

The post-infection activity of hydrated lime against conidia of *Venturia inaequalis*

Die postinfektionelle Wirkung von Calciumhydroxid auf Konidien von *Venturia inaequalis*

Jurith Montag¹, Lukas Schreiber² and Jörg Schönherr¹

Abstract

The post-infection activity of hydrated lime against conidia of *Venturia inaequalis* was 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. At the conditions of the *in vitro* test system hydrated lime had a post-infection activity. Suspension of 5 g l⁻¹ applied 24 h after inoculation (16 h after infection) killed all primary stomata and stopped their further development. Treatments 48 h after inoculation reduced the number of vital primary stomata to 60% of control. Treatments with saturated solutions of hydrated lime (pH 12.45) and with KOH solutions of different pH showed that a pH higher than 12.4 was needed to be 100% effective. Suspensions of calcium carbonate (6.75 g l⁻¹) had no effect.

Keywords: *Venturia inaequalis*, Calciumhydroxid, Konidien, postinfektionelle Wirkung

Einleitung

Venturia inaequalis, der Erreger des Apfelschorfes ist eine der weltweit wichtigsten Krankheiten im Apfelanbau (MACHARDY 1996). Im integrierten Apfelanbau ermöglichen moderne synthetische Fungizide eine zuverlässige Schorfkontrolle. Im ökologischen Obstbau stehen hingegen lediglich Kupfer- und Schwefelpräparate zur Schorfkontrolle zur Verfügung (ANONYMUS 2000). Diese sind oft weniger wirksam und zudem phytotoxisch (ELLIS ET AL. 1991, MACHARDY 1996, STENSVAND UND AMUNDSEN 2000). Kupfer hat zudem ein schlechtes ökotoxikologisches Profil, das in einigen europäischen Ländern bereits zu einem Verbot geführt hat (HOLMSTRUP ET AL. 1998, PAOLETTI ET AL. 1998, FRIIS ET AL. 2004). Aus diesen Gründen werden große Anstrengungen unternommen alternative Bekämpfungsstrategien für den ökologischen Apfelanbau zu entwickeln.

Calciumhydroxid (Ca(OH)₂) war bereits Bestandteil der umfangreichen Studie von HAMILTON (1931). Er beobachtete, dass die Ausbringung von Calciumhydroxid vor erfolgter Inokulation nur wenig effektiv war. Bei Sprüh-Applikationen 16 bzw. 90 Stunden nach Inokulation bei Temperaturen von 12 bzw. 16°C konnte die Anzahl der Läsionen gegenüber der Kontrolle auf 27 bzw. 58 % reduziert werden. Hamilton kommentierte die Ergebnisse folgendermaßen: „Hydrated or stone lime 3-50, applied as spray, ..., may exhibit some fungicidal properties of their own under certain conditions.“

Erst knapp 70 Jahre später wurde in Australien wieder ein Versuch unternommen Birnenschorf (*Venturia pirinia* Aderhold) mit Ca(OH)₂ zu bekämpfen (WASHINGTON ET AL. 1998). Die protektiven Spritzungen konnten die Befallsrate zwar reduzieren, waren jedoch sehr viel weniger effektiv als Spritzungen mit konventionellen Vergleichsfungiziden.

SCHULZE UND SCHÖNHERR (2003) beobachteten, dass eine Behandlung mit einer Ca(OH)₂-Suspension 24 Stunden nach erfolgter Inokulation die Konidien und Keimschläuche von *V. inaequalis* schnell abtötete und der weitere Keimverlauf dadurch gestoppt wurde. Erfolgte die Behandlung jedoch vor erfolgter Inokulation hatte die Suspension keinen Effekt. Die Unwirksamkeit der Behandlung vor Inokulation erklärt sich dadurch, dass Ca(OH)₂ durch die Reaktion mit dem CO₂

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

² Universität Bonn, IZMB, Kirschallee 1, D-53115 Bonn

der Luft sehr schnell in das unwirksame Calciumcarbonat (CaCO_3) und Calciumbicarbonat ($\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$) umgewandelt wird (RÖMPP 1995). Die Autoren stellten daher die Hypothese auf, dass die Wirksamkeit von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ auf dem hohen pH-Wert von 12,45 beruht. Alle drei Studien stimmen jedenfalls darin überein, dass $\text{Ca}(\text{OH})_2$ als protektives Fungizid ungeeignet ist.

Ziel der vorliegenden Studie war es, mit Hilfe eines *in vitro* Testsystems auf der Basis enzymatisch isolierter Kutikularmembranen zu ermitteln, ob $\text{Ca}(\text{OH})_2$ eine postinfektionelle Wirkung besitzt und welches Zeitfenster für die Applikation postinfektioneller Behandlungen zur Verfügung steht. 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. Als Positivkontrolle wurde Schwefelkalk eingesetzt, dessen postinfektionelle Wirkung belegt ist (HAMILTON 1931). Außerdem sollte geklärt werden, welche Rolle der pH-Wert für die Wirksamkeit von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ spielt.

