

1. Okt. 1986

Diss. ETH Nr. 8060

CHARAKTERISIERUNG DER GENETISCHEN VARIABILITÄT VON
BOTRYTIS CINEREA AUFGRUND VON FUNGIZIDRESISTENZ UND
ENZYMAKTIVITÄT

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZEURICH

vorgelegt von

Gladys Martinetti

Dipl. sc.natw. ETH
geboren am 21. Juli 1959
von Iragna TI

E. Müller

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. E. Müller, Referent

PD Dr. H. Schüepp, Korreferent

1986

lat

Ai miei cari genitori

INHALTSVERZEICHNIS

		<u>Seite</u>
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Allgemeines	1
1.2.	Begriffe	4
1.3.	Zielsetzung	5
2.	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1.	Versuchsflächen	6
2.2.	Probenahme und Isolierung	7
2.3.	Nährmedien und Fungizide	7
2.4.	Laboruntersuchungen über Resistenz bezüglich Fungiziden	11
2.4.1.	Durchführung und Auswertung des Myzeltests	11
2.4.2.	Prüfung der Keimfähigkeit der Konidien	15
2.4.3.	Einsporkulturen	16
2.4.4.	Behandlung mit mutagener Substanz	17
2.5.	Der Apfeltest	17
2.6.	Bestimmung der Konidienkonzentration	18
2.7.	Nährmedien für Enzymproduktion	19
2.7.1.	Pektinmedium	19
2.7.2.	Gewaschene Apfelzellen	19
2.8.	Reinigung der Proteine	19
2.9.	Bestimmung der Proteinkonzentration	20
2.10.	Gelelektrophorese	20
2.11.	Protein und Isoenzym Färbung	21
2.12.	Aktivitätsbestimmung der Polygalacturonasen	23
2.12.1.	Die Methode mit Dinitrosalycilsäure	23
2.12.2.	Die Methode mit Thiobarbitursäure	24
2.13.	Papierchromatographie	25
2.14.	Statistische Auswertung	26
3.	RESULTATE	27
3.1.	Quantitative und qualitative Resistenz gegenüber Dicarboximiden im Freiland	27
3.1.1.	Myzeltest nach mehrjähriger Anwendung	27

	<u>Seite</u>	
3.1.2.	Myzeltest nach einjährigem Behandlungsunterbruch	28
3.1.3.	Myzeltest mit Isolaten aus unbehandelten Erbeerfeldern	29
3.1.4.	Resistenz der Konidien nach mehrjähriger Anwen- dung von Dicarboximiden	30
3.1.5.	Resistente Konidien in nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerfeldern	32
3.2.	Resistenz gegenüber Methylbenzimidazol- Fungiziden (MBC) im Freiland	36
3.3.	Laborresistenz gegenüber Dicarboximiden	37
3.3.1.	Das spontane Auftreten von Laborresistenz	37
3.3.1.1.	Resistenzverhalten von Einsporlinien	38
3.3.1.2.	Laborresistenz in Abhängigkeit von der im Myzel- test verwendeten Konzentration der Konidien- suspension	40
3.3.1.3.	Wachstum auf hohen Fungizidkonzentrationen	43
3.3.1.4.	Myzelwachstum und Konidienkeimung von labor- resistenten Stämmen aus einer langjährig behandel- ten und einer noch nie behandelten Parzelle auf hohen Vinclozolin-Konzentrationen	44
3.3.2.	Das Auftreten von Laborresistenz nach Behandlung mit mutagener Substanz	45
3.3.2.1.	Myzeltest nach Behandlung mit mutagener Substanz	46
3.3.2.2.	Wachstum auf hohen Fungizidkonzentrationen nach Behandlung mit mutagener Substanz	49
3.3.2.3.	Sporenceimtest nach Behandlung mit mutagener Substanz	49
3.4.	Vergleich zwischen laborresistenten Stämmen und ihre sensiblen Ursprungsisolaten aufgrund von ausgewählten Beispielen	51
3.4.1.	Fitness von Freilandisolaten und daraus ent- standenen laborresistenten Stämmen	53
3.4.1.1.	Pathogenität	53
3.4.1.2.	Sporulation	54
3.4.1.3.	Myzelverträglichkeit gegenüber erhöhten osmo- tischen Drucken	55

	<u>Seite</u>	
3.4.2.	Enzymuntersuchungen an sensiblen Isolaten und laborresistenten Stämmen	57
3.4.2.1.	Aktivitätsbestimmung der Polygalacturonasen mit Dinitrosalycilsäure	63
3.4.2.2.	Aktivitätsbestimmung der Polygalacturonasen mit Thiobarbitursäure	67
3.5.	Das Fungizid Z 1	70
3.5.1.	Myzelwachstum und Konidienkeimung laborresistenter Stämme	71
3.5.2.	Pathogenität der laborresistenten Stämme im Vergleich zu den sensiblen Ausgangsisolaten	73
3.5.3.	Stabilität der Resistenz	74
3.6.	Vergleich zwischen dem Resistenzverhalten gegenüber Dicarboximiden und gegenüber Z 1	76
3.6.1.	Kreuzresistenz bei laborresistenten Stämmen	76
3.6.2.	Auftreten von Laborresistenz bei Kombination von Vinclozolin und Z 1	78
3.7.	Vergleich zwischen Freiland- und Laborresistenz bei Dicarboximiden	80
3.7.1.	Verträglichkeit erhöhter osmotischen Drucke	80
3.7.2.	Pathogenitätstest mit den beiden Resistenztypen	84
4.	DISKUSSION	86
4.1.	Resistenz bei Dicarboximid-Fungiziden	86
4.1.1.	Quantitative und qualitative Resistenz im Freiland	86
4.1.2.	Das Auftreten von Resistenz <u>in vitro</u> : die sogenannte Laborresistenz	89
4.1.3.	Eigenschaften laborresistenter Stämme	91
4.1.4.	Die Behandlung der Konidien mit mutagener Substanz	92
4.1.5.	Fitness laborresistenter Stämme in Vergleich zu den sensiblen Freilandisolaten	93
4.1.6.	Die Variabilität der Enzymmuster und Enzymaktivitäten	96
4.1.7.	Vergleich zwischen Freiland- und Laborresistenz	99
4.1.8.	Einsatz von Dicarboximiden im Pflanzenschutz	100

		<u>Seite</u>
4.2.	Das Fungizid Z 1	101
4.3.	Resistenz gegenüber MBC (Methylbenzimidazol)- Fungiziden	102
5.	ZUSAMMENFASSUNG	104
5.	SUMMARY	106
6.	LITERATURVERZEICHNIS	109

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeines

Die Gattung Botrytis wurde schon von Micheli (1729) aufgestellt und ist damit eine der ersten heute noch anerkannten Pilzgattungen. Botrytis cinerea wurde zum ersten Male von Persoon (1801) in "Synopsis methodica Fungorum" genannt. Diese frühe Entdeckung ist auf Grund des häufigen und ubiquitären Vorkommens des Pilzes verständlich. Arten der Gattung Botrytis können mannigfaltige Substrate erfolgreich besiedeln und darauf die auffallenden "Konidienrasen" entwickeln. Wegen der problemlosen Kultur auf synthetischen Nährmedien sind Botrytis-Arten auch typische Laborpilze geworden.

Auf der Rebe (Vitis vinifera) kommt Botrytis cinerea Pers. als Erreger der Graufäule vor, eine pilzliche Erkrankung, die für den Weinbau, im Vergleich zu anderen Krankheiten, wie falscher und echter Mehltau, Rotbrenner und Schwarzfleckenkrankheit wohl am schwierigsten zu bekämpfen ist.

In der Natur ist die Teleomorph dieses Deuteromyceten (Botryotinia fuckeliana de Bary) selten. Botrytis cinerea kann als einziger Parasit bei entsprechend günstigen Infektion- und Witterungsbedingungen die Rebe während des ganzen Jahres infizieren und sämtliche grünen Rebeile sowie das einjährige Holz befallen. Die Resistenz der Beeren dem Parasiten gegenüber ändert sich im Laufe der Entwicklung; mit fortschreitender Reife werden sie besonders anfällig. Unmittelbar nach der Blüte können jedoch Traubensprosse durch die sich auf abgestorbenen Blütenresten entwickelnde Botrytis infiziert werden (Früh Botrytis), was zum Abfallen der Gescheine oder zur Schädigung der jungen Beeren zur Zeit des Traubenschlusses führen kann. Für einen erfolgreichen Befall und die Ausbreitung des Pilzes spielt die Feuchtigkeit eine entscheidende Rolle; von der Temperatur hingegen ist Botrytis cinerea-Befall wenig abhängig. Bei einer Analyse über das Vorkommen der Graufäule in verschiedenen Ländern stellte Mathys (1982) eine abnehmende Bedeutung der Krankheit mit zunehmender Trockenheit der Gebiete fest.

Botrytis-Befall beeinflusst die Ernte nicht nur quantitativ sondern vermindert auch die Qualität der Weine (Ribereau-Gayon, 1982; Naudin, 1982), vorallem wenn bei starken Befall die Ernte frühzeitig erfolgen

muss. Wegen der beachtlichen wirtschaftlichen Verluste, ist die Bekämpfung der Graufäule von grosser Bedeutung. Anfälligkeitsunterschiede bei den Rebsorten lassen sich auf Festigkeit der Trauben, Dicke der Beerenhaut, Zusammensetzung der Wachse der Kutikula (Besselat, 1983) sowie den Aufbau der Trauben und die Anordnung der Beeren zurückzuführen. Resistente Rebsorten, die von Botrytis cinerea nicht befallen werden, sind jedoch bis jetzt noch nicht gefunden worden.

Neben fachgerechten Kulturmassnahmen, Schnitt, Auslauben und vernünftiger Düngung, spielt der Einsatz von Fungiziden eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung des Erregers. Die Einführung der ersten spezifisch und systemisch wirkenden Fungiziden, die MBC-Fungizide (Methylbenzimidazol-Carbamate und Vorstufe, Abb.1.) führte zu ausserordentlich guten Wirkungen. Nach 12 bis 15 Behandlungen trat aber erhöhte Resistenz auf und die Präparate konnten im Weinbau nicht mehr eingesetzt werden (Schüepp, 1974; Schüepp und Lauber, 1977). Nach der Einführung der zweiten Generation von Wirkstoffen gegen Botrytis cinerea, den Dicarboximiden (Abb. 1), wurde der möglichen Resistenzentwicklung gegen diese Fungizid grösste Aufmerksamkeit geschenkt. Schon bald musste festgestellt werden, dass sich auch bei den Dicarboximiden, die als Kontaktfungizide zu betrachten sind, im Freiland Resistenz zu entwickeln begann, die aber regional verschieden war, ein niedriges Resistenzniveau zeigte und mit der Wirkung der Präparate nicht korreliert war (Beetz und Lorenz, 1983).

In vitro konnten sich Botrytis cinerea-Stämme an sehr hohe Fungizidkonzentrationen adaptieren (Leroux et. al., 1977). Da bis heute noch keine Ersatzprodukte zur Verfügung stehen, werden Bekämpfungsstrategien entwickelt, um die Dicarboximide möglichst lange zu erhalten. Das Fungizid Z 1 stellt ein neues Botrytis-Mittel dar. Aus den Erfahrungen mit den vorherigen Fungiziden ist es nötig, Risikofaktoren von Resistenzbildung in vitro und im Freiland möglichst genau, noch vor seiner Einführung abschätzen zu können. Resistenzbildung ist einerseits vom spezifischen Wirkungmechanismus der Fungizide und andererseits von der grossen genetischen Variabilität des Pilzes abhängig. Der primäre Wirkungmechanismus der Dicarboximide ist, im Gegensatz zu den MBC-Fungiziden, nicht bekannt. Pappas und Fisher (1979) weisen auf einen Einfluss beim Lipidstoffwechsel hin und Fritz und Mitarbeiter (1977) stellten auch Hemmungen bei der DNA-Synthese fest, die aber nicht als primäre Ursachen zu betrachten sind. Die Fungizide dieser Gruppe wirken in ersten Linie auf Botrytis und

Monilia, also Anamorphe von Sclerotiniaceae (Buchenauer, 1976).

Die Variabilität und Formenmannigfaltigkeit der Gattung Botrytis stellte vor allem ein erhebliches taxonomisches Problem dar. Erst zu Anfang dieses Jahrhunderts wurde ein Teil der morphologischen Unterschiede zwischen einzelnen Herkünften der Pilze als Ausdruck einer natürlichen Variabilität erkannt. Früher wurden Herkünfte, bei der Unterschiede auftraten als neue Arten aufgefasst: was zu einer grossen Anzahl von Arten geführt hat. Mit der Entwicklung neuerer Untersuchungsmethoden wurde dann dieser Formenreichtum als Folge bestimmter cytologisch-karyologischer Eigenheiten, nämlich der Heterokaryose erkannt. Heterokaryose bezeichnet das Vorkommen genetisch verschiedener Kerne in Hyphenzellen, wobei Anastomosen zwischen Hyphen verschiedener Stämme mit nachfolgendem Kernaustausch oder Mutationen in einem oder mehreren Kernen eines Pilzthallus zur Entstehung der Heterokaryonten bei Hyphomyceten führen (Ross, 1979). Mit Hilfe von Kernfärbung stellte Menzinger (1965) sehr variable Anzahl von Kernen in Konidien und Hyphen innerhalb der Gattung Botrytis fest und beobachtete die Auswanderung von Kernen durch Anastomose und Uebertritt durch Septenporen von Zelle zu Zelle. Bei Heterokaryonten besteht beim Phänotyp ein Zusammenspiel mehrerer Kerne, sodass auch im Fall von haploiden Organismen eine Mutation in einem oder mehreren Kernen von den anderen abgeschirmt werden kann. Die Variabilität innerhalb von fünf Isolaten von Botrytis cinerea wurde z.B. von Lauber (1971) untersucht. Durch Einsporkulturen spaltete er die Wildstämme in reine Linien, die sich nach 10 Merkmalen unterschieden liessen; er fand auch eine Korrelation zwischen Konidiengrösse und Anzahl der pro Zelle vorhandenen Kerne.

Die Einführung der spezifisch wirkenden Fungizide brachte tiefe qualitative Veränderungen der natürlich vorhandenen Populationen von Botrytis cinerea. Der vom Fungizid ausgeübte Selektionsdruck begünstigte das Auftreten von Mutationen zu Resistenzen. Dieser Vorgang erhöht die genetische Variabilität der Populationen; die Resistenz liefert gleichzeitig ein gut definiertes Merkmal um die Stämme zu charakterisieren und ihre Anpassungsfähigkeit zu verfolgen. Der Einbezug von drei Generationen von Fungizide bot neue Möglichkeiten, um die Variabilität und das Populationsverhalten von Botrytis cinerea zu untersuchen. Die Trennung und der

Nachweis von Proteinen und pektolytischen Enzymen ermöglichen Zusammenhänge zwischen Fungizidresistenz und Enzymaktivität abzuklären. Neben Botrytis cinerea-Isolaten von Trauben und Rebholz verschiedener schweizerischer und ausländischer Herkünfte, wurden auch Isolate aus noch nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerfeldern untersucht, um die Veränderungen nach mehrjähriger Applikation von Dicarboximiden mit der ursprünglichen Situation vor dem Fungizid-Einsatz zu vergleichen.

1.2. Begriffe

Der, in dieser Arbeit verwendete Begriff "Resistenz" wird als eine stabile und vererbare Anpassung eines Pilzes an ein Fungizid definiert, die zu einer verminderten Sensibilität bezüglich des Wirkstoffes führt. Das Wachstum und die Entwicklung resistenter Stämme werden nicht oder nur wenig gehemmt von Fungizidkonzentrationen, die bei Wildtyp-Populationen wesentliche Wachstums- oder Entwicklungshemmungen verursachen (Delp und Dekker, 1985). Wenn das Präparat als Pflanzenschutzmittel eingesetzt wird, besteht die Gefahr dass die Population des Erregers unter Freilandbedingungen nach einer gewissen Zeit resistent wird: es entsteht die Feld- oder Freilandresistenz. Die Resistenz kann bezüglich Myzelwachstum und Sporenkeimung ein unterschiedliches Niveau erreichen.

Das Resistenzniveau für das Myzelwachstum wird anhand der Konzentration des Fungizides angegeben, bis zu welcher keine wesentlichen Wachstums-hemmungen oder -veränderungen von Botrytis cinerea auftreten. Bei den Konidien wird das Resistenzgrad aufgrund der prozentualen Keimung umschrieben, wobei der zeitliche Verlauf des Keimvorganges und allfällige morphologische Veränderungen berücksichtigt werden.

Bei der Laborresistenz handelt es sich um eine Veränderung der Sensibilität eines Pilzstammes gegenüber einem Wirkstoff in vitro, d.h. wenn der Resistenztest auf einem für das Wachstum optimalen Nährboden durchgeführt wird.

Im Gegensatz zu den Methylbenzimidazol-Fungiziden, bei welchen die Resistenz irreversibel ist und ein hohes Resistenzniveau zeigt, erfolgt bei den Dicarboximiden eine Resensibilisierung d.h. eine Abnahme des prozentualen Anteils resistenter Stämme innerhalb der Populationen, wenn die Behandlung für ein oder mehrere Jahre ausgesetzt wird.

1.3. Zielsetzung

Um die komplexe Probleme im Zusammenhang mit dem Resistenzverhalten von Botrytis cinerea sowohl im Freiland als auch unter Laborbedingungen gegenüber Dicarboximiden zu erfassen, stellten sich die folgenden Fragen:

- Wie verhält sich die Botrytis cinerea-Population im Rebberg in Abhängigkeit vom Fungizideinsatz ?
- Ist mit einer Resensibilisierung resistenter Populationen nach einem oder mehreren Jahren Behandlungsunterbruch zu rechnen ?
- War die Dicarboximid-Resistenz ursprünglich in der Natur schon vorhanden ?
- Welche Bedingungen führen zur Laborresistenz ?
- Wie können die laborresistenten Stämme charakterisiert werden ?
- Kann Laborresistenz unter Freilandbedingungen auftreten und ist es möglich auch die Freilandresistenz im Labor zu induzieren ?
- Liegen tatsächlich zwei Resistenztypen vor ?
- Besteht eine Korrelation zwischen Laborresistenz, verminderte Pathogenität sowie dem Muster und der Aktivität von pektolytischen Enzymen ?
- Sind Enzymmuster ein geeignetes Kriterium um die Variabilität zu charakterisieren und die Isolate bezüglich Resistenzverhalten zu unterscheiden ?

