmbH misst auf diese Weise Partikelgrößen aus um die ideale Größenverteilung zu erhalten. **B:** Eine frühe Kapselcharge auf einem *Vitis vinifera* cv Müller Thurgau Blatt (\*=CuCap) direkt neben einem Stomata **C & D:** CuCaps auf einem *Vitis Vinifera* cv Müller Thurgau Blatt mit zusätzlicher Infektion durch *Plasmopara viticola*. Der Pfeil markiert ein ausgetrocknetes Sporangium des Oomyceten. A Freundlicherweise von Dr. Stefan Schwab zur Verfügung gestellt, B, C und D wurden in Zusammenarbeit mit dem ZMB der Universität Basel aufgenommen.

Nach ersten Ergebnissen der Freilandversuche 2012 (Vgl. 4.2.2) aus Hopfen und Apfelbau wurde die Freisetzungskinetik des Kupfersulfatpentahydrats aus den Kapseln durch die Fa. Agrolytix GmbH bestimmt und über Zugabe von Mischstoffen verlangsamt um eine bessere Wirkung und eine langsamere Freisetzung der Cu-Ionen zu erhalten.

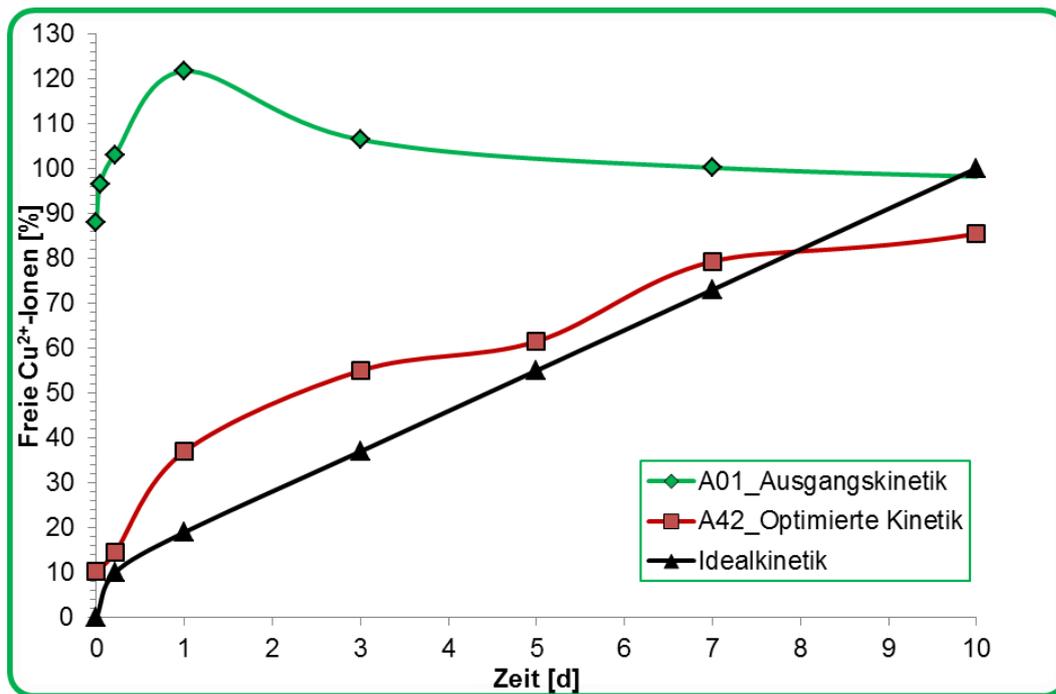


Abbildung 18 Freisetzungskinetik von Kupferionen aus den Fettkapseln(CuCaps). A01 stellt die Freisetzungskinetik aus dem Jahr 2012 dar A42 die optimierte Kinetik, die schwarze Linie stellt eine Ideal-Kinetik dar. Darstellung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Schwab (Agrolytix GmbH)

Man sieht in Abb. 18 einen Vergleich der ersten Kapselcharge (grüne Linie) zu einer optimierten Kapselcharge (rote Linie). Es handelt sich bei dem oben verwendet Verfahren um ein Verfahren in dem für jeden Zeitpunkt ein separates Replikat angesetzt wurde, dadurch ergibt sich eine größere Variation der Daten. Die Retentionszeit des Kupfers in den Kapseln wurde im Endeffekt nach der durchschnittlichen Blattbenetzungsdauer in unseren Breiten berechnet. Inzwischen liegt die Freisetzungsdauer der Kapseln bei 80% des Gesamtgehaltes nach 5-7 Tagen Blattnäse.

#### 4.2.2 FREILANDVERSUCHE 2012 (DATEN VON KOOPERATIONSPARTNERN)

Im Jahr 2012 wurde erste Freilandversuche mit den CuCaps geplant und durchgeführt. Es wurden Versuche im Weinbau, im Hopfenbau (von Dr. Florian Weihrauch von der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) im Rahmen seines eigenen BÖLN Projekts) und im Obstbau (von Dr. Christian Scheer vom Kompetenzzentrum Obstbau (KOB) in Bavendorf, ebenfalls im Rahmen seiner eigenen Projekte) durchgeführt.

Im Weinbau musste der Versuch nach drei Spritzungen abgebrochen werden, da das Gemisch bei dem, von der Mittelprüfung verwendeten Parzellen-Applikationsgerät zum Verstopfen der Düsen führte und sich nicht ausbringen ließ, vergleiche auch Abbildung 2.

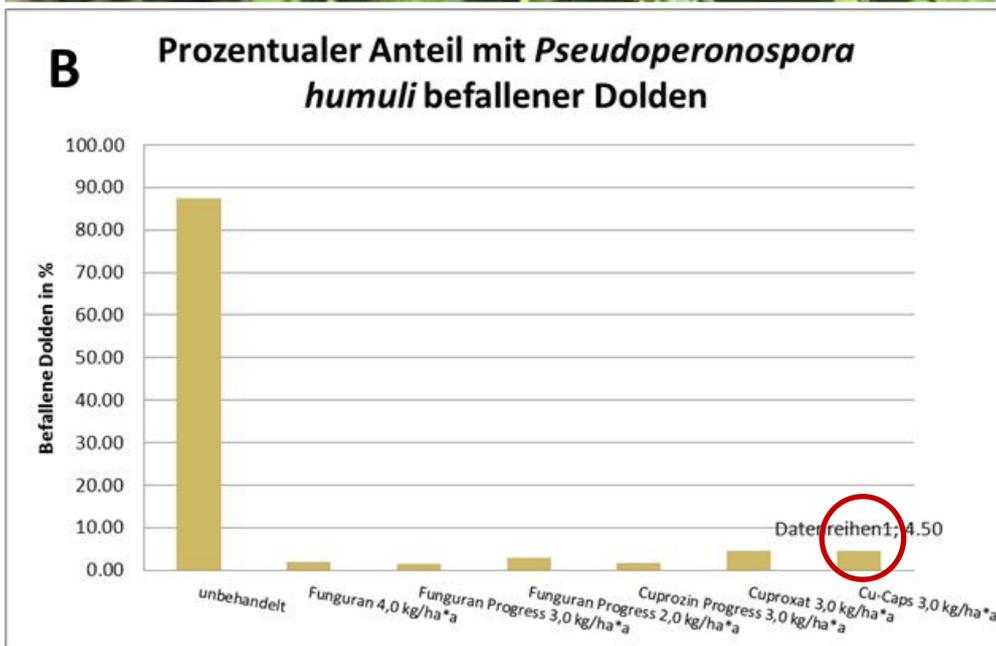


Abbildung 19 **A**: Phytotoxizitätsreaktion von Hopfen auf die erste Testcharge der CuCaps. Die roten Pfeile zeigen auf die großflächigen Nekrosen. **B**: Prozentualer Anteil der Befallenen Dolden im Freilandversuch des LfL. Der rote Kreis markiert die Versuche mit den CuCaps. Abbildung wurde von Dr. Florian Weihrach freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Im Hopfenbau ließ sich das Mittel mit den verwendeten Praxisgeräten ausbringen, es kam allerdings an den Pflanzen zu einer sogenannten Phytotoxizitätsreaktion (Phytotox) bei der große Teile der Blattfläche abstarben (Abb. 19A). Das Mittel wurde dennoch verwendet und lieferte in der Vegetationsperiode 2012 im Hopfenbau gute Ergebnisse. In Abb. 19 B sieht man, dass es trotz der schweren Phytotox in den Blättern zu einer, den gängigen kupferhaltigen Spritzmitteln äquivalenten Wirkung kam. Am Ende der Saison wurde allerdings in den Versuchen mit den CuCaps eine ge-

ringere Doldenmenge gewogen, was auf die Schädigung der Pflanzen durch das Mittel zurück zu führen ist (persönliche Mitteilung von Dr. Florian Weihrauch).

Im Apfelbau wurde das Mittel ohne auffallende Reaktionen der Bäume gegen den Erreger des Feuerbrands *Erwinia amylovora* eingesetzt. Auch hier zeigte sich eine gute Wirkung des Präparats (persönliche Mitteilung von Dr. Christian Scheer).

### 4.2.3 EIGENSCHAFTEN DER 2013ER KAPSELCHARGE CUCAPS

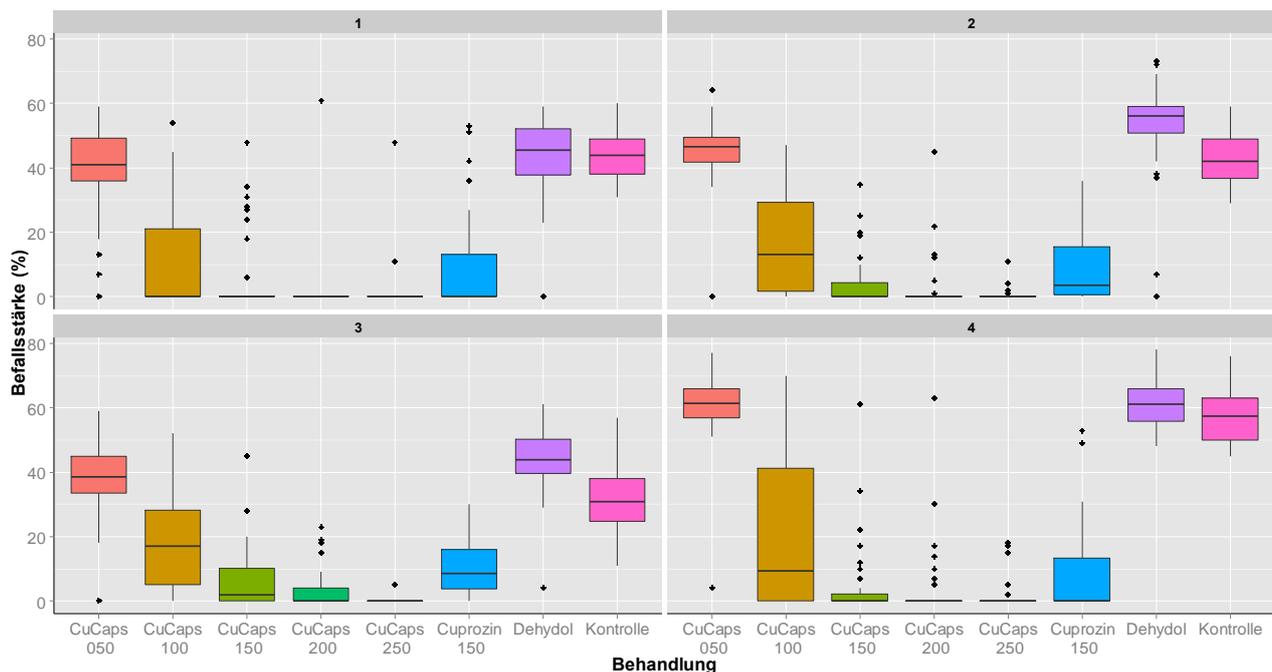


Abbildung 20 Befallsstärke der *P. viticola* Infektion von Blattscheiben 7 Tage nach der Inokulation mit den Sporangien des Pathogen bei unterschiedlichen Behandlungen. Übersicht über die 4 Einzelversuche (obere Reihe von links nach rechts Versuch 1 und 2, untere Reihe von links nach rechts Versuch 3 und 4), Diese Versuche wurden zur Berechnung der Effizienz herangezogen. n=36/Versuch

Die Kapselcharge A65 war eine der ersten Chargen mit der verbesserten Freisetzungskinetik, die auch für die Freilandversuche eingesetzt wurde. Charakterisiert wurde sie durch Blattscheibentests mit unterschiedlichen Aufwandmengen und Atomabsorptionsspektroskopie. Abbildung 20 zeigt eine Übersicht über die Befallsstärke von *P. viticola* auf den Blattscheiben von *Vitis vinifera* cv. Müller Thurgau aller Versuche im Vergleich. Alle Versuche zeigen konsistent eine Abnahme der Befallsstärke mit zunehmenden Kupferaufwandmengen. Das Vergleichsmittel und die Kontrollen variieren nur leicht zwischen den normalisierten Versuchen.

Um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten und Rückschlüsse auf reale Kupfermengen zuzulassen wurden während aller Experimente leere Platten ebenfalls mit eingesprützt und der Kupfer-Belag auf diesen dann mittels Atomabsorptionsspektroskopie quantifiziert (Abb. 21).