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 astomatären 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. 1×10^4 Konidien 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 μl Tropfen Konidien suspension (≈ 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 μl der jeweiligen Behandlungslösung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde überschüssiges Wasser und die darin gelösten Behandlungsrückstände mit einem Stück Krepppapier aufgesaugt. Auf dieselbe Stelle wurden wieder 5 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dem.}}$ pipettiert. Dieser Spülvorgang wurde dreimal wiederholt. Nach so erfolgter Behandlung wurden die Petrischalen verschlossen und für den Rest der Inkubationszeit in den Inkubator verbracht. Die Behandlungen erfolgten mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in Form einer gesättigten Lösung (hergestellt mittels Vakuumfiltration) und einer Suspension (5 g l^{-1}) sowie mit CaCO_3 ($6,75 \text{ g l}^{-1}$), mit Schwefelkalk (1,5 %) und mit KOH-Lösungen verschiedener pH-Werte (11, 12, 12,4 und 12,6).

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

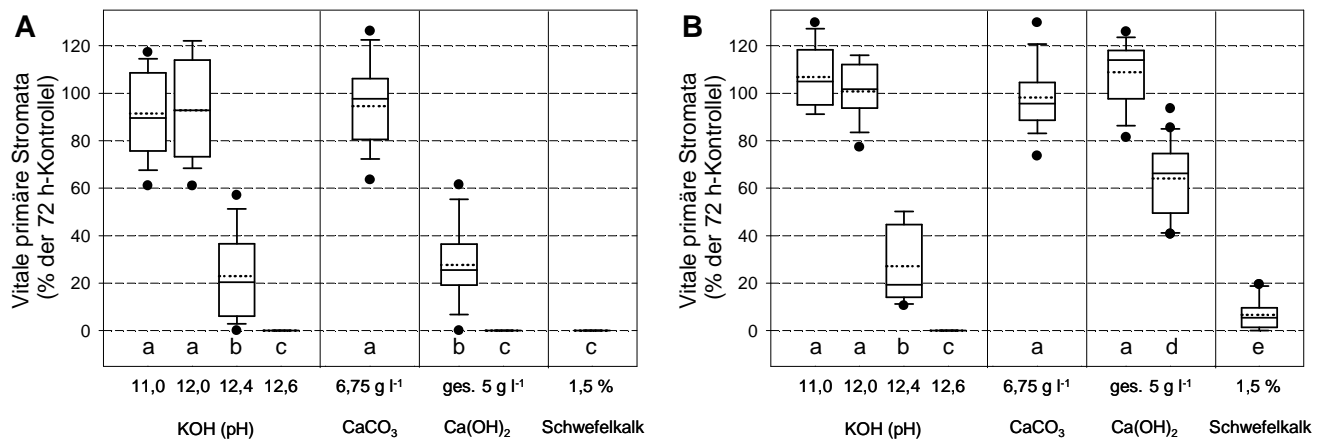


Abbildung 1: Postinfektionelle Wirkung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , KOH-Lösungen verschiedener pH-Werte sowie Schwefelkalk auf die Anzahl vitaler primärer Stromata. Die Behandlungen wurden 24 h (A) bzw. 48 h nach Inokulation (B) appliziert und nach 15 min wieder abgespült. Die Anzahl vitaler primärer Stromata wurde 72 h nach Inokulation unter Verwendung des Vitalfarbstoffes FDA ausgezählt. Die Ergebnisse zeigen die Prozentsätze vitaler primärer Stromata bezogen auf den Prozentsatz der 72 h-Kontrolle. Gruppen, die mit demselben Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p < 0,05$).

Als Suspension zeigte Calciumhydroxid eine deutliche postinfektionelle Wirkung. Bei Behandlungen 24 h nach Inokulation bzw. 16 h nach Abschluss einer Infektionsperiode (STENSVAND ET AL. 1997) tötete $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (5 g l^{-1}) alle vitalen primären Stromata (Abb. 1A). Die Wirkung war allerdings deutlich schlechter, wenn die Behandlung erst 40 Stunden nach Abschluss einer Infektionsperiode erfolgte (Abb. 1B). Schwefelkalk (1,5 %), der als Positivkontrolle diente, zeigte auch bei Applikationen 40 Stunden nach Abschluss einer Infektionsperiode eine sehr gute postinfektionelle Wirkung (Abb. 1).

Die Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass die Wirkung von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ auf dem hohen pH-Wert der Suspension beruht. KOH-Lösungen bis pH 12 und eine CaCO_3 -Suspension mit pH 8,3 zeigten keine Wirkung (Abb. 1). Ein pH-Wert $\geq 12,4$ war nötig, um primäre Stromata zu töten bzw. um die Anzahl vitaler primärer Stromata gegenüber den unwirksamen Behandlungen signifikant zu reduzieren (Abb. 1). Für die Schwefelkalk-Lösung, deren pH-Wert mit 11,2 ebenfalls sehr hoch war, wird ein Beitrag des pH-Wertes zur Wirkung ausgeschlossen (GOLDSWORTHY 1928).