Da noch keine Untersuchungen mit dem neuen, gegen Botrytis cinerea wirksamen Mittel Z 1 vorliegen, stellen sich zusätzlich folgende Fragen:

- Wirkungsvergleiche zwischen Dicarboximiden und Z 1
- Wie verhalten sich Dicarboximid resistente Isolate gegenüber Z 1 ?
- Gibt es ein ähnliches Resistenzverhalten von Botrytis cinerea gegenüber Dicarboximiden und gegenüber Z 1 ?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchsflächen

Für die Untersuchungen standen insbesondere zwei Rebberge zur Verfügung: die "Dorfrebe" und die "Untere Schlossrebe" auf dem Areal der Eidgenössische Forschungsanstalt in Wädenswil. Sie sind mit Reben der Sorte "Riesling x Sylvaner" bepflanzt (1.20 m Stockabstand x 1.80 m zwischen einzelner Reihen). In diesen Rebbergen wurden lange Jahre zur Hauptsache Spritzprogramme zur Bekämpfung von Botrytis cinerea durchgeführt, wobei seit 1974 Präparate aus der Gruppe der Dicarboximide im Vordergrund standen. In Versuchen mit Kleinparzellen wurden die Fungizide Mancozeb, Dichlofluanid, Folpet und ihre Kombination mit Kupferpräparaten und Dicarboximiden auf ihre Botrytis-Wirkung geprüft. Als unbehandelt wurden die durchgehend mit Mancozeb behandelten Kontrollreihen betrachtet. Mancozeb mit einer eher Botrytis fördernden Wirkung, schützt jedoch die Reben gegen den Falschen Mehltau. Gemäss offizielle Empfehlungen erfolgten vier Behandlungen pro Jahr: nach dem Abblühen (4.7. 1983), vor Traubenschluss (20.7. 1983), beim Weichwerden der Beeren (15.8. 1983) und Ende August (26.8.1983). Gegen Echten Mehltau wurde mit Netzschwefel behandelt.

1982 wurde in der "Untere Schlossrebe" kein Dicarboximid verwendet; die Behandlungen erfolgten ausschliesslich mit Dichlofluanid + Kupfer. Im folgenden Jahr wurde die Hälfte der Reben zusätzlich zu Dichlofluanid + Kupfer erneut mit Vinclozolin (vgl. Abb.1) behandelt, während die andere Hälfte nur mit Dichlofluanid + Kupfer gespritzt wurde. Die einzelnen Varianten umfassten 11 Reihen, 3 Wiederholungen pro Verfahren. Bei 3 Reihen wurde, als Kontrolle durchgehend Mancozeb appliziert. Die Botrytis Behandlungen erfolgten am 29. Juni, 21. Juli, 15. August und am 26. August 1983. Unmittelbar vor der Ernte, Ende September, wurde gleichzeitig mit der Probenahme für die Laborversuchen der Botrytis-Befall ermittelt, wobei der prozentuale Befall jeder einzelnen Trauben als "Beerenbefall" nach einer Skala von 0 bis 10 bestimmt wird. Die Anzahl bonitierte Trauben pro Wiederholung variiert je nach Behang, zwischen 150 und 200. Aus dem Vergleich mit dem Befall in der unbehandelten Variante, kann die

Wirkung des Fungizides berechnet werden. Gegenüber Dicarboximiden sensible Botrytis-Isolate wurden aus Erdbeerfeldern isoliert, in welchen nie Fungizide zur Anwendung gelangt waren. Die Erdbeerfeldern erstreckten sich über Flächen von 2 bis 4.5 a im "Ober Oedischwend" oberhalb Wädenswil, Hombrechtikon, Metmenstetten und Gossau (Zürich). Die Botrytis- Population in diesen Flächen waren bezüglich Dicarboximid-Sensibilität mit denjenigen in Rebbergen vor der ersten Anwendung dieser Wirkstoffe vergleichbar.

Als Vergleich wurden Isolate aus befallenem Rebholz in die Untersuchungen einbezogen, das uns in verdankenswerter Weise von den folgenden Instituten zugesandt wurde :

Station de recherches viticoles et oenologiques, Colmar (France)

INRA Station de pathologie végétale, Pont de la Maye (France)

2.2. Probenahme und Isolierung

Wie oben schon erwähnt, wurden zur Zeit der Auszählung auch Proben für spätere Laboruntersuchungen gesammelt, in der Regel 20 Isolate. Die nachfolgend beschriebene Isolierungsmethode lässt sich auch für Erdbeeren, Rebholz, wie für junge Trauben und Blütenreste anwenden. Im Freiland werden die befallenen Trauben in einem Abstand von mindestens ein Meter gesammelt und einzelne in ein steriles passendes Glasgefäss gegeben. Aus jedem Gefäss werden mit steriler Impfnadel einer Stelle des Pilzrasens wenige Konidienträger und Konidien entnommen und im Zentrum einer Petrischale mit PDA + Antibiotika als Nährsubstrat abgestreift. Nach 2 Tagen Inkubation bei 20°C wird aus dem Rand der gewachsenen Kolonie, Myzel in PDA-Röhrchen übertragen. Die Kolonie wird als ISOLAT bezeichnet.

2.3. Nährmedien und Fungizide

Botrytis cinerea entwickelt sich sehr gut auf synthetischen Medien.

Die, am meisten verwendeten Nährsubstraten sind :

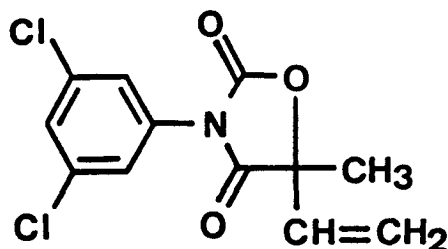
Kartoffeldextroseagar (39 g/l) = Potatoe Dextrose Agar (Difco) = PDA
Malzagar 2% (Malzextrakt 20 g/l, Bactoagar 20 g/l) = Maltextract Agar = MA

PDA begünstigt die Konidienbildung und wird für die Ueberimpfung der Isolate für den Resistenztest angewendet. Nach Autoklavieren (30 Minuten, 120°C) und Abkühlen auf 50°C können Antibiotika zugegeben werden. Die Zugabe von Terramycin und Streptomycin (je 100 µg/ml) ist für die Isolierung besonders wichtig. Zu speziellen Zwecken (Einsporkulturen, Produktion von Mikrokonidien) wird Wasseragar (20 g Bacto Agar/l) eingesetzt.

Die einbezogenen Fungiziden gehören zu den Dicarboximiden und zu den Benzimidazolen. Wegen der eindeutig festgestellten Kreuzresistenz innerhalb der Dicarboximiden (Abb. 1; Leroux et al., 1977; Leroux und Gredt, 1982) erwies es sich als genügend nur eine dieser Substanzen zu betrachten. Alle Untersuchungen werden daher mit Vinclozolin (Handelsname : Ronilan) durchgeführt. Die Mischung der in absolutem Aethylalkohol gelösten Substanz mit MA erfolgt vor dem Giessen der Petrischalen bei 50°C. Der Anteil Aethanol beträgt 1% ; er wird auch den Kontrollschalen zugefügt. Dasselbe gilt auch für den Wirkstoff Z 1, der eine nur geringe Wasserlöslichkeit von 2 µg pro ml hat. In der Abbildung 1 ist die Strukturformel der aktiven Substanzen angegeben. Das hitzestabile Fungizid Derosal (60% Carbendazim) vertritt die Gruppe der Benzimidazolen und wird mit dem Medium vor dem Autoklavieren gemischt. Die Inkubation der Kulturen erfolgt bei 20°C und Dauerbelichtung.

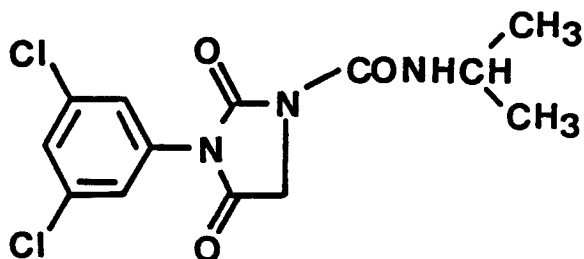
Gruppe der Dicarboximide :

Vinclozolin : 3-(3,5-Dichlor-phenyl)-5-methyl-5-vinyl-1,3-oxazolidin-2,4-dion



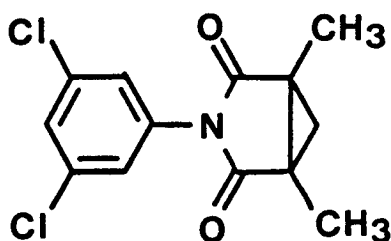
Handelsname : Ronilan

Iprodion : Isopropylcarbamoyl-1-(dichloro-3,5-phenyl)-3-hydantoine



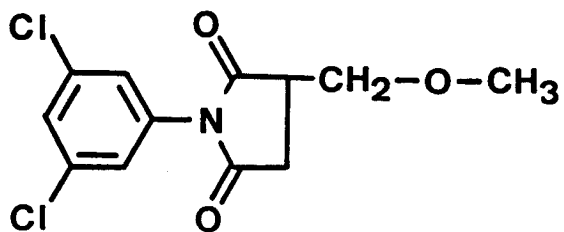
Handelsname : Rovral

Procymidon : N-(3,5-Dichlorphenyl)-1,2-dimethyl-cyclopropan-carboxamid



Handelsname : Sumisclex

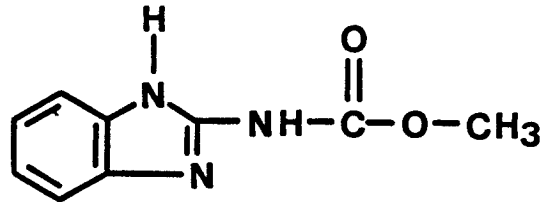
Metomeclan : 1-(3,5-Dichlorphenyl)-3-methoxymethyl-2,5-pyrrolidindion



Handelsname : Drawifol

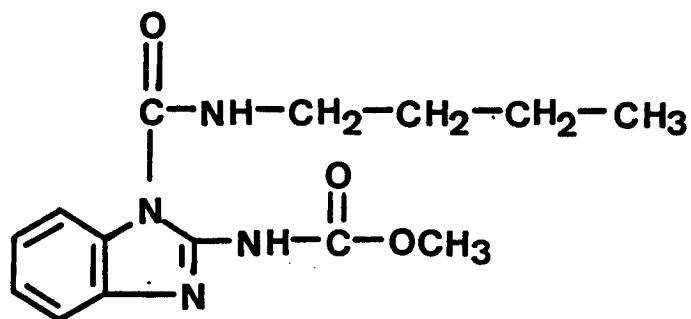
Gruppe der Benzimidazole :

Carbendazim : 2-(Methoxycarbonylamino-benzimidazol)



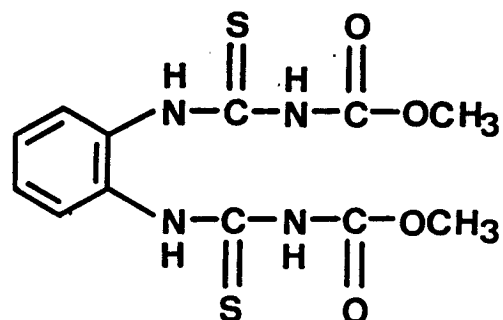
Handelsname : Derosal

Benomyl : Methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolcarbamate



Handelsname : Benlate

Thiophanat-Methyl : 1,2-Bis-(3-methoxycarbonyl-2-thioureido)-benzol



Handelsname : Enovit M

Abb. 1 : Verwendete Fungizide

2.4. Laboruntersuchungen über Resistenz bezüglich Fungiziden

2.4.1. Durchführung und Auswertung des Myzeltests

Eine Sporensuspension der fruktifizierenden Kolonien wird durch Zugabe von sterilem destilliertem Wasser hergestellt. Es folgt eine Filtration durch Glaswatte um Myzelreste zu entfernen und Aggregate von Konidien zu vermeiden. Die Konzentration der Suspension wird auf 10^6 Konidien /ml eingestellt. Nach Applikation der Suspension auf Malzagarrondellen (Durchmesser 10 mm) mit einer ausgezogenen Pasteurpipette (30 μ l im Durchschnitt pro Rondelle) werden die Konidien 16 Stunden bei 20°C inkubiert. Dadurch haben alle keimfähigen Konidien gekeimt; es werden jedoch noch keine neuen Sporen gebildet. Der Ansatz des Myzeltests besteht deshalb ausschliesslich aus vegetativen Hyphen. Die Malzagarrondellen werden mit der bewachsenen Seite nach unten, auf Petrischalen mit Fungizid-Malzagarrondellen aufgetragen. In einem Versuch zeigt es sich, dass kein wesentlicher Unterschied besteht, ob die Malzagarrondellen mit der bewachsenen Seite nach unten oder nach oben aufgetragen werden. In der Regel werden die drei Wiederholungen pro Fungizidkonzentration in dieselbe Petrischale nach dem in Abbildung 2 angegebenen Schema aufgetragen.

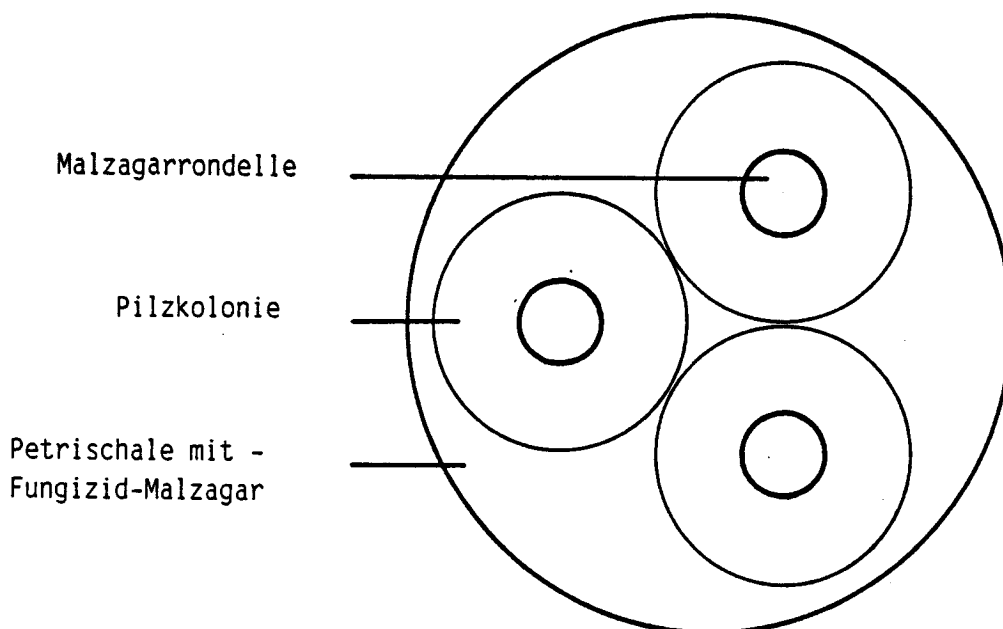


Abb. 2 : Schema des Myzeltests

Nach einer 5 tägigen Inkubation bei 20°C wird der Durchmesser der sich entwickelten Kolonien ermittelt : dabei werden die 10 mm der Malzagar-rondelle abgezogen. Befinden sich die drei Wiederholungen in einer Petri-schale, dann hemmen sie sich gegenseitig nachdem die maximale Ausbreitung der Kolonie erreicht ist. Die zur Verfügung stehende Fläche hat in diesem Fall einen Durchmesser von 45 mm. Je nach Wachstum auf den verschiedenen Fungizidkonzentrationen können die Freilandisolate nach Resistenzgraden eingeteilt werden (Tab.1; Abb.3).

Tab. 1 : Schema zur Beurteilung nach Resistenzniveau. Als 100 % wird der Durchmesser der Kolonien in der Kontrolle bezeichnet

Resistenzniveau	Wachstum nach 5 Tagen auf Malzagar mit den folgenden Fungizidkonzentrationen		
	1 µg/ml	3 µg/ml	10 µg/ml
sensible Isolate	50 %	0	0
1 µg/ml resistente Isolate	50 %	50 %	50 %
3 µg/ml resistente Isolate	100 %	50 %	50 %

Mit zunehmender Wirkstoffmenge ändert sich die Myzelentwicklung der Isolate sowohl qualitativ wie quantitativ. Sie zeigen auf subletalen Fungizidkonzentrationen einen kompakten Myzelring um die Agarrondelle und sehr reduziertes Radialwachstum. Das Myzel ist durch verdickte und reichlich verzweigte Hyphen gekennzeichnet (Abb.4). Auf letalen Konzentrationen ist kein Wachstum möglich. Aus einzelnen Rondellen können sich auf subletalen sowie auf letalen Konzentrationen nach 3 bis circa 15 Tagen resistente Kolonien entwickeln. Entstehen sie aus gehemmten Myzel, bildet sich sektorielles Wachstum (Abb.5). Auf höheren Konzentrationen hingegen,

können resistente Kolonien auftreten, ohne dass sich zuvor stark gehem-
mtes Myzel mit abnormalem Wachstum gebildet hat. In diesem Falle sind
die resistenten Hyphen homogen um die Agarrondelle verteilt.

Diese Stämme werden als laborresistent bezeichnet.

