

## The post-infection activities of copper hydroxide and copper sulfate against conidia of *Venturia inaequalis*

Die postinfektionellen Wirkungen von Kupferhydroxid und Kupfersulfat auf Konidien von *Venturia inaequalis*

Jurith Montag<sup>1</sup>, Lukas Schreiber<sup>2</sup> and Jörg Schönherr<sup>1</sup>

### Abstract

The post-infection activity of copper hydroxide and copper sulfate against conidia of *Venturia inaequalis* were evaluated using an in vitro test system based on isolated apple leaf cuticles. Experiments were conducted at 20°C and treatments were applied 24 or 48 h after inoculation. Experiments were assessed by counting living primary stomata 72 h after inoculation using fluorescence microscopy and fluorescein diacetate (FDA) as a vital stain. Copper hydroxide and copper sulfate showed post-infection activity and killed primary stomata, provided the surface of the CM was kept wet. Copper hydroxide was more effective than copper sulfate and was able to kill all primary stomata 24 h after inoculation at concentrations of 116 and 231 mg l<sup>-1</sup>. Results indicate different modes of action for the highly water soluble copper sulfate and the slightly soluble copper hydroxide. Application of copper hydroxide to dry CM did not kill primary stomata. Hence, for copper hydroxide to exert post-infection activity leaves must be wet.

**Keywords:** *Venturia inaequalis*, Kupferhydroxid, Kupfersulfat, Konidien, postinfektionelle Wirkung

### Einleitung

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

Eine dieser Strategien setzt auf den „gezielten“ Einsatz von Kupferfungiziden und somit auf eine Reduzierung der Anzahl an Applikationen (KELDERER ET AL. 1997, 2000; STEFFEK 1999). „Gezielt“ meint dabei, dass eine Applikation erst dann erfolgt, wenn (I) davon auszugehen ist, dass es zu einer Infektion kommen kann (bei vorhergesagtem Regen) oder wenn (II) die Bedingungen zum Zustandekommen einer Infektion bereits erfüllt sind (Regen hat bereits eingesetzt und Inokulum wird freigesetzt). Der Erfolg der zweiten Methode setzt voraus, dass Kupfer nicht nur protektiv sondern auch begrenzt postinfektionell wirksam ist. Nach SZKOLNIK (1981) bezeichnet die postinfektionelle (kurative) Wirkung eines Fungizids die chemische Wirkung, die eine Weiterentwicklung des Pilzes nach erfolgter Infektion bzw. nach Abschluss einer Infektionsperiode verhindert. Der einzige Hinweis auf eine postinfektionelle Wirkung eines Kupferfungizids findet sich in einer Studie von Hamilton (1931), in der er zu der Aussage kommt: „Bordeaux mixture, applied

<sup>1</sup> Universität Hannover, Institut für Biologische Produktionssysteme, Fachgebiet Obstbau, Herrenhäuser Straße 2, D-30419 Hannover, E-Mail: jurith.montag@obst.uni-hannover.de

<sup>2</sup> Universität Bonn, IZMB, Kirschallee 1, D-53115 Bonn, Germany

after infection periods..., gave more consistent and better control than certain sulphur dusts and finely divided sulphur sprays.“ Eine rein protektive Wirksamkeit hätte zur Folge, dass Kupferpräparate auf jeden Fall vor erfolgter Infektion und somit vor Abschluss einer Infektionsperiode appliziert werden müssen. Dadurch würde das Zeitfenster, das einem Anbauer zur Durchführung einer gezielten Bekämpfungsmaßnahme zur Verfügung steht, sehr eng werden.

In der vorliegenden Studie sollte mit Hilfe eines *in vitro* Testsystems auf der Basis enzymatisch isolierter Kutikularmembranen untersucht werden, ob Kupferhydroxid ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ) und Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) eine postinfektionelle Wirkung besitzen und welches Zeitfenster zur Verfügung steht, um primäre Stomata abzutöten. In diesem Zusammenhang sollte auch geklärt werden, welchen Einfluss Nässe für die Wirkung der beiden Kupferverbindungen hat.