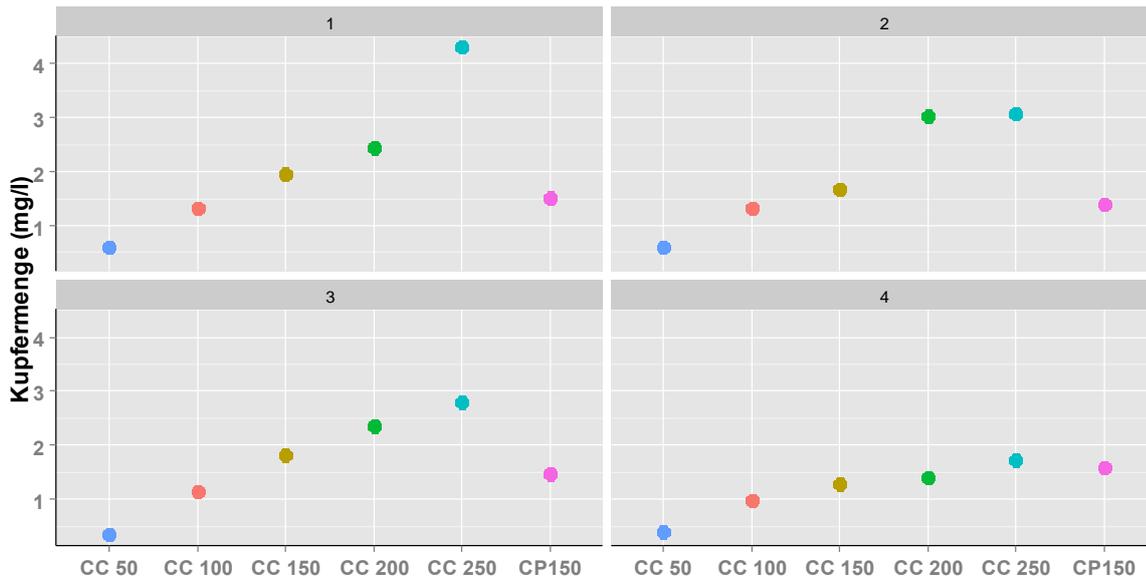


Abbildung 21 Kupfermengen auf den einzelnen 144 cm<sup>2</sup> Platten gemessen mittels Atomabsorptionsspektroskopie. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei technischen Wiederholungsmessungen. Kupfermengen sind in mg Kupfer pro Liter aufgetragen. Die Zahlen neben den Substanzbezeichnungen geben die in der Spritzbrühe angesetzte Menge an aktiven Ionen in mg/l wieder. CC=CuCaps; CP=Cuprozin progress

In Abb. 21 wird deutlich, dass die Kupfermengen, die mit den CuCaps ausgebracht werden stärker variieren als die des zugelassenen Präparats. Gerade im vierten Versuch kam es laut AAS Messung zur Ausbringung geringerer Mittelmengen, was sich von der Befallsstärke allerdings nur in der Aufwandmenge der 50 und 100 mg/l zeigt (Abb. 20).

Aus den Befallsdaten wurde der Wirkungsgrad der CuCaps berechnet. Dieser zeigt an wie gut die Wirkung des eingesetzten Stoffes ist: 0% bedeutet, dass keinerlei Wirkung im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten ist während 100% bedeutet, dass es zu keinerlei Wachstum des Pathogenes kam. Negative Werte deuten darauf hin, dass eine Behandlung das Pathogenwachstum begünstigen könnte.

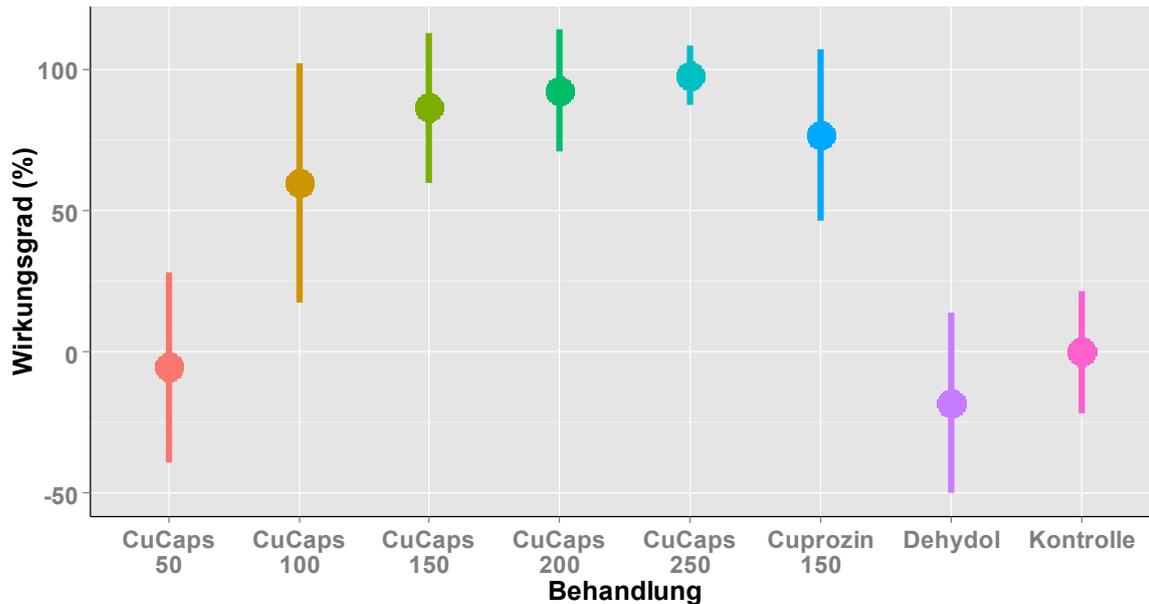


Abbildung 22 Effizienz der CuCaps Charge A65 in unterschiedlichen Dosierungen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils 4 normalisierten und verrechneten Versuchen. Als Kontrollen dienen Cuprozin progress, Dehydol, das den CuCaps zugesetzte Tensid, und eine unbehandelte Kontrolle.

In Abb. 22 sieht man die Ergebnisse für die 2013er Charge der CuCaps (A65). Für diese CuCaps Charge hat eine Aufwandmenge von 50 mg(ai)/l noch keinerlei Wirkung auf die Infektion mit *Plasmopara viticola*, während bereits 100 mg(ai)/l bereits einen Wirkungsgrad von über 50% hat, sprich die Befallsstärke ist in etwa bei der Hälfte der Kontrolle. Im Vergleich zu Cuprozin progress flüssig sieht man bei 150 mg(ai)/l Konzentration eine leicht besseren Wirkungsgrad der CuCaps in der gleichen Aufwandmenge, 86% im Vergleich zu 76%. Der höhere Wirkungsgrad erklärt sich aus den höheren Kupfermengen, die mittels der CuCaps auf die Blätter ausgebracht wurden (Abb. 21). Gleichzeitig ist ersichtlich, dass das verwendete Tensid keine Eigenwirkung auf das Pathogen hat, sondern eher dem Wachstum des Pathogens förderlich erscheint.

---

#### 4.2.4 ABWASCHSTABILITÄT DER CUCAPS

---

In Abbildung 23 sieht man wie die Adhäsion einer Kupferkapsel an ein Weinblatt begünstigt durch warme Temperaturen aussieht.

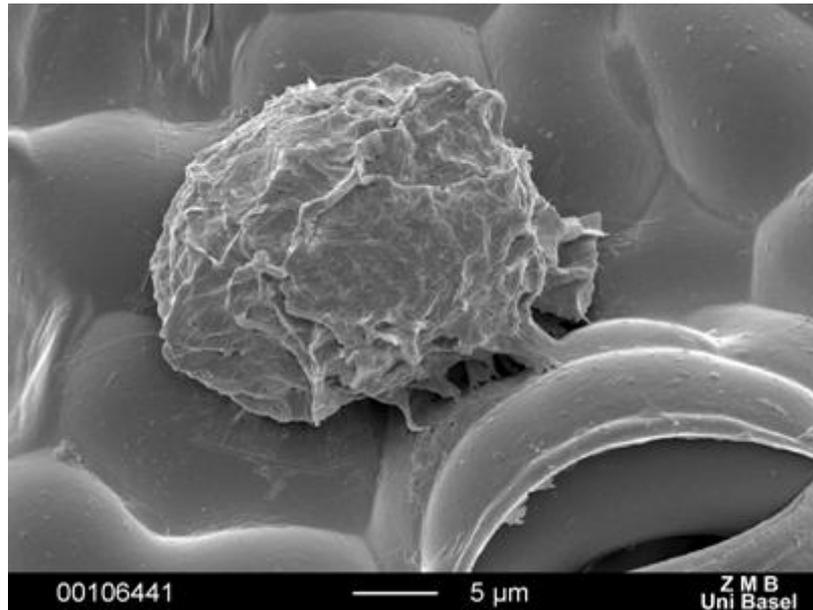


Abbildung 23 Adhäsion einer Kupferkapsel(CuCap) an ein Weinblatt der Rebsorte Müller-Thurgau nach Einwirkung von erhöhten Temperaturen (35°C) unter dem Kryorasterelektronenmikroskop.

Man sieht in der Rasterelektronenmikroskop Aufnahme, dass eine erhöhte Temperatur, wie sie im Freiland im Sommer auftritt, die Fettkapseln leicht zum Anschmelzen bringt und diese sich dann auf den Oberflächenwachsen des Blatts verankern.

Um die Haftfähigkeit der CuCaps auszutesten wurden Abwaschversuche durchgeführt. Hierbei wurden Blätter mit den CuCaps und einem kommerziell erhältlichen Vergleichsprodukt (Cuprozin progress flüssig) behandelt. Die Versuche wurden komplett bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach der Behandlung wurden die Blattscheiben in Wasser getaucht und danach getrocknet um eine komplette Blattbenetzung und Abtrocknung zu simulieren. Hierbei zeigte sich (Abb. 24), dass sich die CuCaps wie das fertig formulierte Vergleichsmittel verhalten.

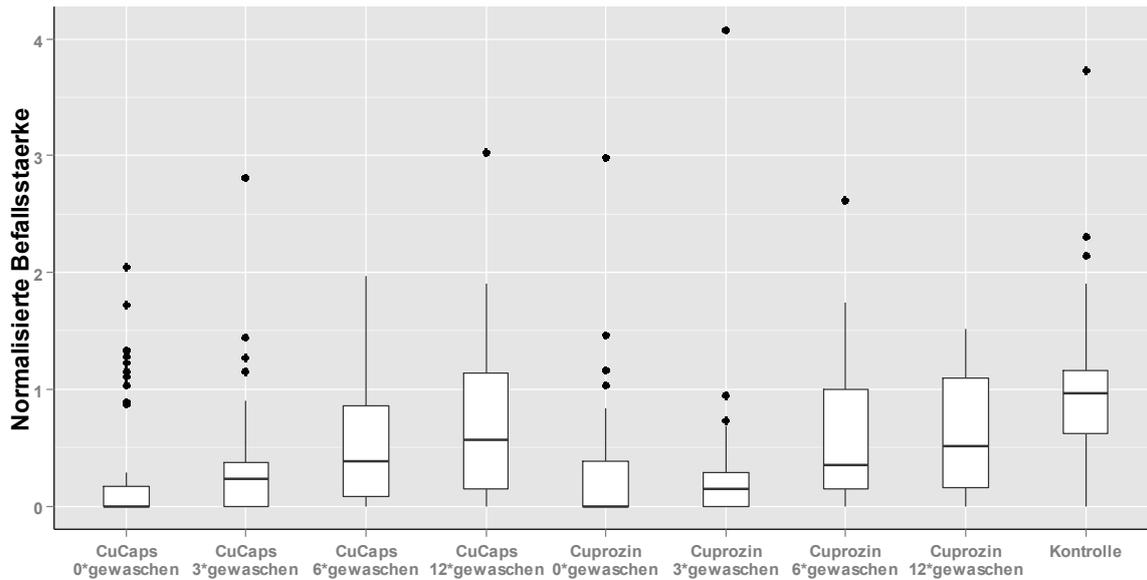


Abbildung 24 Normalisierte Befallsstärke der Infektion mit *P. viticola* von gewaschenen und ungewaschenen Blattscheiben 5 Tage nach der Inokulation: Boxplot der drei Wiederholungen zusammengefasst. Es wurden für diesen Versuch große Blattscheiben mit 2.5 cm Durchmesser verwendet. n=36

Ein Anstieg der Befallsstärke der Blattscheiben ist sowohl bei den CuCaps als auch bei dem Vergleichsmittel zu sehen. Doch selbst 12-mal gewaschene Blattscheiben zeigen immer noch eine, im Vergleich zur Kontrolle, geringere Befallsstärke.

#### 4.2.5 GEWÄCHSHAUSVERSUCHE

Es wurden parallel Versuche im Gewächshaus an ganzen Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt, um die CuCaps detaillierter zu charakterisieren.

Es zeigte sich, dass eine Aufwandmenge von 50 mg(ai)/l nicht ausreicht um eine Wirkung zu erzielen (Abb. 25B). Wie auch in den Freilandversuchen sah man, dass sich die Infektionsstärken und Häufigkeiten von CuCaps und Cuprozin progress in etwa entsprachen, allerdings stellte sich heraus, dass mit CuCaps gespritzte Blätter etwas weniger Nekrosen entwickelten (Abb. 26).