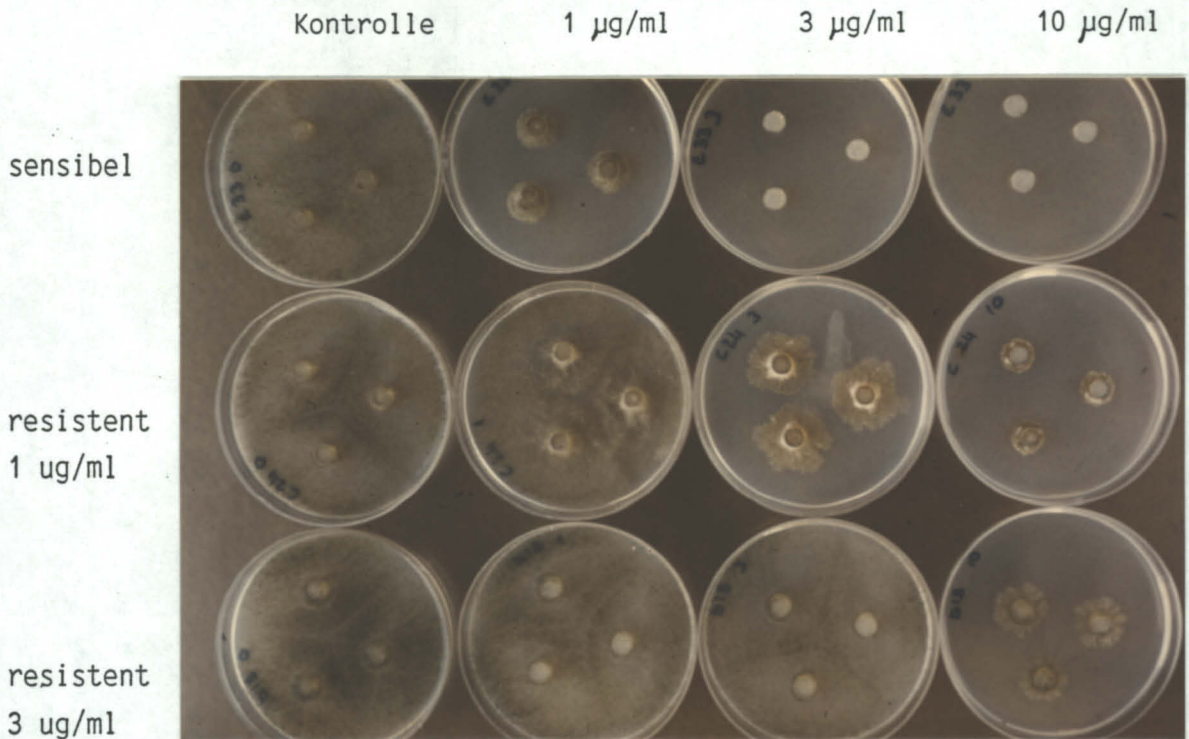


Abb. 3 : Resistenztest mit Myzel : sensible, 1 und 3 $\mu\text{g/ml}$ resistente
Isolate

Die Wachstumsgeschwindigkeit der neu auftretenden resistenten Stämmen
auf Fungizidagar kommt derjenige auf der Kontrolle gleich und in den
meisten Fällen setzt sich nach einiger Zeit die asexuelle Fruktifika-
tion ein. Die Laborresistenz tritt spontan auf oder kann mit mutagen-
en Stoffen künstlich induziert werden. Das Wachstum der laborresisten-
ten Stämme wird auch bei höheren Konzentrationen der Wirkstoffe über-
prüft. Da die Wachstumsmessungen sich über mehrere Tage erstrecken,
kann nur eine Malzagarrondelle pro Petrischale aufgetragen werden.
Je nach Versuchsanordnung werden die Rondellen direkt aus dem Rand der
Kolonien auf niedrigeren Konzentrationen (1 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ Vinclozolin
bzw. Z 1) ausgestochen oder es wird die oben beschriebene Methode mit

Sporensuspension verwendet. Bei laborresistenten Stämmen treten manchmal Sektoren auf, die ein beschleunigtes Wachstum zeigen. Bei nicht kreisrunden Kolonien wird der grösste und der kleinste Durchmesser ermittelt.

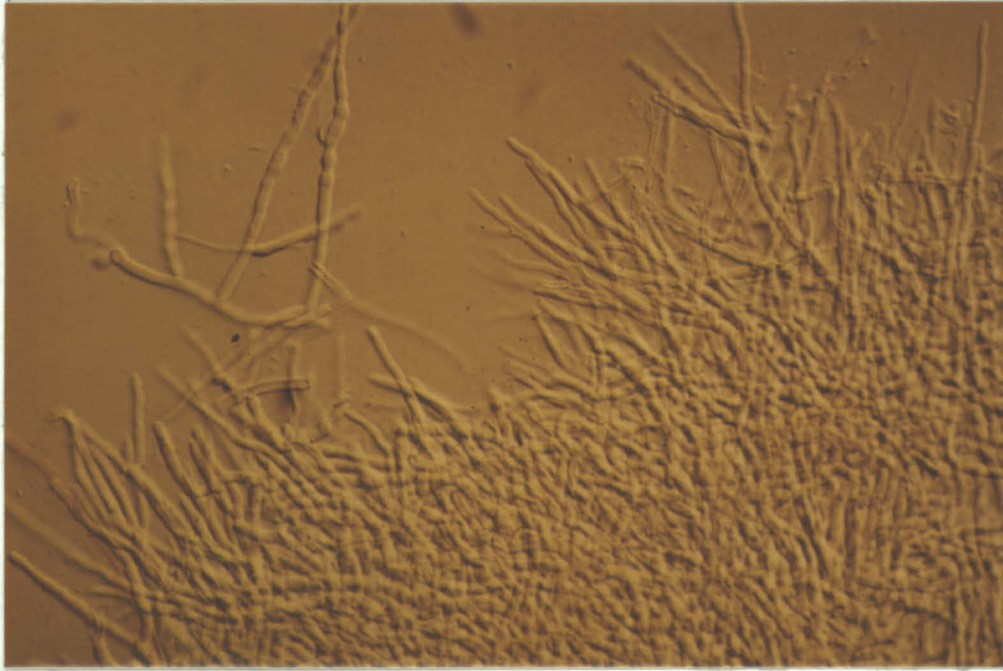


Abb. 4 : Kompaktes gehemmtes Myzel um die Malzagarrondelle auf Fungizidagar. Vergrößerung : 200x



Abb. 5 : Sektorenbildung entstehend aus gehemmtem Myzel

2.4.2. Prüfung der Keimfähigkeit der Konidien

Als Ausgangsmaterial zur Prüfung der Keimfähigkeit dient eine Konidien-suspension in sterilem destilliertem Wasser. Die auf eine bestimmte Konzentration eingestellte Konidien-suspension wird entweder auf fungizid-haltige Malzagarrondellen pipettiert oder auf Petrischalen mit demselben Substrat ausplattiert. Im ersten Falle wird die prozentuale Keimrate der Konidien auf zunehmenden Konzentrationen des Wirkstoffes bestimmt und im zweiten Fall wird das Vorhandensein einzelner resistenter innerhalb einer sehr grossen Anzahl sensibler Konidien überprüft. Die Bestimmung der Keimrate erfolgt unter dem Mikroskop durch Auszählung der gekeimten Konidien nach 16 Stunden Inkubationszeit bei 20°C. Pro Konzentration werden 4 Wiederholungen durchgeführt, wobei die Rondellen mit den Sporen auf einem sterilem Objektträger inkubiert werden. Die Konidien werden in drei bis fünf, auf die Rondellen zufällig verteilten Gesichtsfeldern ausgezählt. Die Konzentration der Sporen beträgt 10^5 Sporen/ml. Als gekeimt werden Konidien betrachtet, deren Keimschlauch mindestens so lang wie die Konidie selbst ist. Auf subletalen Konzentrationen bildet sich abnormale Keimschläuche mit stark verzweigten und verdickten Hyphen. Die Konidien werden nur dann als gekeimt ausgezählt falls die Zellwände der Keimschläuchen unzerstört sind und kein Austreten des Cytoplasmas feststellbar ist.

Untersuchungen über resistenten Konidien sensibler Freilandisolaten erfordern eine beachtliche Anzahl Sporen. Die Konzentration und die ausplattierende Menge der Konidien-suspension werden so ausgewählt, dass innerhalb 10 beziehungsweise 20 Wiederholungen 4 bis 30 Millionen Konidien mit einem gebogenen Glasstab auf Fungizid-Malzagar verteilt werden. Die Auswertungen erstrecken sich, je nach Versuchsanordnung, bis maximal 6 Tage. Die Anzahl, die morphologischen Eigenschaften und das radiale Wachstum der auftretenden Kolonien auf fungizidhaltigem Malzagar werden festgestellt. Wegen der hohen Keimungsrate von Rotrytis cinerea-Sporen auf Malzagar (95%) ist es nicht möglich die Entwicklung einzelner Kolonien bei so hoher Konidiendichte zu verfolgen, daher werden auf fungizidfreiem Malzagar etwa zehn voneinander getrennte Konidien pro Petrischale ausplattiert. Aufgrund der Resistenz der Konidien können

durch diese Methode, die folgenden Kolonientypen auf 3 µg/ml Vinclozolin haltigem Malzagar unterschieden werden :

I) Punktförmige Kolonien (=gehemmte Kolonien)

Der sehr beschränkte Thallus dieser Kolonien (3-5 mm im Durchmesser nach 17 Tagen) besteht aus abnormal verzweigten Hyphen, deren Längenwachstum durch das Fungizid gehemmt wird. Die asexuelle Fruktifikation wird bei gewissen Isoaltnen jedoch nicht beeinflusst, sodass auch bei diesen stark gehemmten Kolonien Konidienträger und Konidien entstehen können.

II) Verzögert wachsende Kolonien

Die Wachstumsrate auf fungizidhaltigem Malzagar ist nicht konstant und verlangsamt. Am 6. Tag nach Ausplattierung ist der Radius der Kolonien kleiner als 20 mm. Diese Eigenschaft ist auf das gehemmte Wachstum der Hyphen nach der Konidienkeimung zurückzuführen. Erst nach dem 4. Tag kann sich ein normales Myzel entwickeln.

III) Normal wachsende Kolonien

Sie kennzeichnen sich durch eine konstante radiale Wachstumsrate von 5-8 mm in 24 Stunden und keine Veränderung in der Morphologie des Myzels während der vegetativen Phase.

Aus mikroskopischen Betrachtungen ist ersichtlich, dass es neben den drei erwähnten Kolonientypen, auch Konidien gibt, die zwar keimen können, sich jedoch nicht weiterentwickeln.

2.4.3. Einsporkulturen

Zur Herstellung von Einsporkulturen wird die Konidien suspension durch sterile Glaswatte filtriert, worin Myzelfragmente und Sporenaggregate zurückgehalten werden. Die einzeln suspendierten Sporen werden auf Wasseragar in Petrischalen ausplattiert. Um Anhäufungen von Konidien zu vermeiden, werden 100 µl einer verdünnten Suspension (100 Konidien/ml) auf dünn gegossenen Wasseragar mit einem gebogenen Glasstab verteilt. Unter dem Mikroskop werden mit Hilfe einer spitzen Nadel Agarstückchen von einigen Quadratmillimetern Größe mit einer einzelnen, gekeimten

Spore herausgeschnitten und auf Nähragar übertragen ; es hat sich gezeigt, dass das Uebertragen gekeimter Konidien (14-16 Stunden Inkubation) mehr Erfolg für die spätere Entwicklung der Konidien bringt. Nach der Uebertragung auf PDA oder MA wird nochmals überprüft, ob es sich tatsächlich nur um eine einzige Spore handelt.

2.4.4. Behandlung mit mutagener Substanz

Nach Vorversuchen wurde eine Standardmethode zur Behandlung von Botrytis cinerea mit mutagenen Substanzen festgelegt. N-Methyl-N' nitro N-nitroso-guanidin wird doppelkonzentriert (20 mM) in 3 ml sterilem destilliertem Wasser gelöst und mit 3 ml Konidiensuspension gut gemischt. Die Konzentration der Konidien entspricht derjenigen des oben beschriebenen Myzel- oder Keimtests gegenüber Fungiziden. Nach 30 Minuten Einwirkungszeit bei Raumtemperatur werden die Konidien durch Milliporfiltration (Porengrösse 0.8 µm) und nachfolgende Spülung mit sterilem destilliertem Wasser dem Einfluss der Substanz entzogen. Nach Einlegen des Filters in sterilem Wasser lösen sich die Konidien und können auf Malzagarrondellen tropfenweise appliziert werden.

2.5. Der Apfeltest

Der Apfeltest dient als ein Kriterium zur Bestimmung von Fitness und Pathogenität der Isolate und Stämme. Es werden Früchte der Sorte "Golden Delicious" in einem guten Reifzustand und mit intensiv gelb gefärbter Schale verwendet. Zur Entfernung von Epiphyten wird die Oberfläche mit 70 % igem Aethylalkohol abgerieben und bei sterilen Bedingungen trocknen lassen. Die Infektion wird durch die Verletzung der Schale mit einem Korkbohrer (Durchmesser 10 mm) begünstigt. Als Wiederholung werden Aepfel einzeln in sterile Glaspetrischalen gelegt. Es wird darauf geachtet, dass die drei Wiederholungen eines Isolates oder Stammes auf verschiedene Früchte verteilt sind. Als Inokulum dienen Malzagarrondellen mit Konidien nach 16 stündiger Inkubation, die mit der bewachsenen Seite nach unten auf die Verletzung übertragen werden. Nach 5 Tagen Inkubation bei 20°C werden zwei aufeinander senkrecht stehende Durchmesser der Fäulnis ermittelt (Abb.6).



Abb. 6 : Apfeltest mit pathogenen und nicht pathogenen Isolaten mit je drei Wiederholungen

2.6. Bestimmung der Konidienkonzentration

Vor allem bei den Untersuchungen über die Keimungsrate der Konidien aber auch bei der Prüfung von Myzelresistenz und den Infektionsversuchen ist die Einstellung der genauen Konzentration der Konidien in der Suspension von grosser Bedeutung. Diese Bestimmung erfolgt durch Auszählen der Konidien in einer Neubauerkammer.

Die Intensität der Sporulation der verschiedenen Isolaten wird durch Auszählen der Konidien in den voll bewachsenen Petrischalen (Durchmesser 85 mm) nach 14-tägiger Inkubation bestimmt. Die Konidien werden mit Hilfe einer Impföse in einer salzhaltigen Lösung (Isoton II, Counter Electronics) suspendiert und durch Glaswatte zur Entfernung von Myzelresten filtriert. Die Anzahl der Partikel mit einem Durchmesser zwischen 4 und 10 μm werden in einem Volumen von 50 μl mit dem Coulter Counter Modell ZM (Counter Electronics), Kapillaröffnung 40 μm , bestimmt. In der Regel erfolgen 6 Auszählungen pro Wiederholung.

2.7. Nährmedien für Enzymproduktion

2.7.1. Pektinmedium

Botrytis cinerea wird in dem, von Zalewska und Urbanek (1975) angegebenen Nährmedium kultiviert. Neben Mineralsalze und Vitamin B₁ enthält es pro Liter 15 g Pektin aus Citrus-Früchten (Sigma) und 1 g Glucose als C-Quelle. Als Inokulum werden 7-tägige Kulturen auf PDA Schalen verwendet, wobei der Thallus mit einer Impfnadel abgekratzt und mit Wasser abgespült wird. Ein-Liter Erlenmeyer Flaschen, die je 190 ml Medium und 10 ml Inokulum enthalten, werden bei 28°C in Dunkelheit 14 Tage inkubiert. In den Standkulturen wächst das Myzel hauptsächlich an der Oberfläche.

2.7.2. Gewaschene Apfelzellen

Der Gehalt an Mineralsalzen und Vitaminen blieb gleich wie bei Pektinmedium wobei 5 g gewaschene Apfelzellen das Pektin ersetzen. Zur Vorbereitung der Apfelzellen wird die modifizierte Methode von Brown und Adikaram (1982) und von Brown (1984) verwendet.

100 g Schalen von gefrorenen Äpfeln der Sorte "Golden Delicious" werden mit 200 ml 0.1 M KCl 5 Minuten bei 4°C homogenisiert und durch Nylon Filter filtriert.

Das zurückgebliebene Homogenisat wird zweimal mit je 200 ml destilliertem Wasser während 10 beziehungsweise 60 Minuten gewaschen. Es folgen eine Spülung mit 200 ml Aceton von - 20°C und eine zweite mit Aceton von 0°C von je 15 Minuten. Schliesslich verdampft das restliche Aceton durch Erwärmung des Zellwandmaterials auf 50°C über Nacht. Die getrockneten Apfelzellen werden vor dem Autoklavieren zum Nährmedium gegeben. Alle Arbeiten werden auf Eis durchgeführt.

2.8. Reinigung der Proteine

Die Polygalacturonasen, Pektinlyasen und Pektinesterasen sind extracelluläre Proteine und daher im Medium nachweisbar. Nach 14 Tagen Inkubation ist die gesamte Oberfläche des Nahrsubstrates mit einer Myzelschicht

überwachsen, wobei sich auch eine kleine Menge von Hyphen submers entwickelt. Das Myzel wird mittels Zentrifugation (10 Min. bei 10.000 u.p.m.) vom flüssigen Substrat getrennt. Nach Sättigung auf 0.95 mit Ammoniumsulfat fallen die Proteine als weisser Niederschlag aus. Die Proben werden 4 Stunden bei 0°C stehen gelassen. Später wird nochmals zentrifugiert (15 Min. bei 17.000 u.p.m.), das Pellet wird in destilliertem Wasser gelöst und gegen destilliertem Wasser während drei Tagen bei 0°C dialysiert. Das Wasser wird jeden Tag erneuert. Während der Dialyse bleiben gewisse Partikel ungelöst und können abzentrifugiert werden (15 Min., 17.000 u.p.m.). Zur Konzentration der Proteine werden sie gefriergetrocknet und später in einem kleineren Volumen (700 µl bis 2 ml) destillierten Wasser resuspendiert. Ungelöste Teilchen können durch Zentrifugation (15 Min., 2000 u.p.m.) entfernt werden. Die wässrige Proteinlösung wird bei -20°C aufbewahrt.

2.9. Bestimmung der Proteinkonzentration

Lowry und Mitarbeiter (1951) entwickelten eine Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit Folin Phenol Reagens. Diese Methode kommt auch bei dieser Arbeit zur Anwendung. Der Proteingehalt wird photometrisch (Kontron Spektrophotometer) bei 620 nm bestimmt wobei Bovin Serum Albumin als Eichsubstanz dient. Pro Messpunkt wird eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.10. Gelelektrophorese

Zur Trennung der Proteine dient die isoelektrische Fokussierung und die Isoenzyme werden durch spezifische Färbemethoden identifiziert. Der gemessene pH-Gradient von der Anode zur Kathode erstreckt sich von pH 2.5 bis pH 8.7. Um die Gesamtheit der Proteine zu erfassen, wird ein Ampholyt mit breitem pH Spektrum ausgewählt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgt auf horizontal gelegten Polyacrylamid Gelen, deren Zusammensetzung in der Tabelle 2 angegeben ist.

Tab. 2 : Polyacrylamid Gel

Acrylamid	29.1 % (w/v)	8.5 ml
N-N'-Methylenbisacrylamid	0.9 % (w/v)	8.3 ml
Glycerin	87 %	5.8 ml
Ampholyt pH 2-11 (Serva)		2.3 ml
Ammonium persulfat	1 % (w/v)	1.25 ml
N,N,N',N'-Tetramethyl- aethylendiamid (TEMED)		20 µl

Nach Mischung der angegebenen Reagenzien und Abfüllung mit destilliertem Wasser auf 50 ml, wird die Lösung 10 Minuten an der Wasserstrahl Pumpe entlüftet. Ammonium-persulfat und TEMED ermöglichen die Polymerisation und werden unmittelbar vor dem Giessen zugegeben. Die Polymerisation des Gels (2mm dick), in einer Desaga Polymerisations-Kuvette, dauert eine Stunde bei Raumtemperatur. Die IEF wird mit einer gekühlter Elektrophorese Kammer (Desaga) durchgeführt. Als Kontaktflüssigkeit auf der Kühlplatte wird n-Decan und als Elektrolyt Lösungen 1 M NaOH für die Kathode und 1 M H_3PO_4 für die Anode verwendet. Die Probe werden mit Applikationsstreifen aus Silikon auf das Gel getragen. Die Spannung am Power Supply muss von Hand reguliert werden, wobei sich Laufzeiten und Spannung für diese Gele in Vorversuchen definieren lassen (Tab.3). Die Menge aufgetragenen Proteine variiert je nach Konzentration zwischen 10 und 15 µl. Nach Beendigung der IEF wird ein Gelstreifen zur Bestimmung des pH-Gradienten mittels einer Oberflächenelektrode abgeschnitten.