## Material und Methoden

Für die Versuche wurden isolierte Kutikularmembranen (CM) von *Malus × domestica* ‚Gloster‘ verwendet. Dazu wurden Blätter (viertes und fünftes voll entfaltetes Blatt) von Neutrieben der genannten Sorte in einer Anlage des Versuchsbetriebes der Universität Hannover in Ruthe gesammelt. Die Isolation erfolgte enzymatisch nach der Methode von SCHÖNHERR UND RIEDERER (1986). Verwendet wurden nur die adaxialen stomatären CM.

Als Inokulum wurden Konidien einer *in vitro* Kultur von *V. inaequalis* verwendet. Die Produktion der Konidien erfolgte auf Cellophanmembranen (PARKER ET AL. 1995). Die Sporendichte der Suspension wurde mittels eines Kolkwitz-Planktonzytometers unter dem Lichtmikroskop ermittelt (KOLLAR 1998) und auf den gewünschten Titer von ca.  $1 \times 10^4$  Konidien  $\text{ml}^{-1}$  eingestellt.

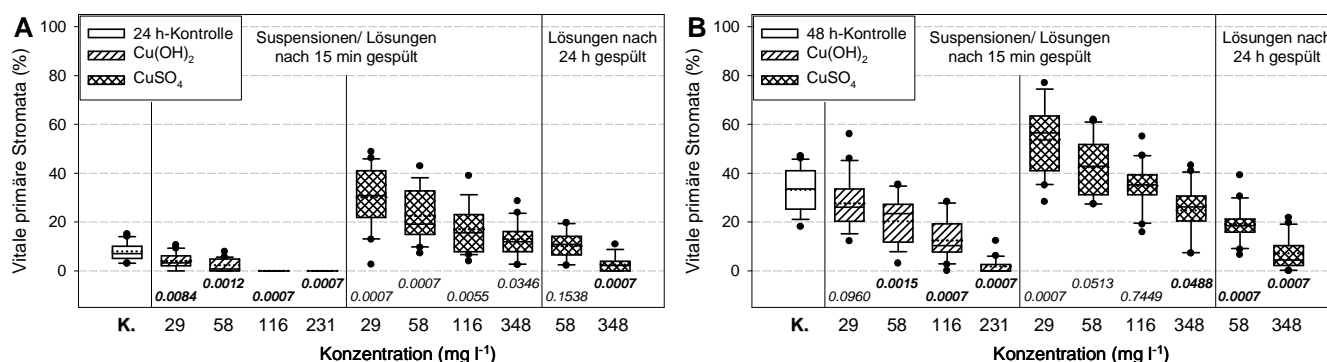
Für die Versuche wurden Petrischalen mit 40 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  befüllt und die CM mit einer Pinzette auf die Wasseroberfläche gegeben. Die morphologische Außenseite musste dabei nach oben zeigen. Zur Inokulation wurde ein 5  $\mu\text{l}$  Tropfen Konidien suspension ( $\approx 50$  Konidien  $5 \mu\text{l}^{-1}$ ) in die Mitte der CM pipettiert. Nach erfolgter Inokulation wurden die Petrischalen mit ihrem Deckel und mit Parafilm verschlossen. Die Inkubation erfolgte für die jeweils angegebene Zeit immer bei 20°C und im Dunkeln.

Für jede Behandlung eines Experiments wurden jeweils zehn CM in eine Petrischale gegeben, und es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Jedes Experiment bestand somit aus 20 Beobachtungen je Behandlung. Zu jedem Experiment wurde die Keimrate der verwendeten Sporensuspension auf sechs CM in einer Petrischale ermittelt. Lag die ermittelte Keimrate in einem Experiment unter 80 %, so wurde dieses verworfen und das Experiment wiederholt.