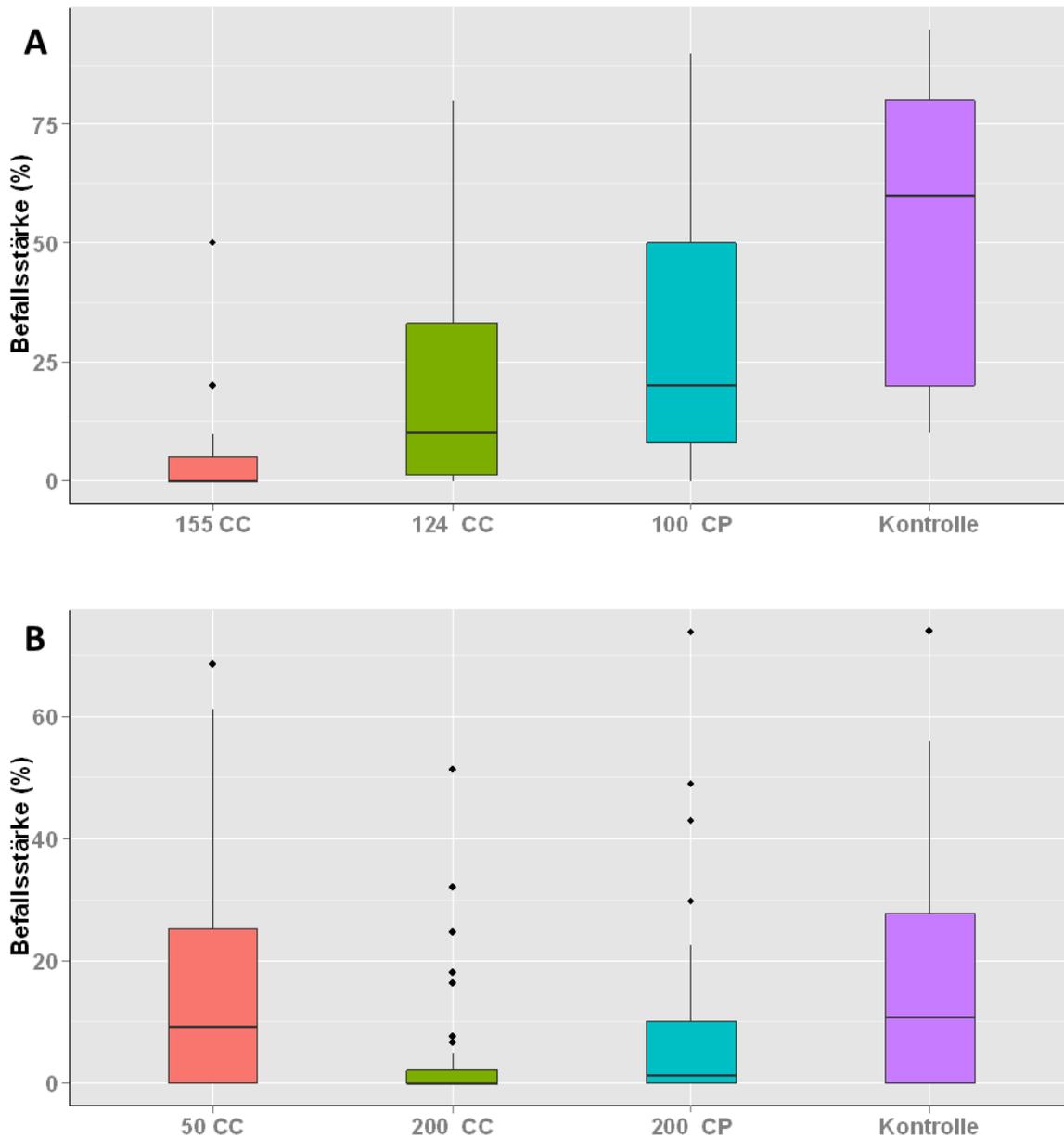


Abbildung 25 Befallsstärke ganzer Blätter 7 Tage nach Inokulation mit *P. viticola* im ersten (A) und im zweiten (B) Topfpflanzenversuch. Dargestellt als Boxplot. Die Blätter wurden nach der Inkubationszeit abgenommen und fotografiert, die Befallsstärke wurde digital ausgemessen. CC= CuCaps; CP= Cuprozin progress. Zahlen entsprechen den Mengenangaben in mg(ai)/l. n>28

Man sieht in Abbildung 25 B, dass sich die Befallsstärke in diesem Versuch zwischen der geringen Konzentration an CuCaps und der Kontrolle nicht unterscheidet. Die höhere Konzentration zeigt einen Effekt auf die Befallsstärke. Im ersten Topfpflanzenversuch wurden nicht gleiche Mengen

von CuCaps und Cuprozin progress ausgebracht, weshalb die Ergebnisse nicht ganz mit dem zweiten Topfpflanzenversuch vergleichbar sind.

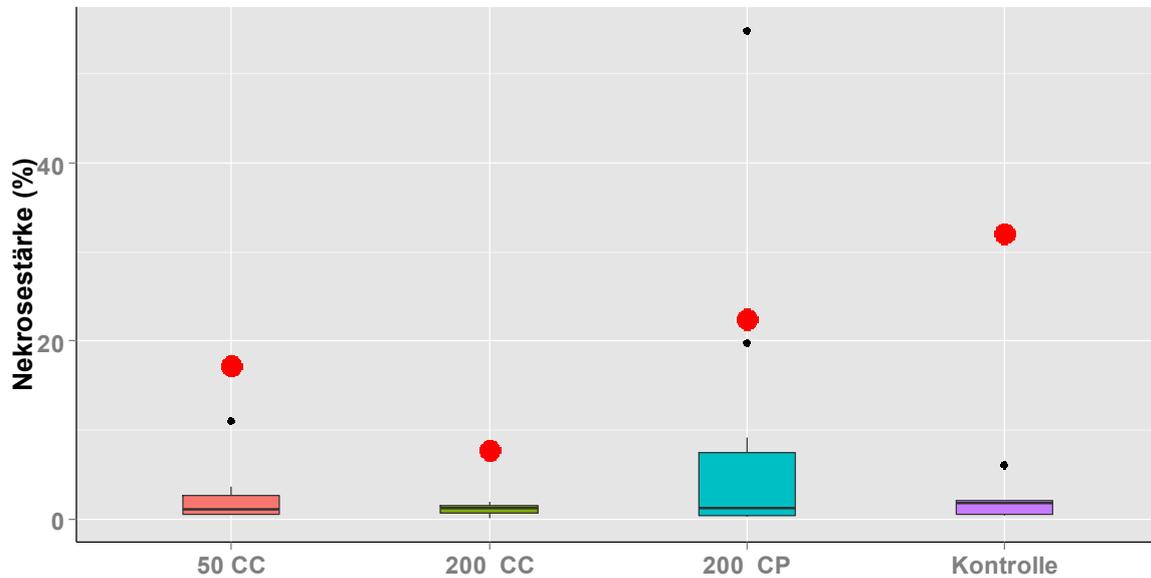


Abbildung 26 Nekrosehäufigkeit und Stärke in Prozent 7 Tage nach Inokulation mit *P. viticola*. Rote Punkte ohne Fehlerbalken entsprechen den Nekrosehäufigkeiten, die Boxplots entsprechen den Nekrosetärken. CC= CuCaps; CP= Cuprozin progress. Zahlen entsprechen den Mengenangaben in mg(ai)/l. n >28 Blätter.

In Abbildung 26 sind die zu Abbildung 25B gehörenden Nekrosehäufigkeiten und -stärken für denselben Versuch dargestellt. Hierbei sieht man einen Effekt der Kupferbehandlungen auch auf Nekrosehäufigkeit, wobei die CuCaps einen stärkeren Effekt zu haben scheinen als das Vergleichsmittel.

#### 4.2.6 SPRITZSTRATEGIE

Im Freilandversuch 2013 wurde folgende Strategie für die Spritzung der CuCaps entwickelt: Vor der Blüte wurde enge Spritzabstände von sieben bis zehn Tagen gewählt, wenn ein hohes Infektionsrisiko durch das Prognosemodell VitiMeteo-Rebenperonospora vorhergesagt wurde (<http://www.vitimeteo.de/pero/pero.shtml>). Nach der Blüte wurden die Spritzintervalle vergrößert auf bis zu 14 Tage, wenn die Wetterlage gut war und das Infektionsrisiko gering. So wurden in diesem Versuch für die volle Aufwandmenge 1,8 Kilogramm Reinkupfer pro Hektar und Jahr ausgebracht und für die reduzierte Menge der CuCaps 1,2 Kilogramm Reinkupfer pro Hektar und Jahr (Tabelle 2). Die geplanten Aufwandmengen wurden anhand einer maximalen Anzahl an Spritzun-

gen berechnet, die erlaubt gewesen wären. Allein über die entsprechende Strategie konnten wir etwa ein Drittel der Spritzmittelmenge einsparen.

Tabelle 2 Gesamtaufwandmengen an Reinkupfer pro Hektar und Jahr im Freilandversuch 2013, die geplanten Werte entsprechen den maximal zugelassenen Aufwandmengen, die ausgebracht worden wären, wenn die Witterung konstant schlecht gewesen wäre.

	<b>Cuprozin progress</b>	<b>CuCaps</b>	<b>CuCaps</b>	<b>Kontrolle</b>
Aufwandmenge (Reinkupfer pro Jahr)	3 kg/ha (geplant) Real:1,8	3 kg/ha (geplant) Real:1,8	2 kg/ha (geplant) Real 1,2	0 Real 0,2
Rebsorte	Scheurebe	Scheurebe	Scheurebe	Scheurebe
Versuchspartzellen	3	3	3	9

In der folgenden Abbildung ein Überblick über das Jahresklima 2013, das vorhergesagte Peronospora Risiko und das phänologische Entwicklungsstadium sowie die Blattanzahl der Reben. Man sieht, dass 2013 der Austrieb etwas später als üblich erfolgte und dass, bedingt durch den verregneten Mai, auf jeden Fall Primärinfektionen mit dem Falschen Mehltau stattfanden. Während der Saison selbst gab es zwar ab und zu vorhergesagte Infektionen, im Vergleich zu anderen Jahren war zwar Pathogendruck durch *P. viticola* vorhanden, hielt sich aber im Rahmen (Abb. 27). Aus diesem Grund wurde Anfang Juli, als durch die Epidemieverhebungen klar wurde, dass sich noch kein Befallsdruck in der Versuchsanlage aufgebaut hatte, eine künstliche Infektion gesetzt (Abb. 27 roter Pfeil)

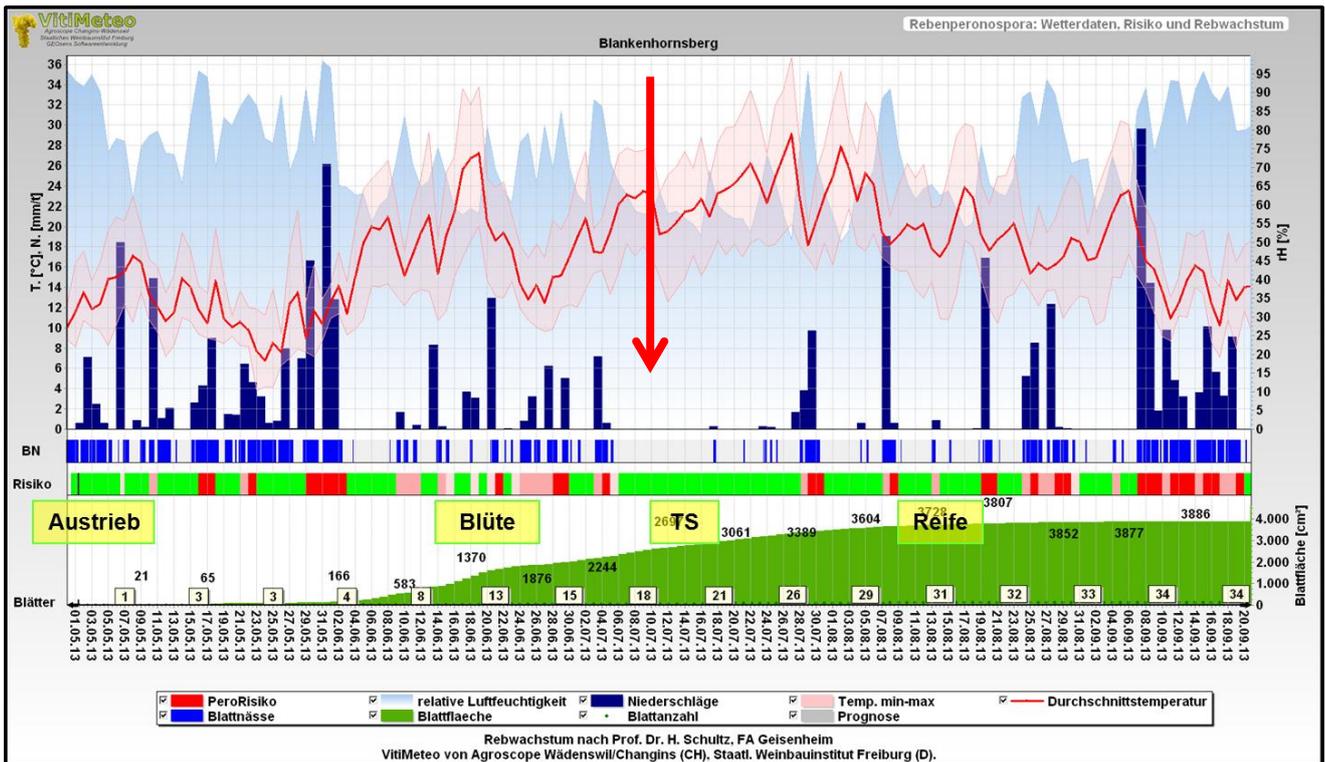


Abbildung 27 Jahresübersicht 2013 für Wetter, Blattzunahme, Befallsrisiko mit *P. viticola* aus VitiMeteo (<http://www.vitimeteo.de/pero/pero.shtml>). Es sind phänologische Ereignisse: Austrieb, Blüte, Traubenschluss (TS) und Reife über die Zunahme der Blattfläche eingetragen. Der rote Pfeil zeigt den Termin der künstlichen Infektion an. Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gottfried Bleyer

#### 4.2.7 FREILANDVERSUCHE MIT DER 2013 ER KAPSELCHARGE CUCAPS

In 2013 konnte in Kooperation mit dem Staatsweingut Freiburg ein Freilandversuch mit den CuCaps unter Praxisbedingungen gemacht werden, durch die Umstellung wurden bereits zwei betriebsübliche Spritzung auf das Feld gelegt bevor der Versuch im Juni begonnen wurde.

Hierbei stellte sich einerseits heraus, dass sich die CuCaps fast problemlos mit einem Praxisgerät ausbringen lassen. Hierbei wurde der Versuch wie in Abbildung 1 angezeigt aufgebaut, es wurden alle 10 bis 14 Tage Epidemieverhebungen durchgeführt und im Verlauf der Vegetationsperiode zweimal bonitiert, einmal nachdem die Befallshäufigkeit in der Kontrolle zum ersten Mal über 30% lag und das zweite Mal nach der Abschluss-spritzung auf dem Feld. Beide Boniturergebnisse werden im Folgenden vorgestellt: Alle Behandlungen unterschieden sich signifikant von den unbehandelten Kontrollen sowohl bei Blatt- als auch bei Traubeninfektionen (Abb. 28 -30).