2.11. Protein und Isoenzym Färbung

Die nach isoelektrischen Punkten getrennten Proteine werden durch Färbung nachgewiesen. Unmittelbar nach der IEF werden sie vor Färben 30 Minuten fixiert. Zur Fixierung wird die folgende Lösung verwendet :

17.3 g Sulfosalycilsäure
 57.5 g Trichloressigsäure
 destilliertes Wasser ad 500 ml

Bei diesem Vorgang wird auch den Ampholyt grossenteils ausgewaschen. Zur Anpassung des pH an denjenigen der Färbelösung und zur Entfernung des restlichen Ampholyten, verbleiben die Gele noch 30 Minuten in der Entfärbelösung (Tab.4). Die Färbung mit Comassie Blue R 250 dauert 2 Stunden bei gelegentlichem Schütteln. Die einzelnen Banden kommen nach Entfärbung des Gels nach mehrmaligem Wechsel der Lösung zum Vorschein. Eine vollständige Entfärbung der Gelplatte wird durch Stehenlassen in der Entfärbelösung über Nacht erreicht.

Tab. 3 : Verwendete Laufzeiten, Spannungen (V) und Verlauf des Stromes (mA) während der durchgeführten IEF

Vorfokussierung ohne Proben	30 min.	200 V	23.0 mA - 13.0 mA
Zugabe der Proteine	30 min.	200 V	13.0 mA - 10.0 mA
	30 min.	300 V	15.0 mA - 11.0 mA
	60 min.	400 V	15.0 mA - 6.0 mA
	30 min.	500 V	7.5 mA - 4.5 mA
	30 min.	600 V	5.5 mA - 4.5 mA
	60 min.	800 V	6.5 mA - 5.5 mA
	40 min.	1000 V	7.0 mA - 6.5 mA

Tab. 4 : Zusammensetzung der Färbe- und Entfärbelösung

Entfärbelösung	250 ml Aethanol (abs.) 80 ml Eisessig destilliertes Wasser ad 1000 ml
Färbelösung	460 mg Comassie Blue R 250 Entfärbelösung ad 400 ml

Der Vorteil der IEF besteht darin, dass keine Denaturierung der Proteinen während des Trennprozesses stattfindet. Die biologische Aktivität bleibt daher erhalten. Zum Nachweis von Polygalacturonase-Isoenzymen (PG) sowie von Pektin-Lyase-Isoenzymen (PL) werden die Gelplatten mit Ruthenium-Rot gefärbt (Lisker und Redig, 1974). Da die beiden Enzymgruppen unterschiedliche pH Optima besitzen, müssen die Gelplatten unmittelbar nach der IEF vor der Färbung in die entsprechende Pufferlösung (30 Min.) gelegt werden, um das pH der Gele denjenigen der Substratlösung anzugleichen.

Polygalacturonasen weisen maximale Aktivitäten im sauren pH Bereich (pH 4-5) und Pektin-Lyasen in leicht alkalischem Milieu mit CaCl_2 (pH 8-9) auf. Für PG wird 20 mM Citrat Puffer (pH 4.8) und für PL 20 mM Tris HCl Puffer (pH 8.3) verwendet. Das Substrat für PG besteht aus 1.2% Polygalacturonsäure in 20 mM Citrat Puffer (pH 4.8) und für pL aus 0.9% Pektin in 20 mM Tris HCl Puffer (pH 8.3) mit 0.002 M CaCl_2 . Die Gele werden mit den entsprechenden Substratlösungen 20 Minuten bei 30°C inkubiert, gründlich mit destilliertem Wasser gespült und in eine 0.05% ige Ruthenium-Rot Lösung eingetaucht. Beim Sichtbarwerden der Banden wird der Farbstoff durch destilliertes Wasser ersetzt. Die aktiven Banden bleiben in einem rot-violettem Hintergrund farblos. Pektin-Esterasen werden als dunkle Banden bei denselben Gelplatten wie Pektin-Lyasen nachgewiesen (Cruickshank, 1983; Cruickshank und Wade, 1980).

2.12. Aktivitätsbestimmung der Polygalacturonasen

2.12.1. Die Methode mit Dinitrosalycilsäure

Die Anwendung von Dinitrosalycilsäure zur Bestimmung reduzierenden Zuckern ist schon seit langem bekannt. Nelson (1944) schlug eine Methode vor, die von Somogyi (1951) und später von Miller (1959) modifiziert wurde der die folgende Zusammensetzung der Reagenslösung für den photometrischen Nachweis beschrieb:

1	%	Dinitrosalycilsäure
0.2	%	Phenol
0.05	%	Natriumsulfit
1	%	Natriumhydroxid

Zur Charakterisierung der Polygalacturonase Aktivität wird in einem ersten Experiment die Menge freigesetzter Galacturonsäure zu einem einzigen Zeitpunkt (nach 30 Minuten) in Abhängigkeit verschiedener Enzymkonzentrationen bestimmt und in einem zweiten Experiment wird der zeitliche Verlauf der Galacturonsäureproduktion bei Verwendung einer Enzymkonzentration (100µg pro 1.5 ml) verfolgt. In allen Versuchen wird Enzymlösung und Substrat im Verhältnis 1:2 (v/v) d.h. 0.5 ml : 1 ml wendet. Das Substrat besteht aus 1% Polygalacturonsäure in 0.1 M Natrium Acetat Puffer pH 4.0. Die Abbaureaktion erfolgt in einem auf 30°C geheizten Wasserbad. Nach einer bestimmter Zeit wird zur Enzymsubstratlösung eine gleiche Menge Reagenslösung vermischt und während drei Minuten in kochendem Wasser inkubiert. Bei diesem Vorgang entwickelt sich die Farbe, deren Intensität nach Abkühlung der Reagensgläser mit Leitungswasser bei der Wellenlänge von 575 nm (Kontron Spektrophotometer) gemessen werden kann. Es wird immer eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Herstellung der Eichkurve werden bekannten Konzentrationen von Galacturonsäure verwendet. Als Nullpunkt der Absorption dienen sowohl Proben mit Enzymen ohne Substrat als auch solche mit Substrat und inaktiven Enzymen. Die Inaktivierung der Enzymen erfolgt durch Kochen der Enzymlösung für 3 Minuten. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität werden, wie oben erwähnt Enzymkonzentrationen durch Verdünnung mit destilliertem Wasser auf Eis eingestellt. Die höchste verwendete Enzymkonzentration ist von Pilzkultur und Nährmedium abhängig. Beim Pektinmedium umfasst sie Werte zwischen 58 und 114 µg/ml und beim Medium mit gewaschenen Apfelzellen 93 bis 227 µg/ml, die je nach Medium bis 4 µg/ml beziehungsweise auf 1.3 µg/ml reduziert werden. Der zeitliche Verlauf der Freisetzung reduzierenden Zuckern wird durch Messungen nach Inkubationszeiten von 10, 40, 90, 105 und 120 Minuten, bei der Enzymkonzentration von 100 µg pro 1.5 ml charakterisiert.

2.12.2. Die Methode mit Thiobarbitursäure

Die Polygalacturonase Aktivität kann mittels Reaktion der beim Polymerabbau entstehenden Carbonylverbindungen mit Thiobarbitursäure (TBS) bestimmt werden. Der ursprünglich zur Untersuchung der Abbauprodukte von Fetten beschriebene Test (Schmidt, 1959) wurde von Neukom (1960) zur

Bestimmung des Zuckersabbaues modifiziert. Ayers und Mitarbeiter (1966) publizierten eine Methode mit TBS zur Bestimmung von Polygalacturonasen bei Rhizoctonia solani. Das Substrat für die Enzym Reaktion hatte die folgende Zusammensetzung : 3 ml 1 prozentige Polygalacturonsäure, 750 µl 0.1 M Acetat Puffer pH 5.0, 750 µl 10 mM CaCl₂. Der pH der Polygalacturonsäurelösung wird mit 1 M NaOH auf pH 5.0 eingestellt.

Bei den vorliegenden Untersuchungen beträgt die Enzymkonzentration beim Pektinmedium 33 µg/ml, beim Medium mit gewaschenen Apfelzellen 155 µg/ml bis 201 µg/ml je nach Pilzkultur. Je 3 ml der Enzymlösung werden mit der Substratlösung gut vermischt und während 60 Minuten auf 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 450 µl 9% ZnSO₄·7H₂O (w:v) gefolgt von 450 µl 0.5 N NaOH wird die Reaktion gestoppt, das nicht abgebaute Substrat sowie Enzym-substrat- Komplexe fallen aus und werden durch Zentrifugieren (16.000 g, 15 Minuten, Sorwall) entfernt.

Aus dem Ueberstand werden 2.5 ml in Reagensgläser gegeben, die 1.5 ml 40 mM TBS, 750 µl 1 N HCl und 250 µl H₂O enthalten. Die Herstellung der Eichkurve wird mit Galacturonsäure durchgeführt. Die, während 30 Minuten bei 100°C aus der Reaktion zwischen Carbonyl Verbindungen mit TBS sich entwickelte Farbe kann bei 515 nm gemessen werden, womit die Aktivität der PG bestimmt ist. Als Nullpunkt während der Bestimmung, dient eine Probe ohne Substrat sowie solche mit Substrat und inaktivem Enzym.

Bei der Darstellung der Resultaten wird die Konzentration der freigesetzten Galacturonsäure pro 100 µg Protein angegeben. Die Proteinkonzentration muss beim Medium mit Apfelzellen erhöht werden, da bei niedrigen Konzentrationen die Absorption schwierig zu bestimmen ist.

2.13. Papierchromatographie

Die durch pektolytische Enzyme entstandenen Abbauprodukte der Polygalacturonsäure von auf Pektin Medium gezüchteten Botrytis-Stämmen, können papierchromatographisch nachgewiesen werden.

Das Substrat besteht aus 1.7 mg Polygalacturonsäure in 340 µl 0.1 M Acetat Puffer pH 4.0. Diese werden mit 10 µl Proteinlösung (1000 µg/ml) gemischt und bei 30°C während den festgelegten Zeiten inkubiert. Nach 10, 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten werden Proben von 50 µl auf 3 MM Whatmann Papier

aufgetragen und bei aufsteigender Chromatographie laufen gelassen. Als Laufmittel werden 50 mg Bromphenol Blue und 60 mg Natriumformiat gelöst in 77 % Aethanol- 88 % Ameisensäure (85:15, v/v) verwendet (Young und Corden, 1964). Nach einer Laufzeit von vier Stunden werden die Chromatogramme bei Raumtemperatur getrocknet. Als Referenz für die Berechnung der R_f -Werte dienen Galacturonsäure und Polygalacturonsäure. Die Abbauprodukte erscheinen als gelben Flecken auf violetterem Hintergrund.

2.14. Statistische Auswertung

Bei den Ergebnissen wird der 95% Vertrauensbereich der Mittelwerte berechnet. Normalverteilte Daten werden mittels Varianzanalyse und Duncan Test dargestellt. Erweisen sich die Ergebnisse als nicht normal verteilt, wird als verteilungsunabhängiges Verfahren der Kruskal- Wallis Test angewendet. Die Berechnungen werden auf einem Data General-Computersystem durchgeführt. Ist Linearität vorhanden, werden die Ergebnisse durch Regressionsgeraden und ihre Korrelationskoeffizienten ausgedrückt.

3. RESULTATE

Zur Charakterisierung sowohl von sensiblen und resistenten Freilandisolaten als auch von im Labor spontan auf fungizidhaltigem Medium aufgetretenen Stämmen wurden Experimente durchgeführt.

Dabei wurden als wichtige Eigenschaften Resistenzniveau, Fitness, Enzymmuster und Enzymaktivität betrachtet. Durch Veränderung der Konidien-dichte, Herstellung von Einsporlinien und Behandlung mit mutagener Substanz wurde versucht, nähere Hinweise über die Laborresistenz zu erhalten. Mit Dicarboximid sensiblen und resistenten Isolaten wurden auch vergleichende Versuche gegenüber dem Fungizid Z 1 und den Methylbenzimidazol - Fungiziden angestellt.

3.1. Quantitative und qualitative Resistenz gegenüber Dicarboximiden im Freiland

3.1.1. Myzeltest nach mehrjähriger Anwendung

Die in Abbildung 7 dargestellten Resultaten zeigen die Entwicklung resistenter Botrytis-Isolate in einem Spritzversuch in den "Dorfreben" der Forschungsanstalt Wädenswil. Die verschiedenen Fungizidvarianten in drei Wiederholungen wurden 1982 und 1983 in den gleichen Parzellen angelegt. Die Probenahme (aus den in der Abb. 7 angegebenen Varianten) erfolgte am 11. Juli 1983, nach der Blüte und am 23. September 1983, vor der Ernte. Auf den jungen Trauben war nur wenig Fäulnis vorhanden, sodass insgesamt nur 23 Isolate getestet werden konnten. Zur Zeit der Ernte wurden in den behandelten Reihen anhand des Myzeltests nur Isolate mit einem Resistenzniveau von 1 oder 3 µg/ml Vinclozolin gefunden. In der nicht mit Dicarboximiden gespritzten Variante wurden nur wenig resistente Isolate gezählt und ihr Anteil nahm im Laufe der Vegetationsperiode leicht ab.

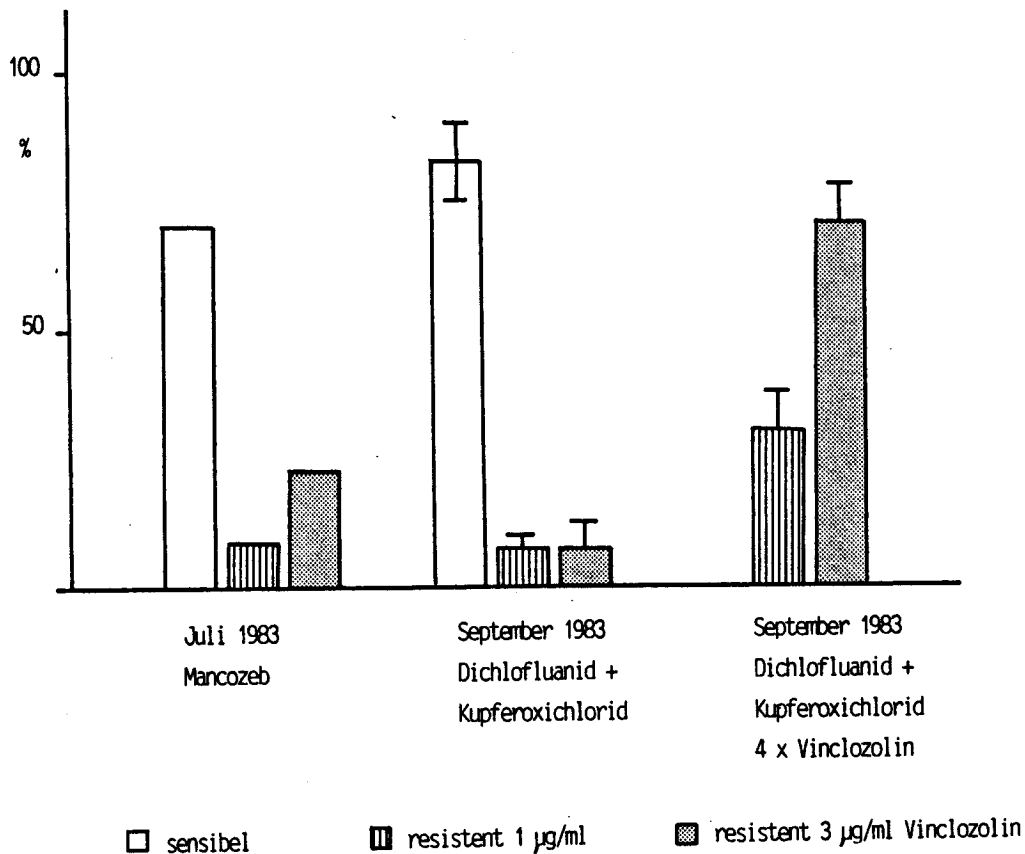


Abb. 7 : Prozentuale Anteil sensibler und resistenter Isolate in der "Dorfrebe" beim Myzeltest auf Malzagar nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen. Im Juli wurden insgesamt 23, bei der Ernte 20 Isolate pro Variante in drei Wiederholungen getestet

3.1.2. Myzeltest nach einjährigem Behandlungsunterbruch

1982 wurden in der ganzen Parzelle keine Dicarboximide verwendet. Es erfolgte eine Resensibilisierung der Population bis zu 75% (Martineti, 1982). Während des Winters 1982-1983 blieb der Anteil sensibler Isolate auf diesem Niveau. Im Laufe des Sommers 1983 erfolgte noch eine leichte Resensibilisierung, die aber auch im folgenden Jahr, nachdem die Reben 3 Jahre unbehandelt geblieben waren, nicht zu einem Anteil von 100% sensiblen Pilzstämmen führte. Der Selektionsdruck des Fungizids zeigte sich im September 1984 bei den Behandlungsvarianten mit Dicarboximid. Die sensiblen Isolate verschwanden nach der Behandlung schlagartig zu Gunsten von solchen mit verschieden hoher Resistenz allerdings von einem Grad von nicht mehr als 3 µg/ml (Abb. 8). Die Population entsprach bezüglich Resistenz derjenigen von 1981. Die Isolationsversuche in der "Unteren Schloss-

rebe" wurden parallel zu denjenige in der "Dorfbebe" durchgeführt (siehe 3.1.1.), erstreckten sich aber bis Oktober 1984.