Die Behandlungen erfolgten 24 bzw. 48 h nach Inokulation. Zunächst wurde die überschüssige Flüssigkeit des Inokulum-Tropfens mit einem Stück Krepppapier aufgesaugt. Danach wurden auf dieselbe Stelle 5  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Behandlungslösung pipettiert. Bei Behandlungen, die nass inkubiert wurden, wurden überschüssiges Wasser und die darin gelösten Behandlungsrückstände nach der angegebenen Einwirkzeit mit einem Stück Krepppapier aufgesaugt. Auf dieselbe Stelle wurden wieder 5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$  pipettiert. Dieser Spülvorgang wurde dreimal wiederholt. Bei Behandlungen, die trocken inkubiert wurden, wurden die Oberflächen der CMs innerhalb einer Stunde im Luftstrom eines Ventilators getrocknet. Nach erfolgter Behandlung wurden die Petrischalen verschlossen und für den Rest der Inkubationszeit in den Inkubator verbracht. Die Behandlungen erfolgten mit Suspensionen des schwerlöslichen  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  und Lösungen des leichtlöslichen  $\text{CuSO}_4$ . Die entsprechenden Konzentrationsangaben finden sich in den Abbildungen (Abb. 1 und 2).

Die Effekte der postinfektionellen Behandlungen auf die Anzahl und die Vitalität primärer Stromata wurden unter Verwendung des Vitalfarbstoffes Fluoresceindiacetat (FDA) fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet (HAMEL ET AL. 1990, BREEUWER ET AL. 1995). Dabei wurde die Farbstofflösung nur an die morphologische Innenseite der CM pipettiert, auf der sich die Stromata ausbildeten. Nach 10minütiger Inkubationszeit unter Lichtausschluss konnte die Anzahl vitaler, grün fluoreszierender Stromata ausgezählt werden. Hatte eine Konidie mehr als ein Appressorium ausgebildet und die CM mehr als einmal penetriert, so wurde dies als ein Penetrationsereignis bzw. als ein Stroma gezählt.

## Ergebnisse und Diskussion

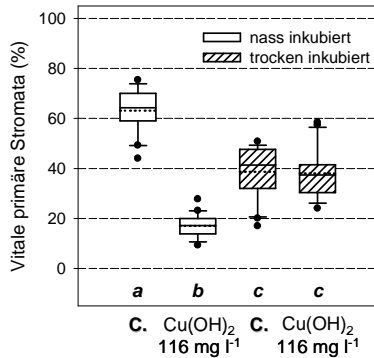


**Abbildung 1:** Postinfektionelle Wirkung von Cu(OH)<sub>2</sub> und CuSO<sub>4</sub> auf die Anzahl vitaler primärer Stromata. Die Behandlungslösungen wurden 24 h (A) bzw. 48 h nach Inokulation (B) appliziert und nach 15 min bzw. 24 h wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 72 bzw. bei den Kontrollen 24 h oder 48 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle. Die adjustierten p-Werte sind kursiv gedruckt. Fett gedruckte p-Werte zeigen an, dass die Prozentsätze vitaler primärer Stromata signifikant unter dem Prozentsatz der Kontrolle lagen ( $p < 0,05$ ).

Cu(OH)<sub>2</sub> und CuSO<sub>4</sub> zeigten unter den Bedingungen des *in vitro* Testsystems eine postinfektionelle Wirkung gegen Konidien von *V. inaequalis*, sofern das Inokulum nach der Behandlung mit Wasser bedeckt war. Sowohl Behandlungen mit Cu(OH)<sub>2</sub> als auch Behandlungen mit CuSO<sub>4</sub> töteten bereits ausgebildete primäre Stromata und konnten den Prozentsatz vitaler primärer Stromata gegenüber der 24 bzw. 48 h-Kontrolle signifikant reduzieren (Abb. 1).