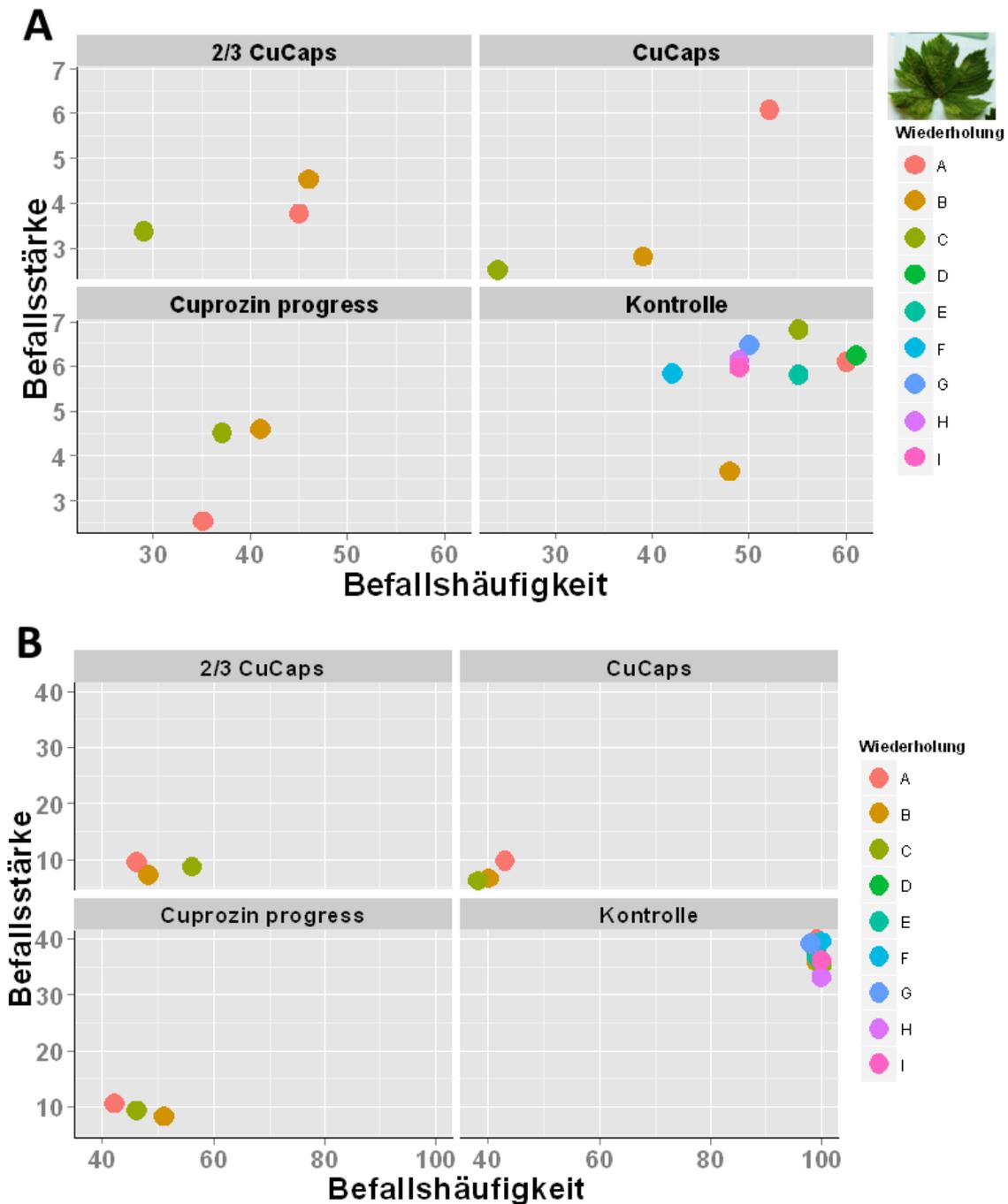


Abbildung 28 Befallsstärke und -häufigkeit der Infektion mit *P. viticola* an Blättern des Versuchsfeldes **A**: in der Mitte der Vegetationsperiode; **B**: Nach der Abschluss-spritzung. Die einzelnen Punkte zeigen die Replikate. Für jedes Replikat wurden jeweils 100 Blätter bonitiert. Dargestellt sind hier die Mittelwerte der einzelnen Versuchspartellen.

Bei der Bonitur in der Mitte der Vegetationsperiode (Mitte Juli) sieht man nur geringe Unterschiede zwischen den Befallsstärke und Häufigkeiten der Blätter untereinander und nur einen geringen Unterschied zu den Kontrollen (Abb. 28A). Dies ist der geringen Gesamtbefallsstärke von maximal

7% geschuldet (Abb. 28A). Außerdem sieht man in der Einzeldarstellung der Replikate, dass sich die Streuungen der Daten nicht sonderlich unterscheiden auch wenn es in der Darstellung durch die unterschiedlich gewählte Skalierung so wirkt (Abb. 28A und B). Die Befallsstärke bei der zweiten Bonitur ist erheblich höher mit soliden 40 Prozent und einer Befallshäufigkeit von 100% (Abb. 28B).

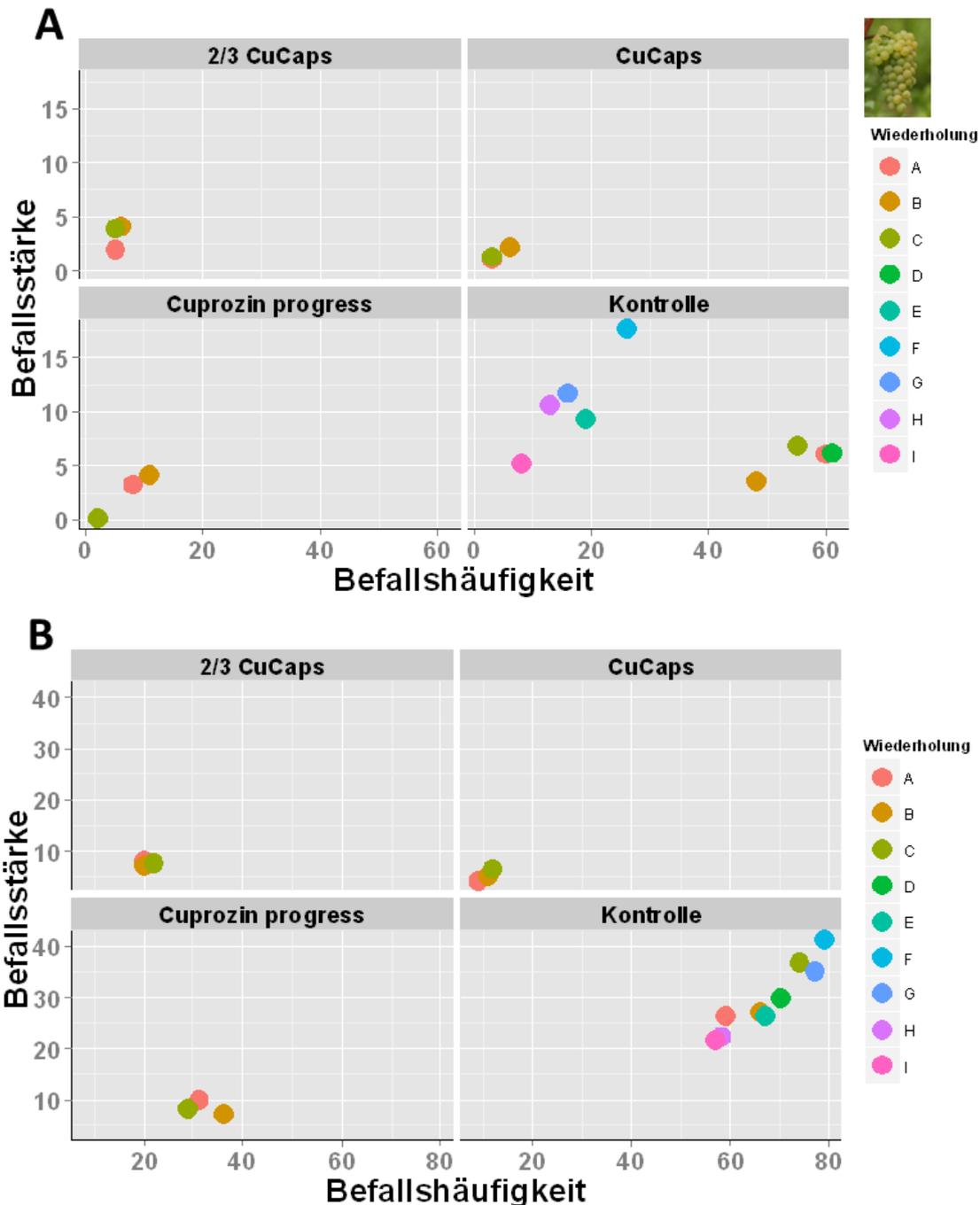


Abbildung 29 Befallsstärke und -häufigkeit von *P. viticola* auf den Trauben des Versuchsfeldes **A**: in der Mitte der Vegetationsperiode; **B**: Nach der Abschluss-spritzung. Die einzelnen Punkte zei-

gen die Replikate. Es wurden pro Replikat jeweils 100 Gescheine/Trauben betrachtet. Dargestellt sind hier die Mittelwerte der einzelnen Versuchspartzen.

In den Trauben sieht man bereits in der Mitte der Vegetationsperiode einen größeren Unterschied zwischen den behandelten und den unbehandelten Trauben, aber einen Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungen kann man hier noch nicht ausmachen (Abb. 29 A) . Auch in den Trauben sieht man zum zweiten Termin einen Anstieg von Befallshäufigkeit und Befallsstärke der Trauben (Abb. 29 B)

Nach der Abschluss-spritzung Ende August wurde die Endbonitur des Feldes Anfang September durchgeführt. Hierbei ergaben sich größere Unterschiede zwischen den Mitteln als bei der ersten Bonitur. Um Fehler bei der Endbonitur auszuschließen wurde die gesamte Fläche von beiden Boniturteams ausgezählt und daraus die Mittelwerte ermittelt.

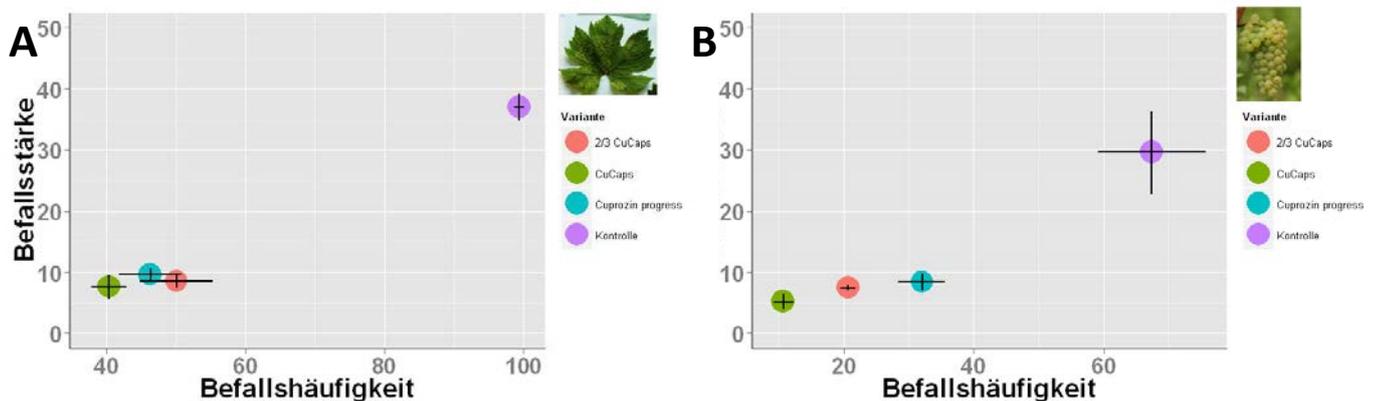


Abbildung 30 **A** Blattinfektionen nach Abschlussbonitur aufgegliedert in Befallshäufigkeit und Befallsstärke. Dargestellt sind hier Mittelwert aus allen Versuchspartzen und Standartabweichung.

**B** Traubeninfektionen Abschlussbonitur aufgegliedert in Befallshäufigkeit und Befallsstärke. Dargestellt sind hier die Mittelwerte aller Versuchsreplikate der Abschlussbonitur und deren Standartabweichungen. Die Orangenen Punkte entsprechen der um ein Drittel reduzierten Aufwandmenge der CuCaps, grüne Punkte entsprechen der vollen Aufwandmenge der CuCaps, blau sind die Daten des Vergleichsmittels in der vollen Aufwandmenge und violett sind die Kontrollen. n=300 für die Versuchspartzen, 900 für die Kontrollen.

Alle behandelten Partzen entsprachen sich bezüglich Befallshäufigkeit und –stärke mit dem Fal-schen Mehltau auf den Blättern (Abb. 30 A). Man sieht außerdem, dass bei Blattinfektionen 2/3 Aufwandmenge der CuCaps zu einer Reduktion von Befallsstärke und –häufigkeit führt, die immer noch etwa den vollen Aufwandmengen von Vergleichsmittel und CuCaps entspricht.

Einen statistisch signifikanten Unterschied der Behandlungen untereinander war nur in der Infektionsstärke und –häufigkeit der Trauben zu sehen (Abb. 30 B). Hier kann man eindeutig feststellen, dass die volle Aufwandmenge der CuCaps signifikant bessere Wirkung aufweist als alle anderen Präparate. Zwei Drittel der Aufwandmenge der CuCaps reichen auch in den Trauben aus, um ein der vollen Aufwandmenge von Cuprozin progress entsprechendes Ergebnis zu liefern, was Befallsstärke und -häufigkeit der Trauben angeht mit dem Falschen Mehltau angeht.