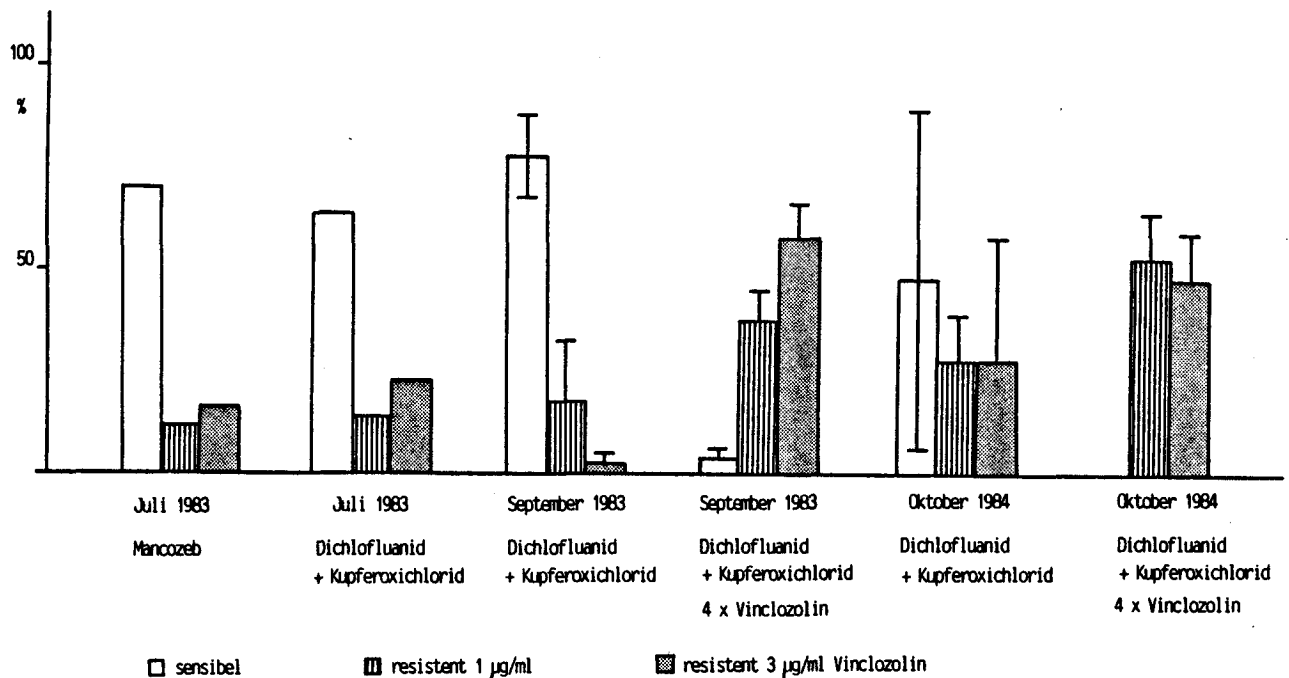


Abb. 8 : Prozentualer Anteil sensibler und resistenter Isolate der "Unteren Schlossrebe" beim Myzeltest auf Malzagar nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen. Im Juli 1983 wurden bei der Mancozeb-Variante insgesamt 25 Isolate und bei der mit Dichlofluanid und Kupferoxichlorid behandelten Variante insgesamt 22 Isolate, bei den Ernten, September 1983 und Oktober 1984 10 Isolate pro Variante in drei Wiederholungen getestet

3.1.3. Myzeltest mit Isolaten aus unbehandelten Erdbeerfeldern

In den Jahren 1983 und 1984 wurden Populationen aus vier ohne den Einsatz von Fungiziden bewirtschafteten Erdbeerfeldern bezüglich ihres Resistenzverhalten untersucht (Tab. 5). Die Feldern befanden sich in "Ober Oedischwend" oberhalb Wädenswil (1983), in Metmenstetten, Hombrechtikon und Gossau ZH (1984). Bei allen vier Standorte konnte der Zuflug aus

Rebbergen mit Dicarboximiden ausgeschlossen werden. Die Isolationen erfolgten aus befallenen Erdbeeren, die nach der Ernte auf dem Feld blieben (40 Isolate von Wädenswil und je 20 von den anderen Standorten). Die Populationen bestanden ausschliesslich aus Dicarboximid sensiblen Isolaten. 1983 zeigten die Isolate kein Wachstum bei 3 und 10 µg/ml Fungizid und nur stark reduzierte Myzelentwicklung auf 1 µg/ml. 1984 wiesen von insgesamt 60 Isolaten drei auf 3 µg/ml und nur eines Isolat auf 10 µg/ml einen stark gehemmten Wuchs auf; für die anderen waren diese Konzentrationen letal.

Tab. 5 : Anzahl Isolate auf Malzagar mit verschiedener Vinclozolin-Konzentrationen nach 5 Tagen Inkubationszeit, in Klammer mittlerer Durchmesser der Kolonien in mm

		Kontrolle	1 µg/ml	3 µg/ml	10 µg/ml
Wädenswil	1983	40 (45)	40 (2.9)	0	0
Mettmenstetten	1984	20 (45)	-	0	0
Hombrechtikon	1984	20 (45)	-	0	0
Gossau ZH	1984	20 (45)	-	0	0

3.1.4. Resistenz der Konidien nach mehrjähriger Anwendung von Dicarboximiden

Die Dicarboximide sind sowohl auf Myzel als auf Konidien wirksam (Leroux et. al., 1977, Schüepp und Küng, 1978). In den ersten Anwendungsjahren haben Myzel- und Konidientest gut zusammengestimmt und für die jährlichen Untersuchungen über die Entwicklung der Resistenz im Freiland (Schüepp et. al., 1982) war der weniger aufwendig Myzeltest geeignet. Heute hat sich das Resistenzniveau des Myzels bei resistenten Populationen im Freiland auf 3 µg/ml Aktivsubstanz in Malzagar eingestellt; bei höheren Konzentrationen wachsen resistente Freilandisolate gehemmt oder gar nicht. Es war zu untersuchen, ob die Resistenzbildung auch bei den Konidien denselben Verlauf genommen hatte. Ein Myzeltest und ein Sporenkeimtest wurden 1983 mit 10 Isolaten aus einer seit 1976 alljährlich vier mal

behandelten Parzelle un Rudolfingen durchgeführt. Die Auswertung des Keimtestes erfolgte nach 16 Stunden Inkubationszeit. Die Anzahl der gekeimten Sporen wurde in einer Stichprobe von 100 Konidien mit vierfacher Wiederholung pro Fungizidkonzentration bestimmt. Als gekeimt galten Konidien deren Keimschlauch so lang war wie die Konidie selbst .

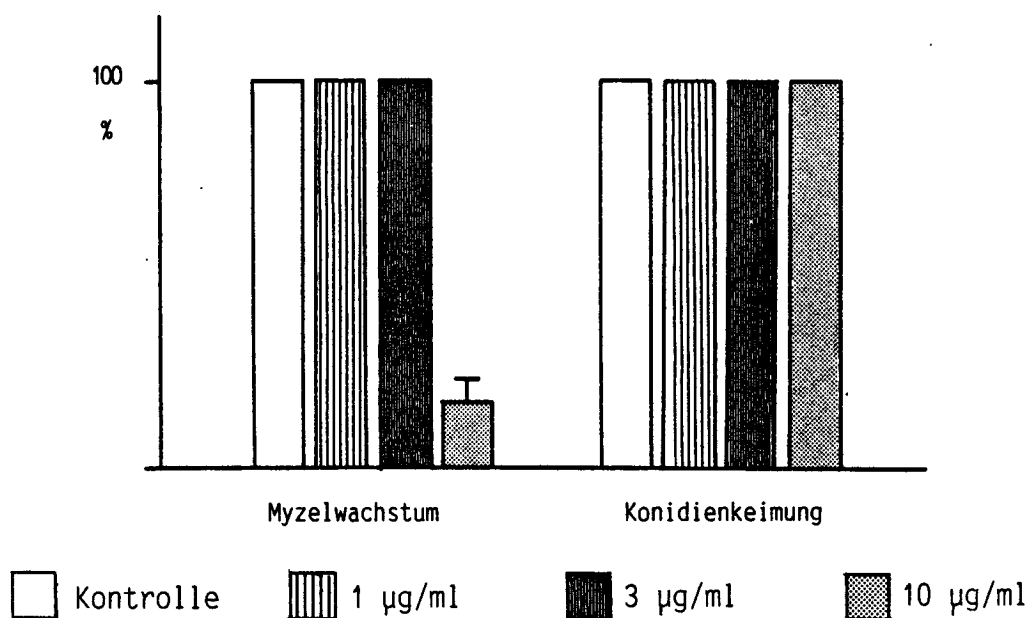


Abb. 9 : Myzelwachstum und Sporenkeimung von zehn Isolaten auf Malzagar mit 1,3 und 10 µg/ml Vinclozolin nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen bzw. 16 Stunden. Die Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt.

Der in Abbildung 9 dargestellte Versuch zeigte keine Unterschiede in der Konidienkeimung bei zunehmender Fungizidkonzentration; die Keimschläuche und das sich daraus entwickelnde Myzel waren normal. Das Myzelwachstum betrug hingegen auf Malzagar mit 10 µg/ml Vinclozolin nur 16 % der Kontrolle. In dieser Parzelle wurde auch ein vollständiger Wirkungsverlust der Fungizide festgestellt. Bei den in Tabelle 6 dargestellten Resultaten stammten die Konidien aus einer Parzelle in der 1983 noch eine Wirkung von 94% bei einem Beerenbefall von 31% erreicht worden war. Die Keimrate von 10 Isolaten, die im Myzeltest eine Resistenz von 3 µg/ml Vinclozolin aufwiesen, wurde bei einer VinclozolinKonzentration von 10 und 100 µg/ml bestimmt .Aus der Tabelle 6 geht hervor dass, auch in Parzellen mit hohen Wirkungsgraden des Fungizides dieKonidien eine erhöhte Resistenz besitzen können.

Tab. 6 : Prozentuale Keimung auf Malzagar mit unterschiedlichen Vinclozolin-Konzentrationen von 10, im Myzeltest gegenüber 3 µg/ml resistenten Botrytis-Isolaten aus der "Untere Schlossrebe", Wädenswil

	Kontrolle	10 µg/ml	100 µg/ml
9 Isolate	98 ± 1.5	98 ± 2	98 ± 2
1 Isolat	90	0	0

3.1.5. Resistente Konidien in nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerefeldern

Das Vorkommen resistenter Konidien bei sensiblen Freilandisolaten wurde durch Ausplattierung einer Konidiensuspension auf fungizidhaltigem Malzagar in Petrischalen untersucht. Die Konidien wurden in der gleichen Dichte ausgebracht wie beim Myzeltest auf Malzagarrrondellen d.h. 53000 Konidien/cm², bzw. 3.10⁶ Konidien/Schale. Die verwendeten Isolate stammten aus der Erdbeerefeldern die, ohne chemische Pflanzenschutzmitteln bewirtschaftet wurden. Am vierten, fünften und sechsten Tag wurde das Vorhandensein und die Entwicklung von Kolonien mit normalem oder gehemmtem Myzel auf Malzagar mit 3 µg/ml Vinclozolin beobachtet. Alle sich gebildeten Kolonien wurden nach einer Passage über fungizidfreies Medium auf Malzagar mit 3 und 10 µg/ml Vinclozolin getestet. Nur eine sehr kleine Zahl der Konidien war auf 3 µg/ml keim- und wachstumsfähig. Bei den Stämmen E 34 und E 33 ist das Verhältnis resistenter zu sensibler Konidien 1: 3.8 10⁶ und bei E 31 und E 35 1: 6 10⁶ bzw. 1: 3.3 10⁶. Die resistenten Sporen bildeten schon nach vier Tagen Kolonien. Von den 11 Kolonien beim Isolat E 34 zeigten drei ein gehemmtes Myzelwachstum und wurden bei der Berechnung des durchschnittlichen Radius nicht berücksichtigt.

Ein Teil der Konidien konnte auf fungizidhaltigem Nährboden keimen und teilweise auch wenig Myzel bilden. Eine Weiterentwicklung war aber nicht möglich und die Kulturen hatten auch nach 18 Tagen nur punktförmige Kolonien von 3-5 mm Durchmesser gebildet. Trotzdem war die Sporulation bei solchen abnormalen Wuchsformen nicht immer vollständig unterdrückt.

Bei den Isolaten E 33 und E 35 entwicklten sich Konidienträger und Konidien. Nach Ueberimpfung dieser punktförmigen Kolonien auf Kartoffel-Dextrose-Agar ohne Wirkstoff wuchsen sie jedoch normal.

Tab. 7 : Anzahl und Radius der, auf 3 µg/ml Vinclozolin aufgetretenen Bortytis-Kolonien, aus Konidien sensibler Freilandisolate aus noch nie mit Fungiziden behandelten Feldern (10 Wiederholungen pro Isolat) am 4., 5. und 6. Tag nach Ausplattierung. In Klammer ist bei E 34 zusätzlich die Anzahl verzögert wachsender Kolonien angegeben

Isolat	Anzahl Kolonien	Radius der Kolonien in mm		
		4. Tag	5. Tag	6. Tag
E 31	5	12 ± 4	18 ± 2	24 ± 2
E 33	8	13 ± 4	19 ± 4	24 ± 4
E 34	8 (3)	13 ± 3	20 ± 5	27 ± 3
E 35	10	14 ± 4	22 ± 4	31 ± 6

Tab. 8 : Anzahl von aus einzelnen Sporen entstandenen, gehemmten Kolonien mit Durchmesser grösser als 1 mm am 6. Tag nach Versuchansatz von Isolaten aus noch nie mit Fungiziden behandelten Feldern auf Malz-agar mit 3 µg/ml Vinclozolin (10 Wiederholungen, $3 \cdot 10^6$ Konidien pro Wiederholung

Isolat	Anzahl Kolonien > 1 mm der einzelnen Wiederholungen									
E 31	2	7	0	0	7	3	2	1	3	0
E 33	110	70	62	56	124	98	84	99	84	84
E 34	7	5	21	18	21	6	9	10	10	20
E 35	1	6	6	5	3	3	4	2	1	7

Im Gegensatz zur Anzahl der sich normalentwickelnden Konidien ergaben sich Unterschiede bezüglich der Anzahl gehemmter punktförmiger Kolonien je nach Isolat (Tab. 8). Am 6. Tag wurden alle punktförmigen Kolonien mit einem Durchmesser grösser als 2 mm auf fungizidfreien Malzagar überimpft. Vermutlich waren sie vom Wirkstoff schon an vitalen Zentren getroffen so dass je nach Isolat bei 50% bis 100% der geimpften Kolonien die Sporulation ausblieb (Tab. 9).

Ein Resistenztest wurde mit den normal wachsenden, den verzögert wachsenden und mit den punktförmigen (Durchmesser 2-5 mm) Kolonien durchgeführt, wobei die punktförmigen in sporulierenden und nicht sporulierenden aufgeteilt wurden. Nur normalwachsende Kolonien konnten sich auch bei 10 µg/ml Vinclozolin entwickeln. Kulturen mit verzögertem Wachstum erreichten ein Resistenzniveau von höchstens 3 µg/ml und die mit gehemmten Wachstum waren fast ausschliesslich sensibel (Tab. 9).

Tab. 9 : Sporulation und nachfolgender Resistenztest der verschiedenen Kolonientypen der vier Ausgangsisolate (vgl. Tab. 7 und 8)

Ausgangsisolat	Kolonientypen	Anzahl überimpfter Kolonien		Anzahl Stämme aufgeteilt nach Resistenzniveau		
		total	sporulierend	sensible	3µg/ml	10 µg/ml
E 31	normal wachsend	5	4	0	0	0
E 33	normal wachsend	8	6	0	1	5
E 34	normal wachsend	8	6	0	0	6
E 35	normal wachsend	10	10	0	1	9
E 34	verzögert wachsend	4	4	1	3	0
E 33	gehemmt mit Sporulation	10	10	9	1	0
E 35	gehemmt mit Sporulation	3	3	2	1	0
E 31	gehemmt ohne Sporulation	10	5	5	0	0
E 33	gehemmt ohne Sporulation	10	0	-	-	-
E 34	gehemmt ohne Sporulation	9	4	4	0	0
E 35	gehemmt ohne Sporulation	8	5	5	0	0

Bei den in Tabelle 10 dargestellten Untersuchungen wurde das Verhältnis zwischen sensiblen und von Natur aus resistenten Konidien zu erfassen versucht und die Wachstumsgeschwindigkeit der sich aus den resistenten Konidien entwickelnden Kolonien mit denjenigen der Kontrolle verglichen. Da auf Dicarboximid-haltigem Agar nur ein verschwindend kleiner Prozentsatz der Konidien sensibler Isolate keimen konnte (Tab. 7), war eine grosse Zahl der Sporen auszuplattieren (10^7 Konidien in 20 Wiederholungen). Die Anzahl resistenter Konidien variierte beträchtlich je nach Ausgangs-isolat.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der, aus den resistenten Konidien sich entwickelnden Kolonien auf fungizidhaltigem Malzagar, zeigten keine wesentliche Unterschiede unter sich wie auch im Vergleich zu den auf fungizidfreiem Medium aus sensiblen Konidien sich entwickelnden Kolonien. Diese Tatsache deutete darauf hin, dass diese Konidien den Resistenzfaktor schon von Anfang an in sich trugen. Die in Klammer angegebenen verzögert wachsenden Kolonien wurden zwar bei der Berechnung des Verhältnisses resistent zu sensibel berücksichtigt, jedoch nicht bei der Ermittlung des Durchmessers.

Tab. 10 : Anzahl und Durchmesser der, auf 3 bzw. 10 µg/ml Vinclozolin Malzagar gewachsenen Kolonien aus Konidien sensibler Freiland-isolaten aus noch nie mit fungiziden behandelten Erdbeerefeldern nach 3 Tagen Inkubation, in Klammer sind zusätzlich die verzögert gewachsenen Kolonien angegeben

Ausgangsisolat	Anzahl gekeimter Konidien pro 10^7		Verhältnis zwischen resistenten und sensiblen Konidien	Durchmesser der sich aus den resistenten Konidien entwickelten Kolonien		Durchmesser der sich aus den sensiblen Konidien entwickelten Kolonien auf Malzagar
	3 µg/ml	10 µg/ml		3 µg/ml	10 µg/ml	
M 6	0	0	-	-	-	17 ± 1.9
M 12	0 (7)	0	7.7 / 10^7	-	-	23.6 ± 2.6
M 31	11 (3)	0 (1)	15.1 / 10^7	13.3 ± 3.7	5	16.4 ± 2.5
M 35	0	0	-	-	-	18.2 ± 2.1
M 37	0	0	-	-	-	17.5 ± 2.8
M 45	1 (4)	0	5.3 / 10^7	15	-	19.4 ± 3.5
E 33	25 (3)	22 (4)	33.3 / 10^7	13 ± 2.8	11.3 ± 1.7	13.4 ± 2.1
E 34	2 (1)	0	2.6 / 10^7	15 ± 1.4	-	18 ± 2.7

3.2. Resistenz gegenüber Methylbenzimidazol-Fungiziden (MBC) im Freiland

MBC- Fungizide werden seit 1976 infolge Resistenzbildung im Weinbau nicht mehr eingesetzt. Zur Zeit finden diese Präparate noch im Obst- und Gemüsebau eine Anwendung. Isolate aus eines Feldversuches mit Dicarboximiden sowie aus noch nie mit Fungiziden behandelten Feldern wurden bezüglich ihrer Resistenz gegenüber MBC (Carbendazim) geprüft (Tab. 11).