SCHULZE UND SCHÖNHERR (2003) zeigten, dass bei ausreichend hohem pH-Wert eine sehr kurze Inkubationszeit nötig ist, um alle Konidien zu töten. In der vorliegenden Arbeit reichte der Effekt der gesättigten $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Lösung nicht aus, um bei einer postinfektionellen Applikation alle primären Stromata abzutöten (Abb. 1), obwohl der Ausgangs-pH-Wert bei 12,45 lag. Die Suspension hingegen reduzierte die Rate vitaler primärer Stromata auf Null. Anscheinend sank der pH-Wert der gesättigten Lösung durch die Reaktion mit dem CO_2 der Luft so schnell ab, dass einige der primären Stromata überleben konnten. Die Suspension enthält einen Vorrat an ungelösten

Ca(OH)₂-Partikeln, der den pH-Wert von 12,45 aufrechterhält, bis sich alle Partikel aufgelöst haben. Für die Bekämpfung des Apfelschorfes mit Ca(OH)₂ bedeutet dies, dass Suspensionen, die einen Vorrat an Ca(OH)₂-Partikeln enthalten, verwendet werden müssen und gesättigte Lösungen ungeeignet sind. Die Löslichkeit von Ca(OH)₂ wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, liegt aber für gewöhnlich im Bereich von 1,6 g l⁻¹ (JOHANNSEN UND RADEMACHER 1999). Für eine erfolgreiche Schorfbekämpfung sollten daher mindestens 2 bis 2,5 g l⁻¹ verwendet werden.

Bei der getesteten Konzentration kann ausgeschlossen werden, dass Ca²⁺-Ionen oder CaCO₃-Partikel zur Wirkung von Ca(OH)₂ beitragen. Bei gleichem Calciumgehalt wie die Ca(OH)₂-Suspension (5 g l⁻¹), zeigte CaCO₃ (6,75 g l⁻¹) keinen Effekt auf die Anzahl vitaler primärer Stomata (Abb. 1). Dies bestätigt die Ergebnisse von SCHULZE UND SCHÖNHERR (2003), bei denen ebenfalls keine Wirkung auf die Vitalität gekeimter Konidien nach Applikationen von Calciumchlorid und CaCO₃ festgestellt werden konnten.

KOH-Lösungen erwiesen sich als sehr wirksam. Für eine Schorfbekämpfung in der Praxis sind sie aber nicht geeignet, da die erforderlichen Konzentrationen extrem hoch sind was sehr hohe Kosten verursachen und außerdem das Nährstoffgleichgewicht der Bäume zerstören würde. Für Ca(OH)₂ wurden bislang keine phytotoxischen Reaktionen beobachtet. Der Grund dafür ist vermutlich, dass der pH-Wert sehr schnell absinkt und sich CaCO₃ und Calciumbicarbonat bilden, die beide nicht phytotoxisch sind.

Literatur

- ANONYMUS: *IFOAM Basic Standards for Organic Production and Processing*. Tholey-Theley Press, New York, CT, 2000.
- 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.
- ELLIS, M. A.; MADDEN, L. V. UND WILSON, L. L. (1991): Evaluations of organic and conventional fungicide programs for control of apple scab, 1990. *Fungic. Nematicide Tests* 46, 10.
- 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.
- GOLDSWORTHY, M. C. (1928): The fungicidal action of liquid lime sulphur. *Phytopathology* 18, 355-360.
- 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.
- 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.
- JOHANNSEN, K. UND RADEMACHER, S. (1999): Modelling the kinetics of calcium hydroxide dissolution in water. *Acta Hydrochem. Hydrobiol.* 27, 72-78.

- KOLLAR, A. (1998): A simple method to forecast the ascospore discharge of *Venturia inaequalis*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 105, 489-495.
- MACHARDY, W. E.: *Apple scab: Biology, Epidemiology and Management*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 1996.
- 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.
- RÖMPP, H.: *Römpp Chemie Lexikon*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995.
- 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.
- STENSVAND, A. UND AMUNDSEN, T. (2000): Evaluation of three copper fungicides against apple scab. *Test of Agrochemicals and Cultivars* 21, 3-4.
- STENSVAND, A.; GADOURY, D. M.; AMUNDSEN, T.; SEMB, L. UND SEEM, R. C. (1997): Ascospore release and infection of apple leaves by conidia and ascospores of *Venturia inaequalis* at low temperatures. *Phytopathology* 87, 1046-1053.
- SZKOLNIK, M. (1981): Physical-modes of action of sterol-inhibiting fungicides against apple diseases. *Plant Disease* 65, 981-985.
- WASHINGTON, W. S.; VILLALTA, O. UND APPLEBY, M. (1998): Control of pear scab with hydrated lime alone or in schedules with other fungicide sprays. *Crop Protection* 17, 569-580.