Zusammenfassend lässt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Spritzmitteln nach der Abschlussbonitur der Trauben erkennen.

Auch in 2013 wurden Versuche mit den CuCaps im Hopfen von Dr. Florian Weihrauch durchgeführt. Im Hopfenbau kam es im Jahr 2013 nicht zu einer nennenswerten Infektion der Versuchshopfengärten durch Falschen Mehltau (*Pseudoperonospora humuli*), weshalb keine aussagekräftigen Daten erhoben werden konnten (persönliche Mitteilung von Dr. Florian Weihrauch, LfL Wolnzach).

#### 4.4 WEITERE LABORTESTS VON MISCH- UND ERSATZSTOFFEN (2013)

---

Da auf lange Sicht gesehen Kupferersatzstoffe zu bevorzugen sind und Kupfer in reduzierten Mengen die Gefahr mit sich bringt in Jahren mit starkem Befallsdruck einzubrechen, haben wir uns auch mit Synergie und Ersatzstoffen beschäftigt.

Hierbei wurden verschiedene Naturstoffe und bereits zugelassene Pflanzenschutzmittel wie Netzschwefel auf ihre Wirksamkeit in Verbindung mit Kupfer geprüft:

Der erste Prüfversuch erfolgte mit Nonanal einem Lockstoff aus asiatischen Weinreben, der dazu führen kann, dass die Zoosporen die Spaltöffnungen der Pflanze schlechter finden (Schröder, S., 2009). Theoretisch könnte man auf diese Weise die Kontaktzeit zwischen Zoosporen und Kupfer erhöhen und letztendlich zu einer verbesserten Kupferwirkung gelangen. Zusätzlich wurde in einem Laborversuch ebenfalls Netzschwefel eingesetzt. Aus dem Freiland ist bekannt, dass eine Spritzung von Schwefel kurzfristig eine Infektion mit *Plasmopara viticola* verhindern kann. Hier wollten wir untersuchen, ob dies in einem Laborversuch reproduzierbar ist.

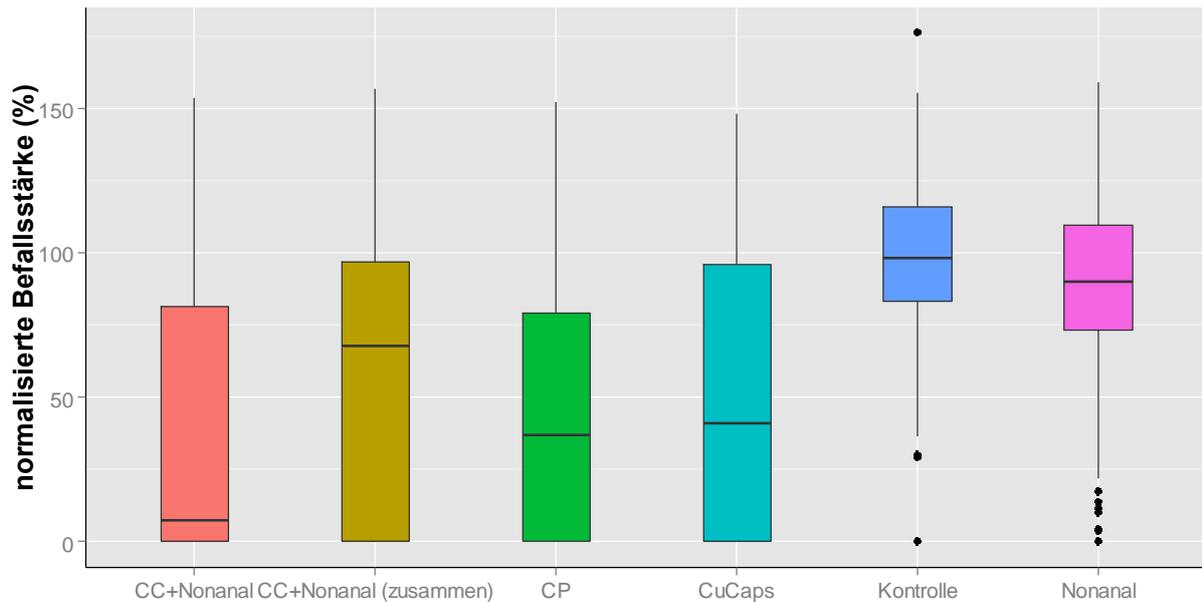


Abbildung 31 Normalisierte Infektionsstärken auf Blattscheiben 5 Tage nach der Inokulation mit Falschem Mehltau. Boxplot aller 4 Datensätze der Blattscheibenversuche; CuCaps 100 mg(ai)/l, Nonanal mit 2%w/w, Nonanal und Kupfer gemeinsam verkapselt in den gleichen AWM wie Einzelstoffe(CC+Nonanal(zusammen)), CP= Cuprozin progress 100 mg(ai)/l, unbehandelte Kontrolle, n= 144

Eine Wirkung von Nonanal allein lässt sich nicht bestätigen. Auch gemeinsam verkapselt mit Kupfer sieht man im Vergleich zu Kupfer alleine keine Wirkungsverbesserung. Man erreicht allerdings eine sehr leichte Wirkungsverbesserung, bzw. einen abgesenkten Median, durch Nonanal, wenn es lokal getrennt von Kupfer aufgetragen wird (Abb. 32, CC+Nonanal), allerdings ist der Unterschied zu den Versuchen mit Kupfer allein sehr gering.

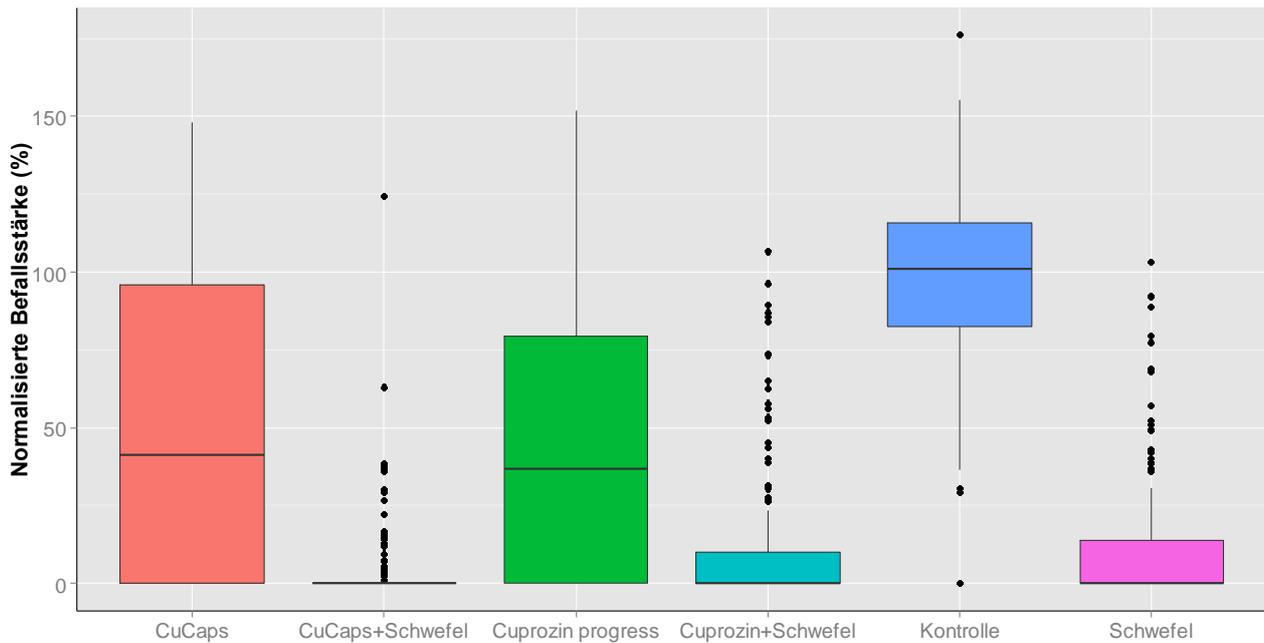


Abbildung 32 Effekt von Kupfer und Netzschwefel auf die Infektionsstärken von *P. viticola* auf Blattscheiben 5 Tage nach Inokulation mit dem Pathogen. Boxplot von 4 Datensätzen, normalisiert. Cuprozin= Cuprozin progress flüssig mit 100 mg(ai)/l, CuCaps mit 100 mg(ai)/l; Schwefel= 0,9% Kumulus WG Netzschwefel ; n=144

Man sieht in den Blattscheibenversuchen einen deutlichen Effekt durch die Zugabe von Netzschwefel, selbst Netzschwefel allein zeigt eine starke Wirkung gegen den falschen Mehltau, diese Wirkung wird durch die Zugabe von Kupfer noch verstärkt (Abb. 32). Hierbei ist der Effekt von Schwefel in Mischung mit den CuCaps signifikant stärker als der Effekt in Mischung mit dem auf Kupferhydroxid basierenden Vergleichsmittel. Ob dies an den unterschiedlichen Kupfersalzen oder der Formulierung der CuCaps liegt, ist aus diesem Versuch nicht ersichtlich.

In der Praxis wurde die Wirkung von Netzschwefel bereits häufiger beobachtet, allerdings hält der Effekt im Freiland nicht lange vor, da die wirksamen Bestandteile entweder abdampfen oder von der Pflanze verstoffwechselt werden.

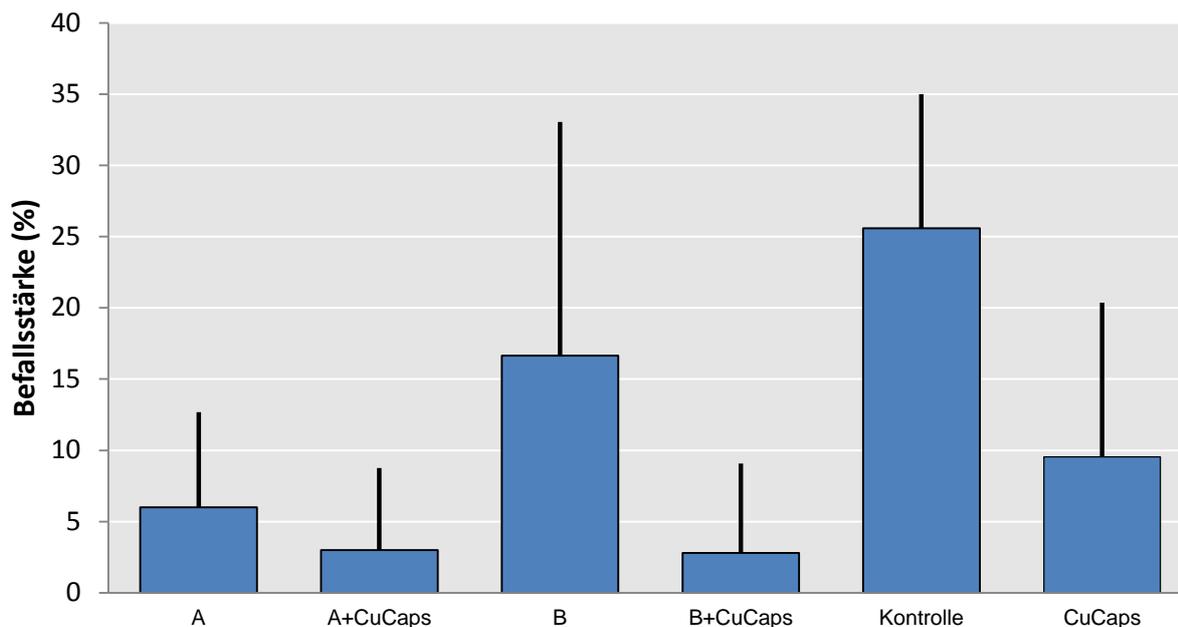


Abbildung 33 Synergieversuch auf Blattscheiben. Befallsstärke von *P. viticola* auf Blattscheiben 5 Tage nach der Inokulation mit dem Pathogen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung. Substanz A = 0,1% Phosphorige Säure, Substanz B= 0,002% der Beta-Säuren Fraktion aus Hopfenextrakt, 100 mg (ai) CuCaps, n= 36

Während des Projekts wurde außerdem ein Synergieversuch im Vergleich zur Phosphorigen Säure (Phosphonat) angefertigt. Hierbei wurden aufgereinigte Einzelbestandteile von Hopfenextrakt als potentielle Synergisten getestet. Diese wurden freundlicherweise von der Firma Hopsteiner zur Verfügung gestellt. Abbildung 33 zeigt nur eine relevante Auswahl der Ergebnisse dieses Versuchs. In diesem Versuch wurden sehr geringe Mengen der Hopfenextraktfraktionen eingesetzt, aber es konnte in manchen Fällen dennoch eine Wirkung beobachtet werden. Gerade die Fraktion der Beta-Säuren zeigte zwar selbst nur eine geringe Wirkung im Vergleich zur Phosphorigen Säure (Abb. 33 A) oder den CuCaps. In der Mischung mit den CuCaps zeigte sich allerdings eine verbesserte Wirksamkeit (Abb. 33 B+CuCaps), die in etwa dem Effekt von Phosphoriger Säure kombiniert mit den CuCaps (Abb. 33. A+CuCaps) entsprach.