Tab. 11 : Myzeltest von 62 Botrytis-Isolaten verschiedener Herkunftte gegenüber 100 µg/ml Carbendazim

	sensibel	resistent
Dicarboximid sensible Isolate aus unbehandelten Versuchspartzellen	8	17
Dicarboximid resistente Isolate aus behandelten Versuchspartzellen	3	16
Isolate aus noch nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerefeldern	18	0

In Partzellen, die seit 1975 nicht mehr mit MBC-Fungiziden behandelt worden waren, bestand drei Viertel der Botrytis-Population noch immer aus resistenten Stämmen. Alle resistente Isolate konnten sich auf 100 µg/ml Carbendazim in gleicher Weise wie auf Malzagar ohne Fungizid entwickeln. Es bestand keine positive Kreuzresistenz zwischen den beiden Wirkstoffgruppen. Isolate aus noch nie mit Pestiziden behandelten Erdbeerefeldern waren ausnahmslos sowohl gegenüber MBC als auch gegenüber Dicarboximiden sensibel.

3.3. Laborresistenz gegenüber Dicarboximiden

3.3.1. Das spontane Auftreten von Laborresistenz

Um das spontane Auftreten von Laborresistenz zu erfassen, wurden aus dreitägigen Kolonien von vier sensiblen Isolaten je 10 Rondellen aus dem Kolonierand entnommen und auf Malzagar mit 10 resp. 100 µg/ml Vinclozolin übertragen. Einzelne Zellen dieser sensiblen Isolate sind offensichtlich fähig, hohe Fungizidkonzentrationen zu ertragen und zu normal allenfalls verzögert sich entwickelnden Sektoren auszuwachsen. Aus Tab. 12 wurden Verhaltensunterschiede der vier Isolate deutlich. Während sich bei S 28 in der Hälfte der Wiederholungen normal wachsenden Sektoren bildeten, fehlen solche bei H 15 gänzlich; hier bildeten sich später nur vereinzelt verzögert wachsende Sektoren ohne Sporulation.

Tab. 12 : Anzahl aus sensiblen Isolaten hervorgegangene, resistente Laborstämme auf Malzagar mit 10 resp. 100 µg/ml Vinclozolin innerhalb 10 Wiederholungen pro Konzentration und Isolat. Die Stämme wurden in normalwachsenden und gehemmt wachsenden aufgeteilt; in Klammer ist der Tag des Auftretens angegeben

Ausgangsisolat	Konzentration µg/ml	Stämme mit normalem Wachstum 1)	Stämme mit verzögertem Wachstum 2)
H 15	10	0	1 (17), 1 (20), 3 (26)
	100	0	1 (11)
H 40	10	1 (6)	1 (11)
	100	1 (6), 1 (17)	1 (10), 2 (17)
S 28	10	4 (3), 1 (7)	0
	100	2 (7), 1 (9), 1 (14)	1 (22)
R 4	10	0	1 (22)
	100	1 (8), 1 (11)	0

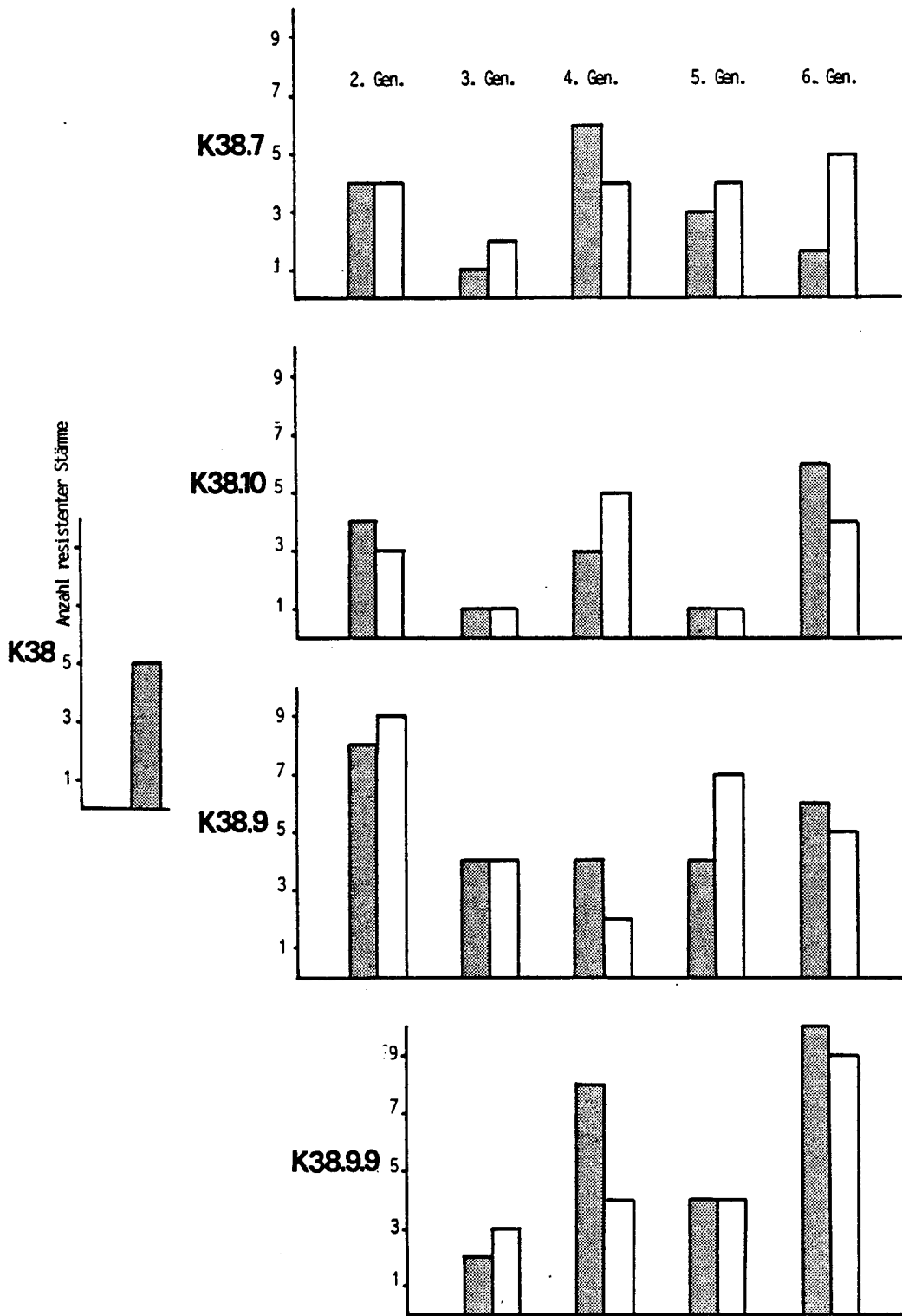
1) 6-8 mm radiales Wachstum pro Tag
 2) Petrischale nach 30 Tagen noch nicht vollständig bewachsen, Radius > 10 mm

3.3.1.1. Resistenzverhalten von Einsporlinien

Lauber (1973) spaltete durch Einsporkulturen, Botrytis cinerea-Stämme in Einsporlinien auf. Bei der Annahme, dass Konidien von Botrytis cinerea durchschnittlich vier Kerne haben, wäre gemäss Wahrscheinlichkeitsberechnung nach sechsmaliger Einzelsporauslese 70% der Kulturen homokaryontisch. Es stellte sich die Frage, ob im Laufe der Generationen bei gewissen Einsporlinien eine zunehmende Anzahl von laborresistenten Stämmen auf Fungizid-Malzagar zu beobachten sei. Zur Abklärung wurde K 38, ein sensibles Frilandisolat aus der "Dorfrebe" in Wädenswil verwendet. Auf Malzagar mit 3 µg/ml Vinclozolin zeigte dieses Isolat kein Wachstum, doch entwickelten sich daraus nach einigen Tagen sporadisch laborresistente Stämme. Zur Herstellung der ersten Generation von 10 Einsporkulturen diente eine Sporensuspension des Ausgangsisolates K 38. Die Einsporlinie wurde aus jenen drei Einsporkulturen weitergeführt, die am meisten resistente Stämme gebildet hatten (K 38.7, K 38.9, K 38.10). Von der 2. Generation an, wurde aus den zehn Einsporkulturen jedes Stammes nur diejenige zur Fortsetzung der Einsporlinie verwendet, die am meisten resistente Stämme gebildet hatte. Beim Stamm K 38.9 trat in der 2. Generation eine Einsporkultur auf, die bei allen Wiederholungen auf Fungizid-Agar reduziertes Wachstum zeigte. Dieser Stamm wurde in zwei Einsporlinien weitergeführt.

Der in Abbildung 10 dargestellte Myzelttest wurde in zwei Varianten durchgeführt. In der ersten Variante wurde die Agarrondelle mit der myzelbewachsenen Seite nach unten auf den fungizidhaltigen Agar übertragen, in der zweiten mit der myzelbewachsenen Seite nach oben.

Aus der Abbildung 10 geht hervor dass, im Verlauf der Generationen keine Einsporlinie mit zunehmender Anzahl resistenter Stämme gefunden werden konnte. Das sporadische Auftreten der resistenten Stämme ist zufällig verteilt. Nur bei einer Einsporkultur, ausgehend vom Stamm K 38.9 waren alle 6 Wiederholungen resistent und ihr Wachstum auf dem Fungizid-Agar entsprach demjenigen auf Kontrollplatten. Dass in keiner der Einsporlinien ein erhöhtes Auftreten von Laborresistenz gefunden wurde, lässt sich damit erklären, dass Konidien wie auch Hyphenzellen von Botrytis cinerea heterokaryontisch sind und im Durchschnitt 4 bis 7 verschiedene Kerne (Menzinger, 1965) enthalten. Daher sind grosse Variationen innerhalb jedes Stammes zu erwarten



Punktierte Säule = Rondelle mit myzelbewachsener Seite nach unten
Leere Säule = Rondelle mit myzelbewachsener Seite nach oben

Abb. 10 : Anzahl resistenter Stämme über sechs Generationen je nach 5 Tagen Inkubationszeit, 30 Wiederholungen pro Variante, 3 pro Einsporkultur

3.3.1.2. Laborresistenz in Abhängigkeit von der im Myzeltest verwendeten Konzentration der Konidiensuspension

In einer weiteren Untersuchung wurde der Einfluss der Konzentration der, auf die Agarrondelle gebrachten Konidiensuspension abgeklärt. Zu diesem Zweck wurden Isolate verschiedener Herkünfte verwendet: Pon B 11 (Pont de la Maye), W 60 (Wädenswil), R 44 (Berneck) und Col A7 (Colmar). Die ausländischen sensible Isolate stammten aus Rebholz, die schweizerischen aus Trauben. Sie wurden auf autoklavierter Erde kultiviert und bei 4°C aufbewahrt. Zur Sporulation wurden sie bei Bedarf auf PDA überimpft. Es folgte ein Resistenztest auf Fungizid-Agar (1,3,10 µg/ml). Die für den Resistenztest verwendete Konidiensuspension wurde auf die entsprechenden Konzentrationen verdünnt (10^4 , 10^5 , 10^6 Konidien/ml) und mit einer ausgezogenen Pasteurpipette (0.03 ml/Rondelle) auf Malzagarrondellen aufgetragen.

Für die Ausplattierung auf Wasseragar zur Herstellung von Einsporkulturen, erwies sich eine weitere 100-fache Verdünnung der Suspension als notwendig. Bei Pon B 11 wurden Einsporkulturen über drei Generationen und bei den restlichen Isolaten über zwei Generationen hergestellt. Die Anzahl der pro Isolat geprüften Einsporkulturen sind in der Abbildung 11 angegeben.

Die Versuchsergebnisse in Abbildung 10 zeigen bei Einsporlinien sensibler Isolate auch nach mehreren Generationen keine signifikante Veränderungen in der Anzahl gebildeter, resistenter Stämme. Die einzelnen Einsporkulturen der verschiedenen Generationen können daher bezüglich Bildung resistenter Stämme trotz der relativ grossen Streuung als gleichwertig betrachtet werden. Das trifft jedoch nicht zu, wenn bei einer Einsporkultur alle Wiederholungen bei gewissen Konzentrationen des Wirkstoffes Resistenz zeigen, wie dies beim Isolat Pon B 11 bei der zweiten Generation der Fall war. Die Einsporkultur Pon B 11.9.4. zeigte auf 1 und 3 µg/ml Vinclozolin keine Abhängigkeit von der auf die Agarrondellen applizierten Konidienkonzentrationen und entwickelte sich in gleicher Weise wie auf fungizid-freiem Medium. Auf 10 µg/ml Vinclozolin zeigte Pon B 11.9.4. gehemmtes Wachstum. Die Resistenz wurde auf die Nachkommen übertragen und diese Einsporlinie konnte daher nicht in die Auswertung einbezogen werden.

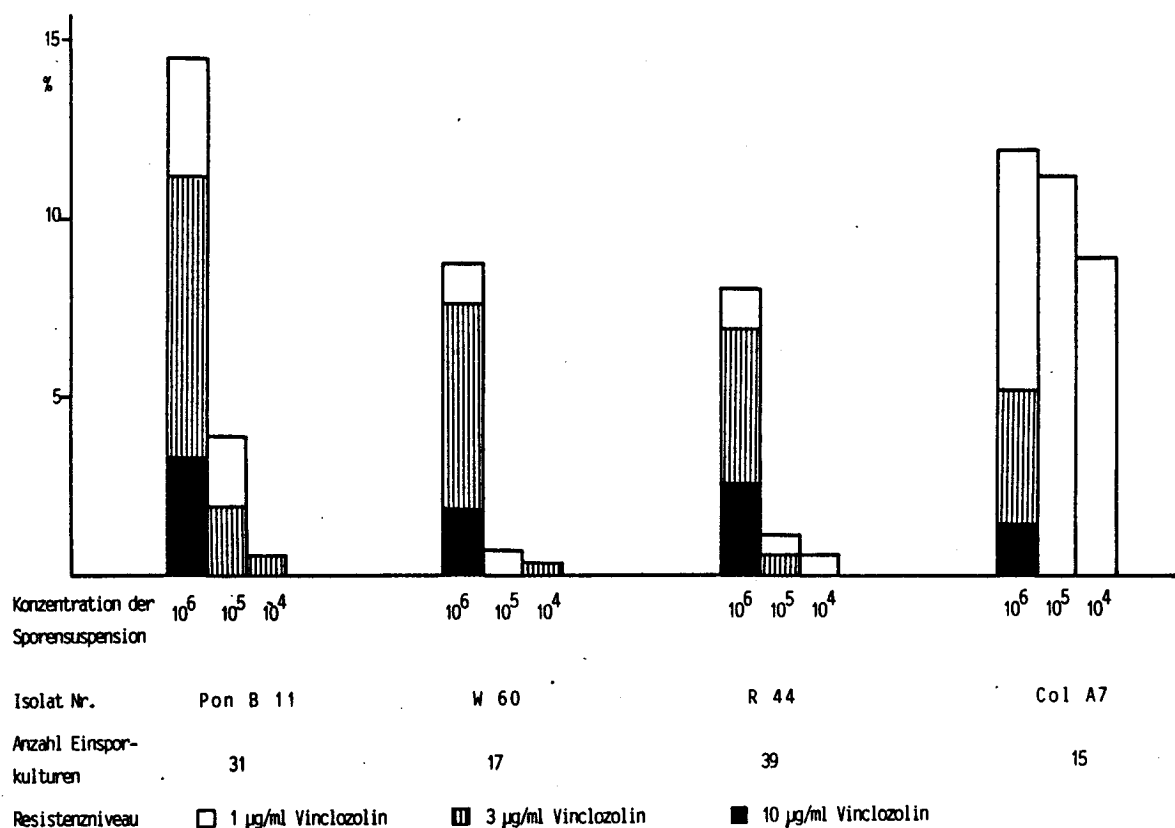


Abb. 11 : Auftreten von laborresistenten Stämmen in Prozent bei 4 sensiblen Isolaten in Abhängigkeit der verwendeten Konidienkonzentration aufgeteilt nach den drei Resistenzniveaus. Drei Wiederholungen pro Einsporkultur ausgezählt nach 5 Tagen Inkubationszeit

Wie aus Abbildung 11 ersichtlich, verringert sich der prozentuale Anteil der resistenten Stämme mit abnehmender Konzentration der Konidiensuspension. Bei keinem der Isolate war er auch bei den hoch konzentrierten Suspensionen höher als 20 %. Die Isolate Pon B 11, R 44 und W 60 verhielten sich ähnlich und bildeten bei den beiden niedrigeren Konzentrationen bedeutend weniger resistente Stämme. Nur bei der dichtesten Konidiensuspension traten Stämme vom Resistenzniveau 10 µg/ml Vinclozolin auf und auch gegenüber 3 µg/ml Vinclozolin ergaben sich bei dieser Konidienkonzentrationen wesentlich mehr resistente Stämme als bei den beiden niedrigeren Konidienkonzentrationen.

Versuch auf höheren Konzentrationen (100 und 300 µg/ml) eine beträchtliche Heterogenität, wobei das Resistenzverhalten auch innerhalb der Wiederholungen stark variierte.

Tab. 13 : Anzahl laborresistenter Stämme der in Abbildung 13 beschriebenen Isolate aufgeteilt nach Wachstumstypen auf 300 µg/ml Vinclozolin Malzagar

Ausgangsisolat	Fungizidkonzentration im Resistenztest 1)	Anzahl Stämme aufgeteilt nach Wachstumstypen		
		A	B	C
Pon B 11	1 µg/ml	3	1	2
R 44		5	2	2
W 60		6	1	1
Col A7		0	0	1
Total		14	4	6
Pon B 11	3 µg/ml	17	3	2
R 44		13	3	0
W 60		9	0	0
Col A7		0	0	1
Total		39	6	3
Pon B 11	10 µg/ml	9	0	0
R 44		10	0	0
W 60		5	0	0
Col A7		3	0	0
Total		27	0	0

1) Vinclozolin-Konzentration bei welcher sich die resistenten Stämmen gebildet hatten (Abb. 11)

A) Wachstum wie auf Kontrollplatten

B) vorerst gehemmtes Wachstum, danach bei einzelnen Wiederholungen sektorielles Wachstum

C) kein oder stark gehemmtes Wachstum

Im Gegensatz zu Col A7 traten bei den anderen Isolaten fast keine resistenten Stämme vom Niveau 1 µg/ml Vinclozolin auf. Das Isolat Col A7 bildete auf 1 µg/ml Vinclozolin bei den verdünnten Konidien suspensionen fast soviele resistente Stämme wie bei der konzentriertesten Suspension. Beim Resistenzniveau von 1 µg/ml kann wohl eher von einer Adaptation als von einer eigentlichen Resistenz gesprochen werden.