Konidien benötigen bei 20°C 8 Stunden, um eine Infektion hervorzurufen (STENSVAND ET AL. 1997). Dass heißt, dass Cu(OH)<sub>2</sub> in den Konzentrationen 116 und 231 mg l<sup>-1</sup> noch 16 Stunden nach Infektion (24 Stunden nach Inokulation) alle primären Stromata abtötete (Abb. 1A). Bei diesen Konzentrationen wurde auch noch 40 Stunden nach Infektion (48 Stunden nach Inokulation) eine sehr gute Wirkung bzw. hochsignifikante Reduzierung des Prozentsatzes vitaler primärer Stromata gegenüber der Kontrolle erzielt (Abb. 1B).

Behandlungen mit CuSO<sub>4</sub> waren durchweg weniger effektiv als Behandlungen mit Cu(OH)<sub>2</sub>, vor allem, da sie nicht in der Lage waren, alle primären Stromata abzutöten (Abb. 1). CuSO<sub>4</sub> ist sehr gut wasserlöslich und das Kupfer befand sich in den gestesteten Konzentrationen immer vollständig in Lösung, wohingegen sich bei Cu(OH)<sub>2</sub> nur ein geringer Teil des Kupfers in Lösung befand. Es ist daher davon auszugehen, dass beim Spülen das gesamte gelöste CuSO<sub>4</sub> entfernt wurde. Allerdings war die Wirkung von CuSO<sub>4</sub> selbst dann schlechter, wenn die Behandlung erst nach 24 Stunden gespült wurde.



**Abbildung 2:** Vergleich der postinfektionellen Wirkung von Kupferhydroxid auf die Anzahl vitaler primärer Stromata unter trockenen bzw. nassen Inkubationsbedingungen. Die Behandlungslösungen wurden 48 h nach Inokulation appliziert und nach 15 min Inkubation wieder abgespült bzw. trockneten ein. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 72 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf die Anzahl gekeimter Konidien der Keimratenkontrolle. Gruppen, die mit demselben Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

Trockneten die Oberflächen der CM nach Applikation der Lösungen ab und stand bis zum Ende der Inkubationszeit kein tropfbares Wasser mehr zur Verfügung, so zeigte  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  keine Wirkung und konnte die Anzahl vitaler primärer Stromata gegenüber der bei gleichen Bedingungen inkubierten Kontrolle nicht signifikant reduzieren (Abb. 2). Die Anzahl vitaler primärer Stromata, der unter trockenen Bedingungen inkubierten Behandlung sowie der entsprechenden Kontrolle, lagen signifikant unter dem Prozentsatz der unter normalen Bedingungen (d. h. im Tropfen) inkubierten Kontrolle. Das Fehlen von tropfbarem Wasser verhinderte weitere Penetrationsereignisse und somit die Ausbildung weiterer Stromata. Es setzte aber auch die Wirkung von  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  herab, die bei Nässe signifikant besser war.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  nur dann toxisch ist, wenn die Partikel, die in Kontakt mit der Spore stehen, von einem Wasserfilm bedeckt sind. Das heißt, dass die Spore anscheinend nur, wenn tropfbares Wasser zur Verfügung steht, in der Lage ist, Exsudate auszuscheiden, die toxische Kupferkomplexe bilden. Die Wahrscheinlichkeit, dass in der Spore eine toxische Konzentration von Kupfer erreicht wird, die das primäre Stroma abtötet, nimmt mit zunehmender Länge der Nässeperiode zu. Wie lang eine solche Nässeperiode mindestens sein muss, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. 24 Stunden waren ausreichend, aber es ist zu vermuten, dass die minimale Nässeperiode, die nötig ist, um primäre Stromata zu töten, auch von der Menge der Kupferpartikel abhängig ist, die an der Konidie, dem Keimschlauch bzw. dem Appressorium anhaften.