#### 4.5 FREILANDTESTS MIT EINEM POTENTIELLEN KUPFERERSATZ- ODER MISCHSTOFF(2013 DATEN ERHOBEN VON PROF. DR. HANNS-HEINZ KASSEMAYER UND DER MITTELPRÜFUNG DES WBI)

---

In Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe Lipide und Liposome an der Klinik für Tumorbiologie Freiburg wurden die Wirkung von Hexadecylphosphocholin (HePC) auf die Rebenperonospora geprüft. HePC wird am staatlichen Weinbauinstitut in Freiburg bereits länger untersucht. Bei der Substanz handelt es sich um ein Phospholipid mit folgender Struktur:

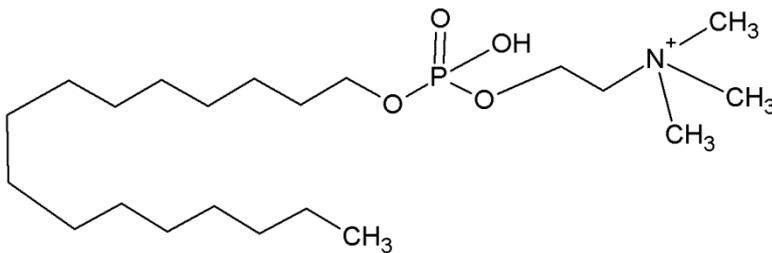


Abbildung 34 Strukturformel von Hexadecylphosphocholin

HePC wird in der Tumorthherapie und in der Therapie von parasitär bedingten Krankheiten (Leishmaniose) bereits erfolgreich angewandt. Der Wirkstoff aktiviert in humanen Zellen Abwehrreaktionen, die zum programmierten Zelltod um die befallenen Stellen führen. In Vorversuchen zeigte HePc eine Wirkung auf die Rebenperonospora in einer Konzentration ab 0,01 %.

Im Rahmen des Projektes fand nun Jahr 2013 ein Freilandversuch statt, bei dem HePC mit einem biologisch abbaubaren Netz- und Haftmittel formuliert wurde. Der Versuch wurde in einer randomisierten Blockanlage mit vierfacher Wiederholung durchgeführt. Die Wirksamkeit von HePc gegen Rebenperonospora wurde mit einem Standardfungizid (Folpan), einem Kupferpräparat (Cuprozin progress) und Spritzfolgen nach Empfehlung des Beratungsdiensts ökologischer Weinbau(BÖW) verglichen. Die Ergebnisse zeigten eine befriedigende Wirkung auf den Blattbefall zum Entwicklungsstadium BBCH 77 und zur Reife (Entwicklungsstadium BBCH85).

Die Wirkung auf den Befall der Beerten war zu Reifebeginn und während der Reife gut. Es wurden Befallsstärke (BS) und Befallshäufigkeit (BH) an zwei Terminen bonitiert: das erste Mal während der Vegetationsperiode, das zweite Mal nach der Abschluss-spritzung. Angegeben sind hier Mittelwerte von 4 Versuchspartzen in denen jeweils 100 Blätter oder 100 Trauben bonitiert wurden

Tabelle 3 Boniturergebnisse des Freilandversuches mit HePC im Vergleich zu anderen Versuchen derselben Flächen. BS= Befallsstärke der Infektion mit *P. viticola*, BH= die korrespondierende Befallshäufigkeit Dargestellt sind immer beide Bonituren.

Blattbefall Bonitur 25.07.2013 Entwicklungsstadium BBCH 77 Reifebeginn		
Variante	BS	BH
Kontrolle	9,1	63,5
Folpan WDG	0,4	3,0
Cuprozin progress	0,6	9,5
BÖW 1	0,1	1,0
Cu nach BÖW + NS	0,3	2,8
HePc	0,6	8,8

Blattbefall Bonitur 05.09.2013 Entwicklungsstadium BBCH 85 Weichwerden der Beeren (Reife)		
Variante	BS	BH
Kontrolle	32,6	99,0
Folpan WDG	2,0	13,5
Cuprozin progress	3,7	20,5
BÖW 1	3,4	22,5
Cu nach BÖW + NS	3,5	20,8
HePc	8,3	43,5

Beerenbefall Bonitur 25.07.2013 Entwicklungsstadium BBCH 77 Reifebeginn		
Variante	BS	BH
Kontrolle	3,0	0,0
Folpan WDG	0,8	0,0
Cuprozin progress	3,0	1,0
BÖW 1	1,5	0,0
Cu nach BÖW + NS	10,6	4,0
HePc	0,0	0,0

Beerenbefall Bonitur 05.09.2013 Entwicklungsstadium BBCH 85 Weicherden der Beeren (Reife)		
Variante	BS	BH
Kontrolle	71,6	98,0
Folpan WDG	0,1	0,8
Cuprozin progress	5,5	14,0
BÖW 1	1,9	10,0
Cu nach BÖW + NS	1,8	8,8
HePc	2,5	8,8

## 5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

---

### 5.1 KUPFERFORMULIERUNG

---

Durch *in vivo* Versuche mit Zoosporen und *Paramecium* konnten Kupferionen als ein gegen Zoosporen von *Plasmopara viticola* wirksamer Anteil von Kupfer identifiziert werden. Unsere Versuche haben gezeigt, dass in direktem Kontakt zu Zoosporen von *P. viticola* kleinste Mengen von Kupfer ausreichen um die Zoosporen in Minuten zu schädigen oder zum Absterben zu bringen. Lösungsversuche mit unterschiedlichen Kupfersalzen ergaben auch hier eine Korrelation der Löslichkeit von Ionen und Wirksamkeit (Daten nicht gezeigt). Weshalb wir uns für die Verkapselung einer leicht löslichen Kupferverbindung entschieden haben (Kupfersulfatpentahydrat). Durch die Kombination aus leicht löslichem Kupfer und gut haftender Fettkapsel erreichten wir Persistenz ohne Wirkverlust. Das Problem die Freisetzungskinetik aus den Kapseln so anzupassen, dass die wirksamen Kupferionen nach und nach freigesetzt werden, wurde während des Projektes durch die Veränderung der Kapselzusammensetzung gelöst. Eine der Herausforderungen ist sicherlich die entwickelten Kapseln so zu formulieren, dass das Spritzbild gleichbleibt. Wie man bei der Prüfung der Charge A65 an den Kupfermengen der CuCaps sieht (Abb. 24/25), variiert hier die ausgebrachte Kupfermenge noch stärker als bei dem etablierten Vergleichsmittel. Da die CuCaps ein unlöslicher Bestandteil sind, die nur durch ein Tensid in Wasser suspendiert werden können, können unter Druck Teile des Feststoffs ausfallen (Vgl. Abb. 2 unter hohem Druck). Da auch das Versuchsapplikationsgerät, das für diese Versuche verwendet wurde Druck auf eine unbewegte Lösung aufbaut, könnten die Variationen hierdurch zustande kommen. Mit den praxisüblichen Applikationsgeräten lässt sich das Mittel ausbringen, es kommt aber auch hier immer wieder, durch eine ungleichmäßige Verteilung des Tensids, zur Bildung von Klumpen. Dadurch können sich die festen Bestandteile in den Sieben absetzen aber ein verstopfen der Düsen wurde beim Praxisgerät nie beobachtet (vgl. Freilandversuche). Für die Zukunft wäre eine Verbesserung der Formulierung der CuCaps eines der großen Ziele: Da das Präparat momentan noch ein Pulver (WP- wettable powder) ist, dass wegen Staubbildung nicht ohne Atemschutzmaske eingeatmet werden kann, wäre eine Umstellung auf ein Granulat bereits eine Verbesserung für zukünftige Anwender. Ebenso sollte die Bildung von Klumpen, die auch bei den späteren Formulierungen noch auftrat, durch Formulierungshilfsstoffe oder eine Änderung der Technik in Zukunft verbessert werden.

### 5.2 KUPFERWIRKUNG

---

Die biozide Wirkung von Kupfer auf Bakterien und Algen ist schon lange bekannt und wird auch in diversen Bereichen vor allem im medizinischen Umfeld aktiv genutzt, z.B. durch Türklinken aus Kupfer in Krankenhäusern um die Ausbreitung von multiresistenten Erregern zu verhindern. Hierbei ist der genaue Wirkmechanismus unbekannt, man geht aber davon aus, dass Membranproteine geschädigt werden und so zu einer letalen Destabilisierung der Membranen führen oder dass durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies Membranen und Zellen im Gesamten geschädigt werden (Grass et al, 2011).

Über die Wirkungsweise von Kupfer auf Pilze und Oomyceten ist wenig bekannt. Durch mikroskopische Beobachtung der Kupferwirkung können wir sagen, dass Kupfer in Abhängigkeit von pH und Temperatur auf die Zoosporen von *Plasmopara viticola* wirkt (Vgl. Abb. 16). Wobei es zu einer massiven Schädigung der Membran der Zoosporen kommt, was in einer letalen Dosis zum Platzen der Zellen führt. Durch die Beobachtungen an Paramecium können wir sagen dass Aluminiumsulfat und Kupfersulfat ähnliche Wirkungsweisen haben und beide zu einem katastrophalen Membranversagen führen. Dies ähnelt den Beobachtungen in Bakterien. Wir gehen davon aus, dass Membranproteine und Lipide oxidiert werden und so ihre Funktion als Barriere nicht mehr ausführen können. Dies wird auch durch Untersuchungen der Wirkung von Kupfer auf Lipide unterstützt, die an Rattenzellen und Fettsäuren von Rattenzellen durchgeführt wurde. Hierbei wurde nachgewiesen, dass Kupfer ohne Unterschied an verschiedene Lipide bindet und in Gegenwart von Ascorbat diese peroxidiert (Letelier et al, 2004). Unsere Ergebnisse zeigen außerdem, dass bereits geringe Mengen an Kupfer ausreichen um Zoosporen zu hemmen oder gar abzutöten.

Gerade diese sehr direkte physikalische Wirkung und, dass eigentlich nur kleine Mengen benötigt werden um den Falschen Mehltau abzutöten, macht Kupfer als Pflanzenschutzmittel effektiv. Außerdem kommt es wie bei anderen Kontaktfungiziden eigentlich nicht zu einer Bildung von Resistenzen. Gerade mit einer weiteren Verbesserung der Eigenschaften der CuCaps könnte man den Kupfereintrag zukünftig sicher noch weiter minimieren.

---

### 5.3 APPLIKATIONSSTRATEGIE

---

Unsere Applikationsstrategie im Freilandversuch zeigt, dass man in Jahren mit geringen bis durchschnittlichem Befall durch die Rebenperonospora (z.B. 2013) mit geringeren Kupfermengen auch bei etablierten Spritzmitteln auskommen kann, ohne Ernteeinbußen zu riskieren (Tabelle 2, Abb. 32). Dies haben auch in der Vergangenheit immer wieder Strategieversuche der Mittelprüfung des WBIs gezeigt (z.B. Bleyer, 2010, Bleyer 2012-2). Allerdings besteht bei kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln auch immer die Gefahr, dass es bei extremen Witterungsbedingungen wie sie beispielsweise im Jahr 2012 gegeben war, zu keiner ausreichenden Wirkung mehr kommt (Bleyer, 2012-1). Die in diesem Projekt entwickelten CuCaps sollen dazu beitragen, dass bei noch geringeren Aufwandmengen, eine gute Wirkung garantiert werden kann. In unserem Freilandversuch konnten wir zeigen, dass unsere zwei Drittel reduzierte Variante immer noch eine ausreichende Wirkung hat (Abb. 32). Versuche aus dem Haus in vergangenen Jahren haben auch immer wieder gezeigt, dass kupferbasierte Pflanzenschutzmittel bei starkem Pathogendruck kaum einen Schutz vor Infektion der Gescheine und Trauben bieten. In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass zumindest die CuCaps hier signifikant besser abschneiden als das Vergleichsprodukt (Vgl. Abb. 32)

Unser Versuch ist sicherlich nur einer von vielen durchgeführten Strategieversuchen und auch wie andere vor uns können wir sagen, dass eine Bestimmung der Spritztermine nach dem Prognosemodell VitiMeteo ([www.vitimeteo.de](http://www.vitimeteo.de)) sehr sinnvoll ist und hilft den Kupfereintrag bereits ohne kupferminimierende Präparate zu senken. In der Vergangenheit hat sich auch gezeigt, dass eine Mischung von Kupfer und phosphonathaltigen Produkten zu einer besseren Wirkung und einem geringeren Kupfereintrag beitragen können. Gerade in Jahren mit sehr starkem Befallsdruck ist es sehr schwierig Ernteverluste nur mit kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln zu verhindern. Wir sind der Überzeugung, dass mit einem weiter entwickelt CuCaps-Präparat sicherlich eine noch geringere Kupfermenge ausreichen würde um die Rebenperonospora unter Kontrolle zu halten.

#### 5.4 MISCH- UND ERSATZSTOFFE

---

Die Arbeiten mit Aluminiumsulfat haben gezeigt, dass auch andere anorganische Salze als Kupferersatz dienen könnten. Aluminium hat mehrere Vor- und Nachteile: Aluminiumsulfat gehört zur Wassergefährdungsklasse 1, schwach wassergefährdend, während Kupfersulfat zur Klasse 2, wassergefährdend gehört. Dies könnte natürlich zu einer Entlastung von Gewässern in Weinbaugebieten führen. Kupfersulfat und Aluminiumsulfat unterscheiden sich auch in der Gefährlichkeit für den Anwender während Kupfersulfat gesundheitsschädlich ist, ist Aluminiumsulfat ätzend und gesundheitsschädlich.  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  zeigt eine Wirksamkeit in ähnlichen Feldaufwandmengen wie Kupfersulfat. Allerdings kann Aluminium bereits in relativ geringen Dosen zu Wachstumsstörungen und anderen Defiziten an Pflanzen führen (Rout et al, 2001), was es für den Einsatz als Ersatzstoff eher ungeeignet macht. Als Mischpartner könnte man es in geringen Dosen in Betracht ziehen.

Hopfenextrakt zeigt in Konzentrationen ab 0.1% eine gute Wirksamkeit gegen den falschen Mehltau, allerdings ist die Wirkung flüchtig, sprich eine Verkapselung dieses Wirkstoffes wäre unerlässlich. Außerdem wären die benötigten Mengen nicht unbedingt der Marktlage an Rohmaterial entsprechend. Gerade die Einzelbestandteile des Hopfenextrakts wie z.B. die Beta-Säuren (Vgl. Abb. 33 B; B+CuCaps) könnten interessante Misch- oder Ersatzstoffe sein. Aus diesem Grund wurde nach Projektende eine Bachelorarbeit, die das Potential des Gesamtextrakts und der Einzelstoffe nochmals näher betrachten sollte, am Staatlichen Weinbauinstitut durchgeführt.