3.3.1.3. Wachstum auf hohen Fungizidkonzentrationen

Die in Abbildung 11 aufgeführten resistenten Stämme wurden auch auf höheren Fungizidkonzentrationen getestet, falls der Durchmesser der Kulturen nach 10 tägiger Inkubation ausreichte, um Agarrondellen auszusteichen. Als höchste Wirkstoffkonzentration wurde 300 µg/ml verwendet. Pro Petrischale wurde je ein Stamm getestet, auch wenn sich mehrere resistente Stämme entwickelt hatten (Tab. 13).

Tabelle 13 bezieht sich auf die Wachstumstypen bei einer Vinclozolin-Konzentration von 300 µg/ml. Tests mit den zusätzlich geprüften Konzentrationen von 10, 30 und 100 µg/ml Vinclozolin ergaben ähnliche Resultate wie die in der Tabelle 13 dargestellten Untersuchungen. Von den im Resistenztest aus dem Ausgangsisolat Col A7 hervorgegangenen resistenten Stämmen konnten wegen allzu geringem Wachstum nur 5 in den Test mit höheren Konzentrationen einbezogen werden. Alle im Versuch zu Abbildung 11 auf 10 µg/ml gewachsenen Stämme waren auf 300 µg/ml vom Wachstumstyp A, das heisst sie entwickelten sich wie auf den Kontrollplatten. Am meisten Stämme konnten aus der Gruppe 3 µg/ml (Abb. 11) getestet werden: 81% der Stämme entwickelten sich auf 300 µg/ml normal, 6% wurden gehemmt und 13% bildeten sektorielles Wachstum. Die in der Tabelle 13 aufgeführte Gruppe der 1 µg/ml resistenten Stämme verhielt sich heterogen: 58%, die alle schon bei dem, in Abbildung 11 dargestellten Versuch auf 1 µg/ml zu den gut entwickelten Stämmen gehörten, wurden nicht gehemmt, für 25% war 10 µg/ml bereits die letale Konzentration und 16% zeigten sektorielles Wachstum. In weiteren Versuchen konnten diese Resultaten mit Isolaten verschiedener Herkunft bestätigt werden. Die ursprünglich in einem ersten Myzeltest auf 1 µg/ml gewachsenen Stämme zeigten in einem anschliessenden Versuch auf höheren Konzentrationen (100 und 300 µg/ml) eine beachtliche Heterogenität, wobei das Resistenzverhalten auch innerhalb der Wiederholungen stark variierte

3.3.1.4. Myzelwachstum und Konidienkeimung von laborresistenten Stämmen aus einer langjährig behandelten und einer noch nie behandelten Parzelle auf hohen Vinclozolin-Konzentrationen

Im Laufe der Untersuchungen wurde festgestellt, dass laborresistente Stämme bei sensiblen Isolaten sowohl aus behandelten als auch unbehandelten Parzellen auftreten. In einem Myzeltest auf 3 µg/ml Vinclozolin wurden 18 bzw. 15 Isolate aus einer langjährig mit Dicarboximiden behandelten Rebparzelle, "Dorfrebe" beziehungsweise aus einem noch nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerfeld "Oedischwend" getestet. Bei 14 Isolate aus der "Dorfrebe" und bei 10 Isolate aus "Oedischwend" bildeten sich spontan laborresistente Stämme. Von diesen wurden 18 beziehungsweise 10 auf fungizidfreies Medium überimpft und anschliessend auf verschiedenen Vinclozolin-Konzentrationen zwischen 3 und 100 µg/ml auf Myzelwachstum und Sporenkeimung getestet. Zusätzlich wurden in gleicher Weise 17 Stämme der 6. Generation einer Einsporlinie des Isolates K 38 (Abb. 10) aus der "Dorfrebe" getestet, um eine allfällige genetische Variabilität zu erfassen. Die 45 geprüften Stämme aus den drei Gruppen zeigten mit einer einzigen Ausnahme auf allen Fungizidkonzentrationen bis 100 µg/ml normales Wachstum wie auf fungizidfreiem Medium. Im Sporenkeimtest (Abb. 12) traten zwischen den Konzentrationen 10, 30 und 100 µg/ml keine und gegenüber 3 µg/ml nur geringe Unterschiede auf. Auf fungizidfreiem Agar keimten die Sporen aller Stämme zu 100 %, während bei allen Fungizidkonzentrationen die Sporenkeimung zwar etwas schlechter war, jedoch auch bei 100 µg/ml nicht unter 60% sank. Stämme mit der Herkunft "Dorfrebe" zeigten bei allen Vinclozolin-Konzentrationen normales Keimverhalten, bei einigen Stämmen der Isolate aus "Oedischwend" wurde gehäuft eine abnormale Keimung mit verdickten und zusätzlich verzweigten Keimschläuchen beobachtet. Die während mehreren Jahren verwendeten Dicarboximiden hatten keinen Einfluss auf das Verhalten laborresistenter Stämme. Die Stämme beider Herkunftte verhielten sich bezüglich Laborresistenz im Myzeltest gleich und zeigten im Sporenkeimtest nur graduelle Unterschiede.

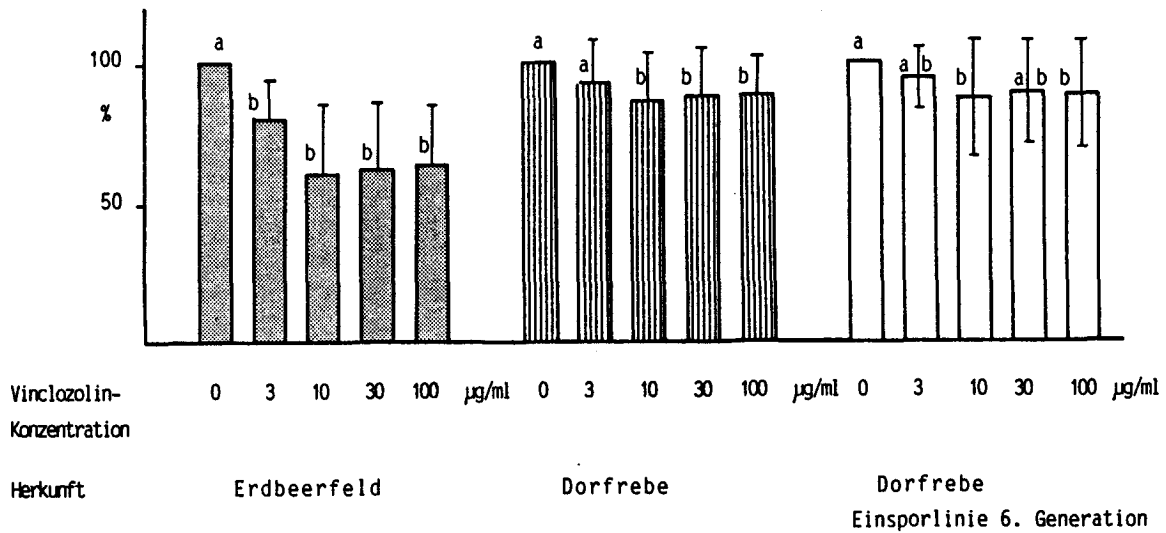


Abb. 12 : Sporenkeimung in Prozent von 18 beziehungsweise 10 spontan auf 3 µg/ml Vinclozolin gewachsenen Stämmen ausgehend von Isolaten aus der seit Jahren mit Dicarboximiden behandelten "Dorfprebe" bzw. aus einem noch nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerfeld und von 17 laborresistenten Stämmen aus der 6. Generation einer Einsporlinie eines Isolates aus der "Dorfprebe" auf zunehmender Fungizidkonzentration. Drei Wiederholungen pro Stamm und Konzentration, verschiedene Buchstaben innerhalb Herkunft kennzeichnen signifikante Unterschiede im Kruskal-Wallis Test ($p=0.05$)

3.3.2. Das Auftreten von Laborresistenz nach Behandlung mit mutagener Substanz

Mutagene Agentien bewirken genetische Veränderungen die bei haploiden Organismen sofort auswirken. Bei Vorversuchen kamen zwei chemischen Substanzen in Betracht: N-Methyl N-nitro N-Nitrosoguanidin und 1 Nitroso 1-Methylharnstoff. Beide vermögen DNA-Molekülen zu methylieren, was zu Punktmutationen durch verfälschte DNA-Replikation und Transkription

führt (Lawely, 1979; Rajewsky, 1980). Konzentrationen und Einwirkungszeit stellen zwei wichtige Parameter dar, die je nach Organismus variieren.

Da keine Literaturangabe über diese Werte bei Botrytis cinerea gefunden werden konnten, wurden in Vorversuchen verschiedene Konzentrationen und Inkorporationszeiten getestet. Die Substanz 1 Nitroso-1-Methylharnstoff erwies sich wegen der kurzen Halbwertszeit von nur 10 Minuten und nur geringer Wirkungen als ungeeignet. Bei N-Methyl-N' nitro N-Nitrosoguanidin wurde eine Konzentration von 10 mM und eine Einwirkungszeit von 30 Minuten als optimal betrachtet. Diese Bedingungen bewirkten eine Keimhemmung von 85-98% in den ersten 24 Stunden.

3.3.2.1. Myzeltest nach Behandlung mit mutagener Substanz

Untersuchungen über den Einfluss von mutagenen Substanzen auf das Vorkommen von Laborresistenz können Hinweise auf die Entstehung resistenter Stämme geben. Nach der Behandlung der Konidien mit der mutagenen Substanz wurde ein Myzeltest auf 3 und 10 µg/ml Vinclozolin durchgeführt.

Tabelle 14 zeigt das Auftreten laborresistenter Stämme auf 3 und 10 µg/ml Vinclozolin mit und ohne mutagene Behandlung bei drei Isolaten aus einem noch nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerfeld in Mettmensstetten.

Das Experiment wurde mit 12 Wiederholungen pro Isolat und Konzentration durchgeführt und die Auswertung erfolgte nach 5 Tagen Inkubation.

Tab. 14 : Anzahl laborresistenter Stämme auf 3 und 10 µg/ml Vinclozolin bei 3 mit mutagener Substanz behandelten und unbehandelten sensiblen Isolaten

Isolat	Ohne mutagene Substanz		Mit mutagener Substanz	
	3 µg/ml	10 µg/ml	3 µg/ml	10 µg/ml
M 6	1	0	6	0
M 12	0	1	9	3
M 37	1	0	12	0

Nach den Tabelle 14 dargestellten Ergebnisse hat die Behandlung mit mutagener Substanz einen Einfluss auf das Auftreten von Laborresistenz bei Kultur auf 3 µg/ml Vinclozolin. Morphologische Veränderungen traten dabei nicht auf; der Durchmesser aller in Tabelle 14 aufgeführten Stämme war nach 5 Tagen grösser als 12 mm.

Bei freilandresistenten Isolaten bleibt das Resistenzniveau im Myzeltest auf Fungizid-Agar bei 3 µg/ml Fungizid stehen (Schüepp und Küng, 1978, Schüepp et. al., 1982). Auf höheren Konzentrationen zeigen sie ein gehemmes Wachstum von einigen Millimeter um die Rondelle. Die Einwirkung der mutagenen Substanz im Myzeltest wurde anhand von drei freilandresistenten Isolaten aus der "Untere Schlossrebe" untersucht. Die Ergebnisse des Experimentes sind in Abbildung 13 zusammengefasst.

Freilandresistente Isolate erhöhten nach Einwirkung mutagener Substanz ihr Wachstum auf 10 und teilweise auf 100 µg/ml Vinclozolin. Sowohl bei Stämmen, welche mit mutagener Substanz behandelt worden waren wie auch nicht behandelte bildete sich auf beiden Konzentrationen ein gehemmes Myzel um die Rondelle. Erst aus diesen dicht erworbenen Hyphen wuchs jedoch bei "Behandelt" ein normales Myzel heraus (teils in Sektoren teils auf die ganze Peripherie regelmässig verteilt). Bei allen Wiederholungen mutagen behandelte Stämme liess sich auf 10 µg/ml ein stärkeres radiäres Wachstum der Kulturen feststellen, wobei eine beachtliche Streuung zu verzeichnen war.

Die Einwirkung der mutagenen Substanz führte in diesem Experiment auch bei den freilandresistenten Stämmen zu einem ähnlichen Resistenzverhalten wie dies fast ausschliesslich nur mit den sensiblen Freilandisolaten beobachtet worden war. Die 3 µg/ml resistenten Isolate verloren in vitro nach mutagener Behandlung ihre Stabilität und waren in der Lage höhere Resistenzniveaus zu erreichen.

Gegenüber Benzimidazolen können unter Laborbedingungen im Gegensatz zum Freiland keine resistenten Botrytis cinerea-Stämme gefunden werden (Leroux und Gredt, 1982). Zur Ueberprüfung dieses Befundes wurden Konidiensuspensionen von 6 gegenüber Benzimidazolen sensiblen Isolaten mit mutagener Substanz behandelt und beim anschliessenden Myzeltest konnte keine Veränderung der Sensitivität beobachtet werden. Bei den Untersuchungen mit Dicarboximiden brachte eine zweite Behandlung mit mutagener Substanz bei keinem der Isolate eine Steigerung des Resistenzniveaus.

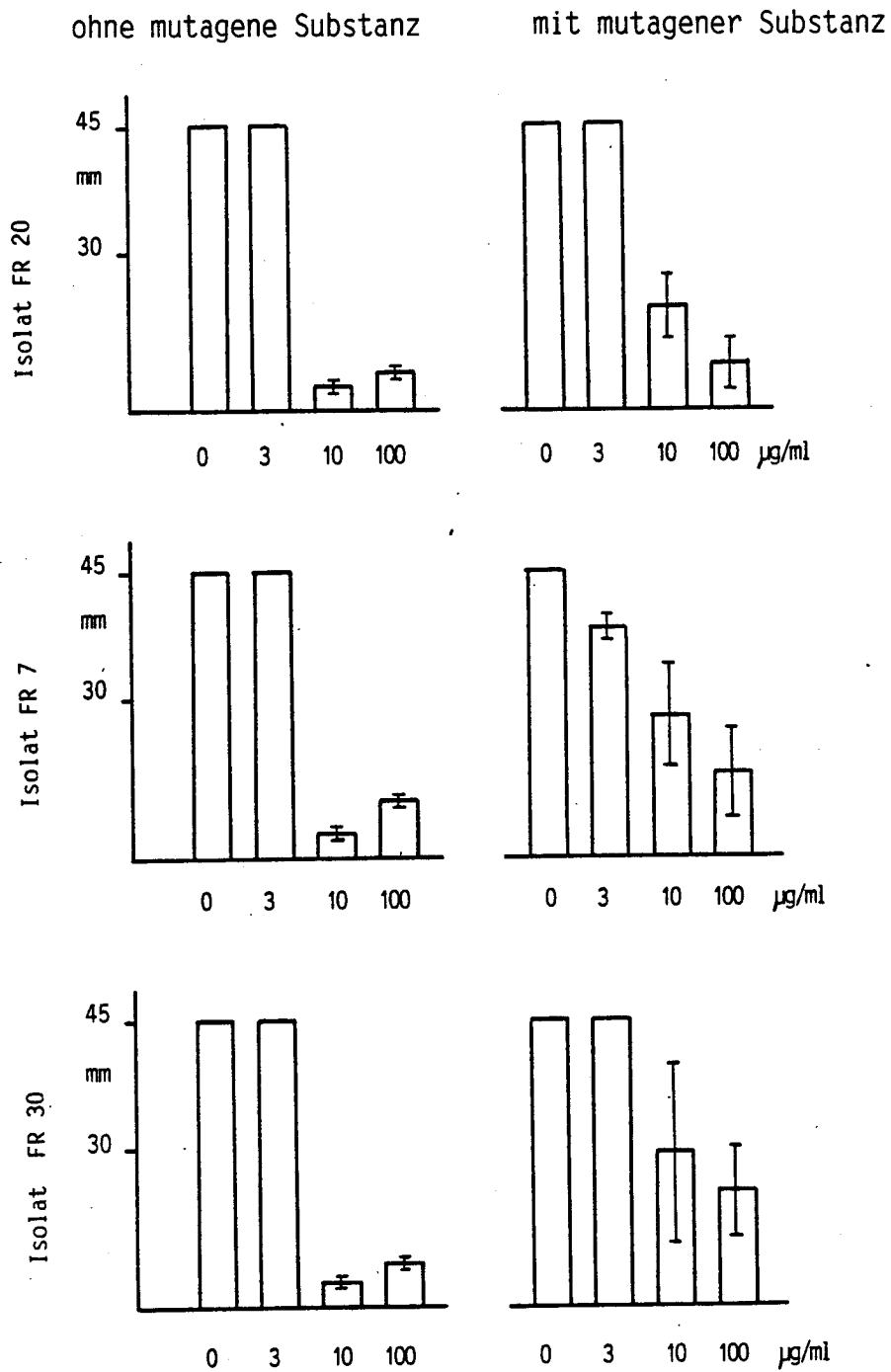


Abb. 13 : Durchmesser der Kolonien freilandresistenter Isolate auf verschiedenen Vinclozolin-Konzentrationen mit und ohne mutagener Behandlung nach 5 Tagen Inkubation, 9 Wiederholungen pro Isolat und Variante

3.3.2.2. Wachstum auf hohen Fungizidkonzentrationen nach Behandlung mit mutagener Substanz

In ähnlicher Weise wie bei den spontan auftretenden laborresistenten Stämmen (Abschnitt 3.3.1.3.) wurden die mit mutagener Substanz induzierten resistenten Stämme, direkt auf höheren Fungizidkonzentrationen (10 und 100 µg/ml Vinclozolin) getestet. Die auf 3 µg/ml gewachsenen laborresistente Stämme der Isolate M 6 und M 37 (Tab.14) konnten sich alle bis 100 µg/ml Vinclozolin normal entwickeln. Die aus M 12 entstandenen Stämme hingegen zeigten ein unterschiedliches Verhalten. Bei drei Wiederholungen reichte das Wachstum auf 3 µg/ml nicht aus, um Rondellen zu stechen und somit auf höheren Konzentrationen geprüft zu werden. Von den 6 laborresistenten Stämmen konnten sich 3 auf 10 und 100 µg/ml nicht entwickeln während 3 leicht gehemmtes Wachstum zeigten. Die gegenüber 10 µg/ml resistenten Stämme des Isolates M 12 waren beim anschliessenden Test auf 100 µg/ml leicht gehemmt.