## Literatur

- BREEUWER, P.; DROCOURT, J. L.; BUNSCHOTEN, N.; ZWIETERING, M. H.; ROMBOUTS, F. M. UND ABEE, T. (1995): Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1614-1619.
- FRIIS, K.; DAMGAARD, C. UND HOLMSTRUP, M. (2004): Sublethal soil copper concentrations increase mortality in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* during drought. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 65-73.
- HAMEL, C.; FYLES, H. UND SMITH, D. L. (1990): Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using 3 different vital stains. *New Phytologist* 115, 297-302.
- HAMILTON, J. M. (1931): Studies of the fungicidal action of certain dusts and sprays in the control of apple scab. *Phytopathology* 21, 445-523.
- HOLB, I. J.; DE JONG, P. F. UND HEIJNE, B. (2003): Efficacy and phytotoxicity of lime sulphur in organic apple production. *Annals of Applied Biology* 142, 225-233.

- HOLMSTRUP, M.; PETERSEN, B. F. UND LARSEN, M. M. (1998): Combined effects of copper, desiccation, and frost on the viability of earthworm cocoons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 897-901.
- Kelderer, M.; Cesara, C. und Lardschneider, E. (1997): *Schorfregulierung: Verschiedene Kupferformulierungen - Alternativen zum Kupfer - Gezielte Behandlungen*. 8. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, 8, 9-14.
- Kelderer, M.; Cesara, C. und Lardschneider, E. (2000): *Zwei Jahre Erfahrungen mit der gezielten Schorfbekämpfung durch die Oberkronenberegnung*. 9. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, 9, 5-11.
- KOLLAR, A. (1998): A simple method to forecast the ascospore discharge of *Venturia inaequalis*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 105, 489-495.
- PALM, G. (1995): Versuche zur Bekämpfung des Schorfpilzes mit Kupferpräparaten. *Mitteilungen des OVR* 50, 51-60.
- PALM, G.; KLOPP, K. UND KRUSE, P. (2002): *Control of Venturia inaequalis: substitutes for and reduced use of copper*. 10. Internationaler Erfahrungsaustausch über Forschungsergebnisse zum ökologischen Obstbau, Weinsberg, 10, 75-80.
- PAOLETTI, M. G.; SOMMAGGIO, D.; FAVRETTO, M. R.; PETRUZZELLI, G.; PEZZAROSSA, B. UND BARBAFIERI, M. (1998): Earthworms as useful bioindicators of agroecosystem sustainability in orchards and vineyards with different inputs. *Applied Soil Ecology* 10, 137-150.
- PARKER, D. M.; HILBER, U. W.; BODMER, M.; SMITH, F. D.; YAO, C. UND KOLLER, W. (1995): Production and transformation of conidia of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 85, 87-91.
- SCHÖNHERR, J. UND RIEDERER, M. (1986): Plant cuticles sorb lipophilic compounds during enzymatic isolation. *Plant Cell Environment* 9, 459-466.
- SCHULZE, K. UND SCHÖNHERR, J. (2003): Calcium hydroxide, potassium carbonate and alkyl polyglycosides prevent spore germination and kill germ tubes of apple scab (*Venturia inaequalis*). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 110, 36-45.
- STEFFEK, R. (1999): Managing apple scab (*Venturia inaequalis*) in organic fruit growing - influence of the reduction of practical copper- and lime-sulphur dose rates. *Pflanzenschutzberichte* 58, 7-12.
- STENSVAND, A. UND AMUNDSSEN, T. (2000): Evaluation of three copper fungicides against apple scab. *Test of Agrochemicals and Cultivars* 21, 3-4.
- STENSVAND, A.; GADOURY, D. M.; AMUNDSSEN, T.; SEMB, L. UND SEEM, R. C. (1997): Ascospore release and infection of apple leaves by conidia and ascospores of *Venturia inaequalis* at low temperatures. *Phytopathology* 87, 1046-1053.
- SZKOLNIK, M. (1981): Physical-modes of action of sterol-inhibiting fungicides against apple diseases. *Plant Disease* 65, 981-985.