Nonanal zeigte in unseren Versuchen nur eine geringe synergistische Wirkung und auch nur dann, wenn Nonanal und Kupfer räumlich getrennt aufgebracht wurden, was angesichts des Verwirrungseffekts dieses Stoffes Sinn macht. Hier wäre ein Versuch mit einer Auftragung von punktuell Nonanal in größerem Maßstab interessant.

Aus der Praxis war schon bekannt, dass auch Schwefel eine Wirkung gegen den Falschen Mehltau der Weinrebe hat. Wir haben dies in unseren Versuchen nochmals unter Laborbedingungen bestätigt.

Hier wären sicher weitere Versuche interessant, ob die Wirkung des Schwefels ähnlich wie die des Hopfenextrakts unter gut belüfteten Bedingungen ebenfalls nur transient ist wie dies die Berichte aus der Praxis sagen. Unter Umständen wäre in Zukunft eine gemeinsame Verkapselung von Schwefel und Kupfersulfat interessant, da unsere Experimente hier einen sehr guten Synergieeffekt gezeigt haben und die Kapsel ein Abdampfen des Schwefels verhindern könnte.

Wir haben mehrere weitere Mischpartner getestet. Sicherlich ist die Phosphorige Säure (Phosphonat) als Synergist für Kupfer interessant (Abb. 33 A; A+CuCaps), allerdings wird Phosphonat durch die Pflanze aufgenommen und in den vegetativen Organen gespeichert, was eine heikle Rückstandsituation ergibt (vgl. Diskussionsbeiträge aus Kühne (Hrsg.), 2010). Im Weinbau gibt es bereits das Bestreben Phosphonat auch für den ökologischen Anbau in die Liste der zugelassenen Stoffe aufzunehmen, da dies die schwierige Lage der Winzer im ökologischen Weinbau etwas entlasten könnte. Weitere Versuche mit Phosphonat und in Mischung mit Kupferpräparaten wurden in den letzten Jahren am Staatlichen Weinbauinstitut durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mischung Phosphonat mit Kupferpräparat eine sehr gute Wirkung auf *Plasmopara viticola* aufweist (siehe auch 5.3). Gerade in Jahren mit hohem Befallsdruck durch den Falschen Mehltau könnte so Phosphonat zu einer Schonung der Böden und der Vermeidung von Ernteeinbußen beitragen.

HePC zeigte in unseren Freilandversuchen eine gute Wirkung gegen den Falschen Mehltau und es wäre wünschenswert hier weitere Versuche zu machen um einerseits die Wirksamkeit zu bestätigen und andererseits den genauen Wirkmechanismus aufzuklären. Bisher ist davon auszugehen, dass durch diesen Stoff direkt die Sporangien abgetötet werden und es nicht mehr zu einem Schlupf von Zoosporen kommt. Aber gerade hier wären weitere Experimente notwendig um dies zu bestätigen und zu vertiefen.

Nach Abschluss des Vorhabens müssen die Neuentwicklungen dem ökologischen Weinbau und auch anderen Kulturen im ökologischen Landbau zur Verfügung stehen. Diese Einführung in die Praxis umfasst zwei Bereiche:

- Einführung der Ergebnisse des Vorhabens in die Praxis des ökologischen Weinbaus.
- Produktion und Vertrieb der neuen Präparate.

Denn obwohl Kupfer als Pflanzenschutzmittel diverse Probleme bereitet und unerwünschte Nebeneffekte auftreten können vor allem in Dauerkulturen in denen die Böden über Jahre mit Kupfer belastet werden, ist momentan ein vollständiger Verzicht auf Kupfer nicht möglich. Gerade im Bereich des Resistenzmanagements findet Kupfer immer wieder Anwendung. Da durch die physikalische Wirkung von Kupfer kaum Resistenzen entwickelt werden können, ist es in diesem Bereich mangels Alternativen unverzichtbar. Selbst in den problematischen Dauerkulturen wie Wein oder Apfel, kann ohne Ernteeinbußen momentan nicht auf Kupfer verzichtet werden. Da noch keinerlei Alternative zugelassen sind, ist die Situation gerade für den ökologischen Weinbau prekär.

## 6. ANGABEN ZUM VORAUSSICHTLICHEN NUTZEN UND ZUR VERWERTBARKEIT DER ERGEBNISSE

---

Im Projekt wurden durchaus praxisrelevante Ergebnisse produziert, allerdings keine die über ein Merkblatt transferiert werden könnten. Eine verbesserte Formulierung von Kupfer mit leicht löslichen Ionen in Fettkapseln bringt ein weiteres Reduktionspotential von Kupfer im ökologischen Weinbau. Diese Technik ist eine Dienstleistung der Agrolytix GmbH. Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass es auch durchaus interessante Misch- und oder Ersatzstoffe aus der Natur gibt und das selbst Schwefel, der üblicherweise gemeinsam mit Kupfer ausgebracht wird um Reben gegen den Echten Mehltau zu schützen ebenfalls eine Wirkung auf den falschen Mehltau hat, allerdings ist diese erfahrungsgemäß nur kurzfristig.

Die in dem vorliegenden Forschungsvorhaben entwickelten CuCaps stellen einen innovativen und erfolgversprechenden Ansatz zur Reduzierung des Kupfereintrags im ökologischen Landbau dar. Diese Formulierung bietet auch die Möglichkeit neuartige Substanzen z.B. Naturstoffe mit Wirkung gegen *Plasmopara viticola* und andere Erreger von Pflanzenkrankheiten so zu formulieren, dass ihre Wirkung auch unter Praxisbedingungen im Feld gewährleistet ist. Zur Weiterentwicklung und zur vollen Ausschöpfung der Möglichkeiten einer Mikroverkapselung von Kupferwirkstoffen und biologischer Wirkstoffe für den ökologischen Landbau sind allerdings noch weitere Entwicklungsarbeiten notwendig. Das vorliegende Forschungsvorhaben zeigt aber, dass die begonnene Entwicklung erfolgversprechend ist.

## 7. GEGENÜBERSTELLUNG DER URSPRÜNGLICH GEPLANTEN ZU DEN TATSÄCHLICH ERREICHTEN ZIELEN; HINWEISE AUF WEITERFÜHRENDE FRAGESTELLUNGEN

---

Ursprünglich war eine andere Formulierungsmethode für unser Kupferpräparat geplant, aber im Laufe der Arbeiten stellte sich eine Mikroverkapselung als die bessere Alternative heraus. Entsprechend haben sich einige Arbeitspakete aus unserem Antrag verändert. Beispielsweise war es nicht notwendig ein computergestütztes Design von Cu-Komplexen und Adjuvantien durchzuführen, oder die Rekristallisierung zu beobachten, die bei den Mikrokapseln nicht in gewohnter Form stattfindet. Durch die große Umstellung auf die Mikrokapseln waren wir nicht in Lage während der Projektlaufzeit in die Praxisapplikation in ökologischen Betrieben zu gehen wie das im Antrag in Arbeitspaket 4 angedacht war.

Das Ziel des Projekts ein neues Kupfer-Präparat mit einer innovativen Formulierung zu finden war erfolgreich. Aus diesem Projekt geht mit den CuCaps ein vielversprechendes Präparat hervor, das ein gutes Reduktionspotential hat. Hierbei haben sich weiterführende Fragen ergeben, die in weiteren Versuchen getestet werden sollten. Die Wirkung im Freiland sollte durch weitere Test bestätigt werden und da von der Firma Agrolytix an einer verbesserten Kapselcharge gearbeitet wird, sollte auch diese wieder Screens im Labor und Tests im Freiland unterzogen werden. Gerade an der Formulierung des Präparats sollte noch gearbeitet werden und weitere Untersuchungen wären notwendig. Es wurden verschiedene Mischpartner und Ersatzstoffe untersucht, von denen einige in unseren Versuchen eine gute Wirksamkeit zeigten. Auch hier wäre eine Fortsetzung der Arbeit wünschenswert, da bisher hauptsächlich Versuche im Labormaßstab durchgeführt wurden und auch hier Freilandtests notwendig wären. Gerade was Hopfenextrakt, HePC oder Schwefel angeht, die effektiv wirken, wäre eine Fortführung der Arbeit nützlich. Durch Zusammenarbeit mit der KOB und dem LfL, die die CuCaps freundlicherweise im Rahmen ihrer BÖLN Projekte verwendeten konnten wir zeigen, dass eine Übertragbarkeit der CuCaps für den gesamten ökologischen Landbau möglich wäre, was den Zielen des Projekts entsprach.

## 8. ZUSAMMENFASSUNG

---

Im Projekt „Reduzierung kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel im ökologischen Weinbau: Untersuchungen zu innovativen Kupferformulierungen mit hohem Reduktionspotential und Entwicklung von Strategien zu deren gezielter Anwendung gegen die Rebenperonospora“ wurden im Laufe von drei Jahren mehrere unterschiedliche Kupfersalze und Kupferersatz- und Mischstoffe an Weinreben getestet um ihr Kupferminimierungspotential zu erforschen.

Unsere Versuche haben gezeigt, dass man um eine optimale Wirksamkeit von Kupfer gegen den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*) der Weinrebe zu erreichen, eine hohe Verfügbarkeit von Kupferionen, durch beispielsweise leicht lösliche Stoffe wie Kupfersulfat, mit einer guten Blatthaftung kombinieren muss. Eine Mikroverkapselung ist ein Weg dies zu erreichen. Für unsere Versuche hat die Firma Agrolytix GmbH, Erlangen, ein mikroverkapseltes Präparat auf Kupfersulfatbasis hergestellt, die sogenannten CuCaps. Das Kapselmaterial besteht aus Fett. Nach Optimierung der Freisetzungskinetik der Kupferionen aus den CuCaps durch die Fa. Agrolytix erhielten wir ein sogenanntes „slow-release“ Präparat, dessen Freisetzungskinetik an die maximalen Blattbenetzungszeiten angepasst war. Entsprechend wurde dieses Präparat unter Praxisbedingungen im Staatsweingut Freiburg am Standort Blankenhornsberg getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Präparat CuCaps an Weinblättern eine äquivalente Wirkung zum verwendeten Referenzprodukt (Cuprozin progress) hatte und selbst in einer geringeren Aufwandmenge von etwa 1.2 kg Kupfer pro Hektar und Jahr noch gute Wirksamkeit zeigte. Zusätzlich erwies sich, dass das mikroverkapselte Präparat signifikant besseren Schutz vor Neuinfektionen an Gescheinen und Trauben bot, als das kommerziell erhältliche Vergleichsprodukt. In Laborexperimenten zeigte das Prüfpräparat sehr gute Haftungseigenschaften und Abwaschstabilität.

Während des BÖLN-Projekts wurden weitere Anwendungspartner aus unterschiedlichen landwirtschaftlichen Bereichen geworben: einerseits Dr Christian Scheer vom Kompetenzzentrum Bodensee, andererseits Dr Florian Weihrauch von der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL). Beide setzten die CuCaps im Rahmen von Kupferminimierungsversuchen im Apfel- respektive Hopfenanbau ein und stellten ihre positiven Ergebnisse unter anderem auf dem Kupferfachgespräch in Berlin vor (2012/2013). Dies zeigt, dass wir mit den CuCaps dazu beitragen könnten im gesamten ökologischen Landbau die ausgebrachten Kupfermengen weiter minimieren. Unser kleiner Applikationsstrategieversuch zeigte, dass man in Jahren mit leichtem bis durchschnittlichen Befall der Reben durch den Falschen Mehltau geringere Mengen an Kupfer ausreichen, um den Ertrag einer Anlage zu sichern. Zusätzlich wurden während der Projektlaufzeit unterschiedliche Misch- und Ersatzstoffe für Kupfer getestet. Bei diesen Experimenten wurde festgestellt, dass die Ausbringung von Kupfer zusammen mit Schwefel eine verbesserte Wirkung gegen *P. viticola* mit sich bringt. Außerdem fanden wir eine transiente Wirkung von Hopfenextrakt auf den Falschen Mehltau der Weinrebe.

Auch das in Kooperation mit der Tumorbiologie Freiburg entwickelte Hexadecylphosphocholin wurde im Rahmen des Projektes untersucht und unter Freilandbedingungen geprüft und zeigte dort sehr gute Wirksamkeit gegen den *P. viticola*.

Alles in allem stehen am Ende dieses Projekts mit den CuCaps ein Präparat, das, weiter entwickelt, den Eintrag von Kupfer in den Boden von Sonderkulturen verringern könnte, und drei potentielle Kupfermisch- oder Ersatzstoffe (Schwefel, Hopfenextrakt, HePC), deren Wirkungsweise und generelle Wirksamkeit weiter untersucht werden sollten.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

---

- Abbott, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol.; 1925; 18: 265-267.
- Bleyer G., Staatliches Weinbauinstitut Tätigkeitsbericht, 2010, S. 25
- Bleyer G., Staatliches Weinbauinstitut Tätigkeitsbericht, 2012-1, S. 18
- Bleyer G., Staatliches Weinbauinstitut Tätigkeitsbericht, 2012-2, S. 20
- Grass, G., Rensing, C., Solioz, M. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. Appl. Environ. Microbiol 2011, 77(5): 1541-1547;
- Krummenauer, F., Wojciechowski, C., Baulig, C., Al-Nawas, B. Boxplots – die flexible Alternative zum „Antennen-Bildchen“ Deutscher Ärzte-Verlag Köln 2007;23(4))
- Kühne,S., Friedrich B. Institut für Strategien und Folgenabschätzung Kleinmachnow -14. Fachgespräch: „Pflanzenschutz im Ökologischen Landbau –Probleme und Lösungsansätze“ Phosphonate, Berlin-Dahlem, 09. November 2010
- Letelier, M. E., Lepe, A., Faúndez, M., Salazar, J., Marín, R., Aracena, P., Speisky, H. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity, Chemico-Biological Interactions, 2005, Volume 151(2): 71-82,
- Mocquot, B., Vangronsveld, J., Clijsters, H., Mench, M., Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzyme activities, Kluwer Academic Publishers, 1996, Plant and Soil, V 182(2), P 287-300
- Mohanty, N., Vass, I., Demeter, S., Copper Toxicity Affects Photosystem II Electron Transport at the Secondary Quinone Acceptor, QB Plant Physiol. May 1989, 90: 175-179.
- Mohr, H. D., Portz, C., Holz, B., Noga, G., Kast, W. K., & Mader, H. Minimierung des Kupfereinsatzes im ökologischen Weinbau unter besonderer Berücksichtigung der Blattbeläge und ihrer Wirkung gegen den Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*)-Teil 1: 2002 bis 2003.Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 2007, 59(3), 49-58.
- Montag J. In vitro Versuche zu den Wirkungen von Kupferverbindungen, Calciumhydroxid, Kaliumcarbonat und dem Alkylpolyglycosid GlucoPON 215 CSUP auf Konidien und frühe Entwicklungsstadien von *Venturiaina equa-lis* , 2005, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Riepert, F.; Auswirkungen von Kupferbelastungen auf ausgewählte Indikatoren der Bodenzönose.; Journal für Kulturpflanzen 2009 Vol. 61(4):. 131-139
- Rout, G.R., Samantaray, S. , Das, P., Aluminium toxicity in plants: a review, 2001, Agronomie 21 (1) 3-21
- Schröder, S. , Plant immunity as a result of co –evolution, 2009, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) am Karlsruher Institut für Technologie

Strumpf, T., Stendel, U., & Vetter, C. . Gesamtgehalte von Kupfer in Böden des Kernobstanbaus, Weinbergen und Hopfenanlagen. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes 2009, 61(4): 117-125.

Strumpf, T., Steindl, A., Strassemeyer, J., Riepert, F. Monitoring of total contents of copper in organically and conventionally managed soils. Part 1: Total contents in vineyard soils of German quality vine areas. Journal für Kulturpflanzen 2011, 63 (5): 131-143

## 10. ÜBERSICHT ÜBER ALLE IM BERICHTSZEITRAUM VOM PROJEKTNEHMER REALISIERTEN VERÖFFENTLICHUNGEN ZUM PROJEKT

---

### **Vorträge**

Touched for the very first time – Pathogenitätsmechanismen von *Plasmopara viticola*

Schmidt, C.; Kassemeyer, H.-H.

Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Tagung des Arbeitskreises Mykologie Hohenheim

22.03.2012

Reduktionspotential von kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln

Schmidt, C.; Kassemeyer, H.-H.

Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft, Tagung des Arbeitskreises Mykologie Hohenheim

22.03.2012

Kupfer – Alternativlos / Von den Wirkungsmechanismen und der Entwicklung eines neuen High-Tech-Pflanzenschutzmittels im Weinbau

Schmidt, C.; Kassemeyer, H.-H.

58. Deutsche Pflanzenschutztagung Braunschweig 10.-14.09.2012

### **Poster**

Kupferreduzierung und potentielle Kupferersatzstoffe im ökologischen Weinbau

Weitbrecht, K; Fischer, F; Schwab, S; Kassemeyer, H-H

Kupferfachgespräch Berlin-Dahlem; 4-5.12.2013

### **Diplom- bzw. Master- und Bachelorarbeiten im Rahmen des Forschungsvorhabens**

Schreiner, Lucia: Hopfenextrakt (*Humulus lupulus*) als Fungizid gegen *Plasmopara viticola*. Masterarbeit, Universität für Bodenkultur. Wien, Fachbereich angewandte Pflanzenwissenschaften

Görtz, Anastasia: Charakterisierung des Sporangienstadiums im asexuellen Entwicklungszyklus von *Plasmopara viticola*. Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Fakultät für Biologie, Institut für Biologie II

Stecklum, Sandor: Untersuchungen zur Wirkung von Kupfer auf das Pathogen *Plasmopara viticola* - Ansätze zur Verminderung des Kupfereinsatzes im Weinberg. Bachelorarbeit Hochschule Geisenheim, Fachbereich Phytomedizin

Weiterhin sollen auf der Deutschen Pflanzenschutztagung im September 2014 einige der Ergebnisse des Projektes vorgestellt werden.

Ein Artikel über die Ergebnisse des Projekts im „Badischen Winzer“ ist in Arbeit.

## ANHANG: ERFOLGSKONTROLLBERICHT

---

Während des Projekts wurden Verfahren und Strategien zur Reduzierung des Einsatzes von Kupferpräparaten gegen die Rebenperonospora im ökologischen Weinbau entwickelt die langfristig zu einer Entlastung des Naturhaushalts im ökologischen Weinbau durch reduzierten Eintrag von Kupfer in das Ökosystem beitragen könnten.

Erzielte Einzelergebnisse können Sie dem Ergebnisteil des Berichtes entnehmen.

Zusammenfassend haben wir viele Substanzen als potentielle Misch- und Ersatzstoffe untersucht, die leider keine Wirkung hatten, weshalb auch nur eine kleine Selektion im Ergebnisteil des Berichts vorgestellt wird. Es wurden außer anorganischen Salzen und Naturstoffen auch Algenpräparate untersucht, was aber nicht zu einem positiven Ergebnis führte. In den nicht in diesen Bericht eingegangenen studentischen Arbeiten wurden folgende Ergebnisse erzielt: Sandor Stecklum befasste sich mit der Löslichkeit verschiedener Kupferpräparate und dem Effekt von Sporangien selbst auf die Löslichkeit der Kupferpräparate. Hierbei wurde hauptsächlich wertvolle Etablierungsarbeit für die Methodik der Atomabsorptionsspektroskopiemessungen geleistet und weniger für das Projekt relevante Ergebnisse produziert. Anastasia Görtz befasste sich in ihrer Diplomarbeit mit der Biologie des Schaderregers *P. viticola*, diese Daten tragen zwar zu unserem grundlegenden Verständnis des Schaderregers bei und damit indirekt auch zu seiner Bekämpfung, sie sind allerdings nicht für den Bericht relevant. Am Ende bleiben 3 potentielle Misch/Ersatzstoffe (Schwefel, HePC, Hopfenextrakt) und die CuCaps, die, weiterentwickelt, den Kupfereintrag weiter minimieren könnte.

Die Fa. Agrolytix GmbH hält ein Patent für Teile des Herstellungsprozesses der CuCaps. Das WBI hält ein Patent für HePC (seit vor Projektbeginn)

Das Entwickelte Präparat hat eindeutige Vorteile gegenüber den momentan kommerziell erhältlichen, kupferhaltigen Pflanzenschutzmitteln: Seine bessere Wirkung an Trauben und das höhere Reduzierungspotential als andere kupferhaltige Spritzmittel.

Das größte wirtschaftliche Hindernis auf dem Weg die CuCaps Anwendern zur Verfügung zu stellen, ist deren Zulassung als Pflanzenschutzmittel, ohne Interesse aus der Wirtschaft oder weitere Förderung wird dieses Präparat nicht zeitnah Anwendern zugänglich gemacht werden können.

Wir haben dieses Jahr zur Bestätigung unserer Ergebnisse einen weiteren Freilandversuch durchgeführt und entsprechend unsere Kooperation mit dem iPAT in Erlangen und der Fa. Agrolytix fortgesetzt. Wir werden auch diese Ergebnisse einem Fachpublikum bei der Deutschen Pflanzenschutztagung im September vorstellen. Danach werden wir versuchen Industriepartner zu gewinnen, die die Entwicklung der CuCaps weiter vorantreiben könnten. Da das WBI als Landesanstalt dies in dieser Form nicht selbst erreichen kann, wir aber überzeugt sind, dass die CuCaps den Kupfereintrag weiter verringern könnten, werden wir hier unsere Bemühungen fortführen. Wir versuchten Anfang dieses Jahres eine weiter gehende Finanzierung der Entwicklung der CuCaps über die Deutsche Innovationspartnerschaft Agrar (DIP) einzuwerben, was aber leider nicht möglich war. Dementsprechend werden

wir uns auch weiter nach Fördermöglichkeiten für die Weiterentwicklung dieses innovativen Präparats und der potentiellen Ersatz- und Mischstoffe umsehen.

Zur weiteren Bearbeitung der Wirkung des Hopfenextrakts haben wir einen Bachelorkandidaten gewonnen, der sich mit großem Interesse diesem Thema gewidmet hat. Auch diese Ergebnisse möchten wir zeitnah veröffentlichen.

Auch unser Anwendungspartner Dr. Florian Weihrauch vom LfL hat dieses Jahr einen weiteren Freilandversuch mit CuCaps im Hopfen durchgeführt. So haben wir uns, um eine weitere Absicherung der Wirkung im Freiland außerhalb der Projektlaufzeit bemüht.

Eine notwendige nächste Phase wäre sicher die Formulierung der CuCaps zu optimieren und detaillierte Freilandstudien zur Wirkung unserer Misch- und Ersatzstoffe durchzuführen.

Geplant ist eine Veröffentlichung ausgewählter Ergebnisse im Badischen Winzer im Laufe dieses Jahres, um den Kreis der Anwender über die in diesem Projekt erzielten Erkenntnisse zu informieren.

Tabelle 4 Ursprünglicher Arbeitsplan

Arbeitspaket	2010		2011		2012			2013	
	Sept. - Dez.	Jan. - April	Mai - Aug.	Sept. - Dez.	Jan. - April	Mai - Aug.	Sept. - Dez.	Jan. - April	Mai - Aug.
1. Entwicklung innovativer Kupferverbindungen	Anforderungsprofil und Moleküldesign				Auswertung der Daten			Auswertung der Daten	
	Synthese von Cu-Komplexen		Primärscreening (Labor und Gewächshaus)		2. Prüfstufe (Gewächshaus und Freiland)			3. Prüfstufe (Gewächshaus und Freiland)	
2. Entwicklung neuartiger Formulierungen und Mischungspartnern	Moleküldesign und Synthese neuer Formulierungen und Zusatzstoffen				Auswertung der Daten			Auswertung der Daten	
			Primärscreening (Labor und Gewächshaus)		2. Prüfstufe (Gewächshaus und Freiland)			3. Prüfstufe (Gewächshaus und Freiland)	
		Chemisch-physikalische Parameter		Lösungsverhalten und Rekrystallisierung, biologische Wirkung nach Lösung und Rekrystallisierung				Auswertung der Daten	
3. Erstellung eines Wirkungsprofils Evaluierung des Reduktionspotentials				Wirkungsprofil aus: Wirkungsgrad, Stabilität des Belags, Belagsbildung, Regenfestigkeit, Suspendierbarkeit in der Spritzflüssigkeit					
				Reduktionspotential aus: minimaler Wirkkonzentration, Wirkungsgrad, Aufwandmenge von Cu je Flächeneinheit (ha) und Jahr und Vergleich mit der Zielvorgabe					
4. Strategien zum gezielten Einsatz von Kupferpräparaten, Validierung			Entwicklung von Strategien			Entwicklung von Strategien			Auswertung und Definition der Strategien
			Freilandversuche	Erfahrungsaustausch		Freilandversuche	Erfahrungsaustausch		Abschlussbesprechung
							Verwertbarkeit und Vorbereitung der Praxiseinführung		
In Zusammenarbeit mit		ECOVIN und Beratungsdienst	Uni Basel und Geochemie	Umweltmedizin					

Der Projektbeginn verzögerte sich auf Mitte März 2011 (geplant war ursprünglich September 2010), dadurch verschoben sich entsprechend geplanten Arbeiten nach hinten. Da Freilandversuche an die Vegetationsperiode gebunden sind, konnten im ersten Jahr keine Freilandversuche durchgeführt werden. Die Kooperation mit der Gruppe Umweltmedizin der Universität Freiburg war leider kein Teil des Projekts, da der Arbeitsgruppenleiter an eine andere Universität wechselte und so nicht mehr zur

Verfügung stand, entsprechend wurden auch die Arbeiten an der Geochemie der Universität Basel hinfällig. In 2011 wurde entsprechend das Anforderungsprofil entwickelt und ein neuer Partner für die Formulierung gesucht. Das iPAT in Erlangen und die Firma Agrolytix wurden neue Partner im Projekt. Um die immensen Mittelmengen, die für Freilandversuche im Weinbau benötigt werden, produzieren und die Kapseln auch weiter entwickeln zu können wurde Ende 2011 eine Aufstockung der Mittel angefordert und Anfang 2012 von Ihnen bewilligt. Ende 2011 wurden auch Dr. Christian Scheer und Dr. Florian Weihrauch für Versuche mit CuCaps im Rahmen ihrer eigenen Projekte geworben (siehe Bericht Kapitel 4.2.2). In 2012 wurde dann ein erster Freilandversuch im Weinbau mit dem nun verkapselten Präparat geplant und durchgeführt. Dieser musste leider wegen technischen Problemen mit der CuCaps Suspension abgebrochen werden (Vgl. Bericht Abb. 3). Mitte März 2013 kam es innerhalb des Projekts zu einem Personalwechsel, dadurch ergaben sich einige Verzögerungen im Projektverlauf unter anderem bei der Erstellung des Zwischenberichts für das vorhergehende Jahr. Wir konnten dennoch einen Freilandversuche und dessen Strategie planen so wie erfolgreich durchführen. Es wurde versucht so viele der noch ausstehenden Arbeiten wie möglich vor Projektende erfolgreich abzuschließen.

Die Ausgabenplanung wurde im Gesamtprojekt eingehalten, auch wenn 2012 etwas mehr Mittel als geplant benötigt wurden, so wurden 2013 etwas weniger Mittel als geplant verbraucht(laut Verwendungsnachweis).