Auch die je neun Stämme der gegenüber 3 µg/ml feldresistenten Isolate FR 7, FR 20 und FR 30 der "Unteren Schlossrebe" (Abb.13) wurden auf höheren Konzentrationen des Fungizides getestet. Alle 27 Stämme vermochten auf 100 µg/ml Vinclozolin in gleicher Weise wie auf fungizidfreiem Medium zu wachsen.

3.3.2.3. Sporenkeimtest nach Behandlung mit mutagener Substanz

Der Einfluss mutagener Substanz wurde auch auf die Konidienkeimung geprüft. Der übliche Keimtest erwies sich allerdings als ungeeignet, weil die Konidienkonzentration auf der Agarrondelle zu gering war und während der sich über mehrere Tage erstreckende Beobachtungszeit die Scheibchen austrockneten. Dafür bot das Ausplattieren von behandelten und nicht behandelten Konidien in fungizidhaltigen Petrischalen die Möglichkeit, deren Keimverhalten über längere Zeit zu verfolgen.

Die mutagene Substanz wurde einer Konidiensuspension zugegeben, nach Ablauf der Einwirkungszeit wurde sie auf dem Milliporfilter von den Konidien abgespült, die anschliessend auf fungizidhaltigen Malzgarschalen (3 und 10 µg/ml) gebracht und mit einem gebogenen Glasstab regelmässig

verteilt wurden. Vor der Zugabe der Konidien auf den Fungizidagar wurde die Konzentration der Konidiensuspension bestimmt, da durch Milliporfiltration und die nachfolgende Resuspension Verluste auftraten. Die Auswertung des Versuches erfolgte am 2., 3. und 6. Tag durch Auszählen und Messen der gewachsenen Kolonien bei 20 Wiederholungen (Tab. 15). Eine eindeutige Zunahme der Anzahl resistenter Kolonien auf 3 µg/ml wurde erst 6 Tagen nach Versuchsbeginn festgestellt. Die Verzögerung der Keimung war wahrscheinlich auf die Hemmwirkung der mutagenen Substanz zurückzuführen. Fast 100 Prozent der Konidien keimten schon nach dem 2. Tag auf 3 µg/ml, wovon sich jedoch im besten Fall weniger als ein Promill normal entwickeln konnten. Neben den normalwachsenden Kolonien traten auch solche mit gehemmten oder punktförmigem Wachstum auf. Uebereinstimmend mit den Ergebnissen des Myzeltests stellte die Konzentration 10 µg/ml in den meisten Fällen auch für die Sporenkeimung eine unüberwindbare Hürde dar. Die Behandlung mit mutagener Substanz erbrachte auf dem Niveau von 10 µg/ml keine Zunahme der Keimungsrate. Bei dieser Fungizidkonzentration traten nur normal wachsende Kulturen nicht aber gehemmte oder punktförmige Kolonientypen auf. Schwer erklärbar war der am 6. Tag ausgezählte beachtliche Anteil von 14 resistenten Konidien auf eine Million beim Isolat E 35 in der unbehandelten Variante. Bei demselben Isolat war beim früheren, im Abschnitt 3.1.5. beschriebenen Versuch nur eine von 6 Millionen Konidien resistent. Es ist anzunehmen, dass sich der Anteil resistenter Konidien bei diesem Isolat nach mehrmaligem Ueberimpfen verändert hat. Innerhalb der einzelnen Wiederholungen zeigten sich grosse Unterschiede im Radialwachstum. Dicht nebeneinanderwachsende Kolonien hemmten sich gegenseitig, weshalb deren Radialwachstum nicht mit auf fungizidfreiem Medium wachsenden Kolonien verglichen werden konnte.

Tab. 15 : Anzahl resistenter Kolonien auf 10^6 Konidien nach Behandlung mit 10 mM N-Methyl-N' nitro N-Nitrosoguanidin verglichen mit Unbehandelt auf Malzagar mit 3 und 10 $\mu\text{g/ml}$ Vinclozolin

Isolat	mutagene Substanz	2 Tage nach Versuchsbeginn		3 Tage nach Versuchsbeginn		6 Tage nach Versuchsbeginn	
		3 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
M 6	unbehandelt	0	0	0	0	0.6	1.2
M 6	behandelt	0*	0	1.3	0	27	0
M 37	unbehandelt	0.2	0	0.2	0.1	0.2	0.1
M 37	behandelt	0*	0.2	3.3	0.6	67.8	2.7
M 35	unbehandelt	1.0	0.5	6.1	3.2	14.1	10.9
M 35	behandelt	0*	0	1.3	0.3	58.2	7.5

* abnormal gekeimte Konidien, keine vom Auge sichtbaren Kolonien

3.4. Vergleich zwischen laborresistenten Stämmen und ihren sensiblen Ursprungsisolaten aufgrund von ausgewählten Beispielen

Der Vergleich von sensiblen Freilandisolaten mit den von diesen entstandenen gegenüber Vinclozolin resistenten Laborstämmen stützte sich auf Untersuchungen über Fitness, Pathogenität, Enzymaktivität sowie Proteinstmuster. Magro und Mitarbeiter (1980) konnten beweisen, dass wesentliche Unterschiede von Protein- und Polygalacturonasemuster zwischen verschiedenen Isolaten bestehen und diese auch je nach Alter der Kulturen variieren. Aufgrund dieser Arbeit wären Abweichungen dieser Eigenschaften zwischen sensiblen und resistenten Isolaten eher mit der natürlichen Variabilität als mit der Resistenz verbunden.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden sensible Freilandisolate und

daraus spontan auftretenden laborresistente Stämme verwendet. Die drei Isolate stammten aus Hallau (S10), Wädenswil (K25) und Metmenstetten (M37) und wurden von Trauben aus Kontrollparzellen (S10, K25) oder aus ohne Fungizideinsatz angebauten Erdbeeren (M37) isoliert. Sie bildeten auf 3 und 10 $\mu\text{g/ml}$ Schalen spontan resistente Stämme. Auf 3 $\mu\text{g/ml}$ traten drei Stämme (K25 3b, K25 3c, K25 3d) aus dem Isolat K25 und zwei Stämme aus M37 (M37 3d, M37 3g) auf. Auf der höhere Konzentration entwickelten sich 2 Stämme (K25 10a, K2510b) aus dem sensiblen Isolat K25 und ein Stamm (S10a) aus S10.

Innerhalb den aus K25 entstandenen Stämmen wurden für die Resistenz-, Fitness- und Enzymuntersuchungen diejenigen mit der geringsten Pathogenität auf Äpfeln (Abb.15) verwendet. Die Resistenzprüfung erfolgte nach einer Passage auf fungizidfreien Medium auf Vinclozolin-Konzentrationen von 1 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ (Abb.14)

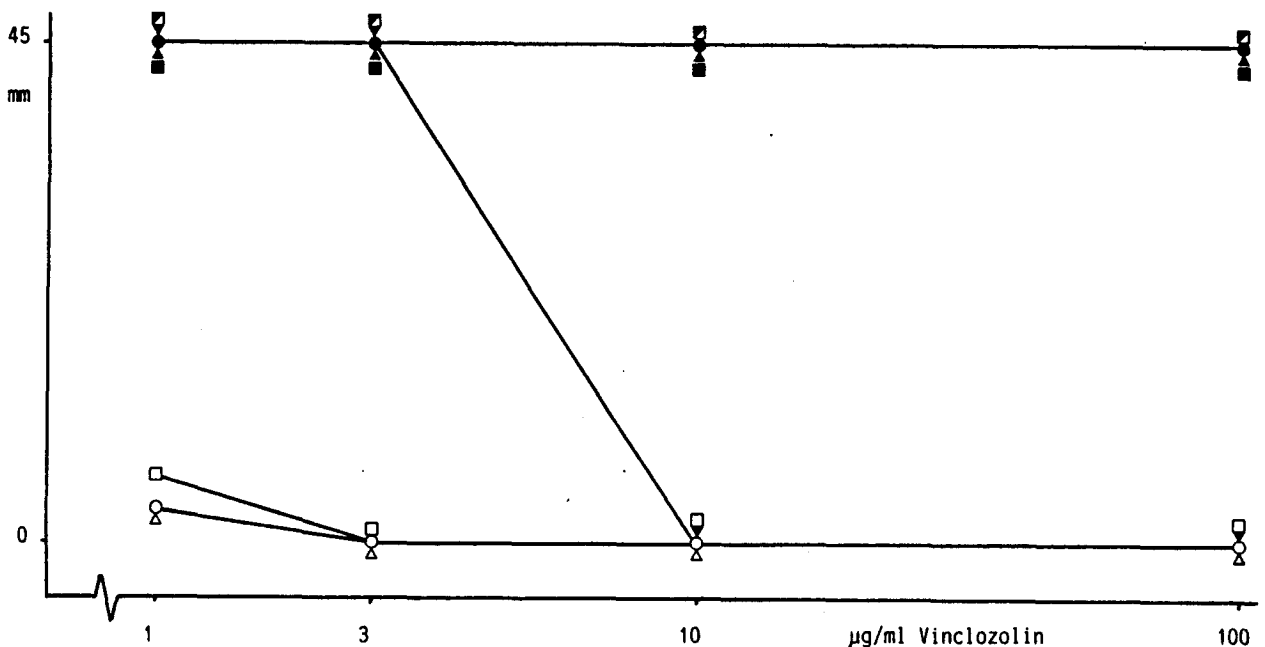


Abb. 14 : Durchmesser der Kolonien der sensiblen Ursprungsisolate und ihrer laborresistenten Stämme auf verschiedenen Fungizidkonzentrationen, Durchschnitt aus 3 Wiederholungen nach 5 Tagen Inkubationszeit

Wie aus der Abbildung 14 hervorgeht, besaßen die Laborstämme ein höheres Resistenzniveau als ihre Ursprungsisolate. Mit Ausnahme des Stammes K25 3c wurde ihr Wachstum bis 100 µg/ml Vinclozolin nicht beeinträchtigt. K25 3c konnte sich, wie die freilandresistenten Isolate, nur bis 3 µg/ml entwickeln.

3.4.1. Fitness von Freilandisolaten und daraus entstandenen laborresistenten Stämmen

Unter dem Begriff "Fitness" verstehen wir die Summe der für das Gedeihen des pilzlichen Erregers wichtigen Eigenschaften wie Art und Intensität der Pathogenität, Fähigkeit zur Sporulation, Verträglichkeit erhöhter osmotischer Drucke. Aufschluss über diese Eigenschaften ergeben sich aus Experimenten.

3.4.1.1. Pathogenität

Die Pathogenität sensibler und laborresistenter Stämme wurde mit dem im Kapitel Material und Methoden beschriebenen Apfeltest geprüft und die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

In der Regel zeigten laborresistente Stämme eine verminderte Pathogenität gegenüber den Ausgangsisolaten; in Ausnahmefällen existieren auch Stämme mit ebenso hoher Pathogenität wie Isolate aus dem Freiland. Das unterschiedliche Verhalten bezüglich der Pathogenität auf Äpfeln der 3 für die Abbildung 15 ausgewählten Isolate im Vergleich zu den daraus spontan entstandenen laborresistenten Stämmen kann aufgrund von Vorversuchen mit zahlreichen anderen Isolaten als repräsentativ betrachtet werden. Dieselben Isolate und ihre laborresistenten Stämme, bei welchen mit der Resistenzbildung gleichzeitig ein Pathogenitätsverlust auftrat, wurden auch für die in folgenden Kapiteln beschriebenen Untersuchungen verwendet.

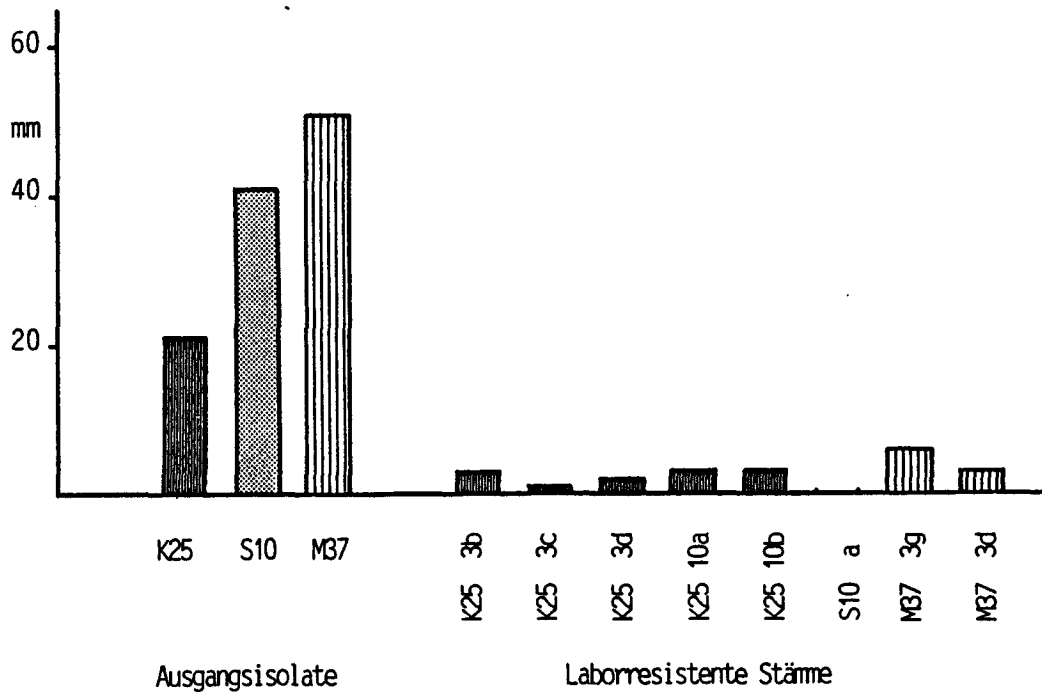


Abb. 15 : Durchmesser der Faulstellen bei Äpfeln der Sorte Golden Delicious verursacht von Ausgangsisolaten sowie resistenten Laborstämmen nach 5 Tagen, Durchschnitt aus drei Wiederholungen pro Isolat bzw. Stamm

3.4.1.2. Sporulation

Malzagar (MA) und Kartoffeldextroseagar (PDA) stellen die zwei für Botrytis-Untersuchungen am häufigsten verwendeten Nährmedien dar. Je zwei Petrischalen mit diesen Nährsubstraten wurden mit den sensiblen Isolaten und den resistenten Stämmen beimpft und bei 20°C während 11 Tagen inkubiert. Die Bestimmung der Sporulation erfolgte mit Hilfe eines Coulter Counter nach Zugabe von 10 ml isotonischer Lösung. Die Konidien wurden mit einer Impfnadel abgekratzt, mit 10 ml derselben Lösung gewaschen und durch sterile Glaswatte filtriert. Wenn nötig, wurde die Suspension vor dem Zählen verdünnt. Nach Vorversuchen lag der Durchmesser der Konidien von Botrytis cinerea zwischen 4 und 10 µm. Der Versuch (Tab.16) bestätigt, dass PDA die Konidienbildung begünstigt. Besonders deutlich liess sich der Unterschied zu MA bei den üppig sporulierenden sensiblen Isolaten erkennen. Innerhalb der resistenten Stämme zeigte nur K25 3d eine dem

Ausgangsisolat annähernd gleich gute Sporulation; alle anderen Stämme zeigten eine wesentliche geringere Fähigkeit zur Konidienbildung als die Ausgangsisolate.

Tab. 16 : Anzahl Konidien pro cm^2 bei sensiblen Isolaten und resistenten Laborstämmen auf MA und PDA. Durchschnittswerte aus 6 Auszählungen pro Wiederholung

Isolat	Stamm	Anzahl Konidien pro cm^2	
		Malzagar	PDA
S10		1 270 000	3 420 000
	S10 a	592 000	482 000
K25		528 000	2 239 000
	K25 3c	41 000	86 000
	K25 3d	328 000	1 919 000
M37		602 000	2 969 000
	M37 3d	28 000	27 000
	M37 3g	34 000	27 000

3.4.1.3. Myzelverträglichkeit gegenüber erhöhten osmotischen Drucken

Die Verträglichkeit gegenüber erhöhten osmotischen Drucken stellt eine wichtige Voraussetzung für die Besiedlung zuckerhaltiger Substraten dar. Ein Myzeltest wurde auf 2 % Malzagar mit zunehmender Glucosekonzentration (1-15 %) durchgeführt. Als Inokulum dienten Malzagarrondelle mit gekeimten während 16 Stunden inkubierten Konidien.

Aus der Abbildung 16 geht hervor, dass die sensiblen Freilandisolate eine bessere Verträglichkeit gegenüber erhöhten osmotischen Drucken als ihre resistenten Laborstämmen besitzen. Sie zeigten ein normales Wachstum auf allen Konzentrationen und sehr geringe Abweichungen innerhalb der drei

Wiederholungen. Teilweise wurde schon in den Kontrollschalen ein vermindertes Wachstum der laborresistenten Stämmen festgestellt, die mit zunehmender Konzentration wesentlich stärker gehemmt waren. Bei den Stämmen S10a , K25 3c und K25 3d traten innerhalb der Wiederholungen häufig Varianten auf, die in Form von feinem Hyphengeflecht auch auf höheren Glucosekonzentrationen wesentlich weniger gehemmt waren und in Abbildung 16 mit in Klammer stehenden Symbolen bezeichnet werden. Es lag nahe zu vermuten, dass diese Stämme resensibilisiert waren, weshalb ihr Resistenzniveau nach einer Passage über PDA nachgeprüft wurde.

In den meisten Fällen konnte keine Veränderung der Resistenz festgestellt werden. Beim Stamm S10a jedoch fanden sich sowohl auf 10% wie auch auf 15% Glucose je zwei weniger stärker gehemmte Wiederholungen wovon je einer ein Resistenzniveau von 100 $\mu\text{g/ml}$ Vinclozolin aufwies während der andere sensibel geworden war. Ausser den oben erwähnte, durch in Klammer gesetzte Symbole dargestellte Variante stimmten die drei Wiederholungen jeweils praktisch völlig überein, weshalb auf die Darstellung der minimalen Streuung verzichtet werden kann.

150 g Glucose / 1000 ml Nährlösung = a_w - Wert von ca. 0,97

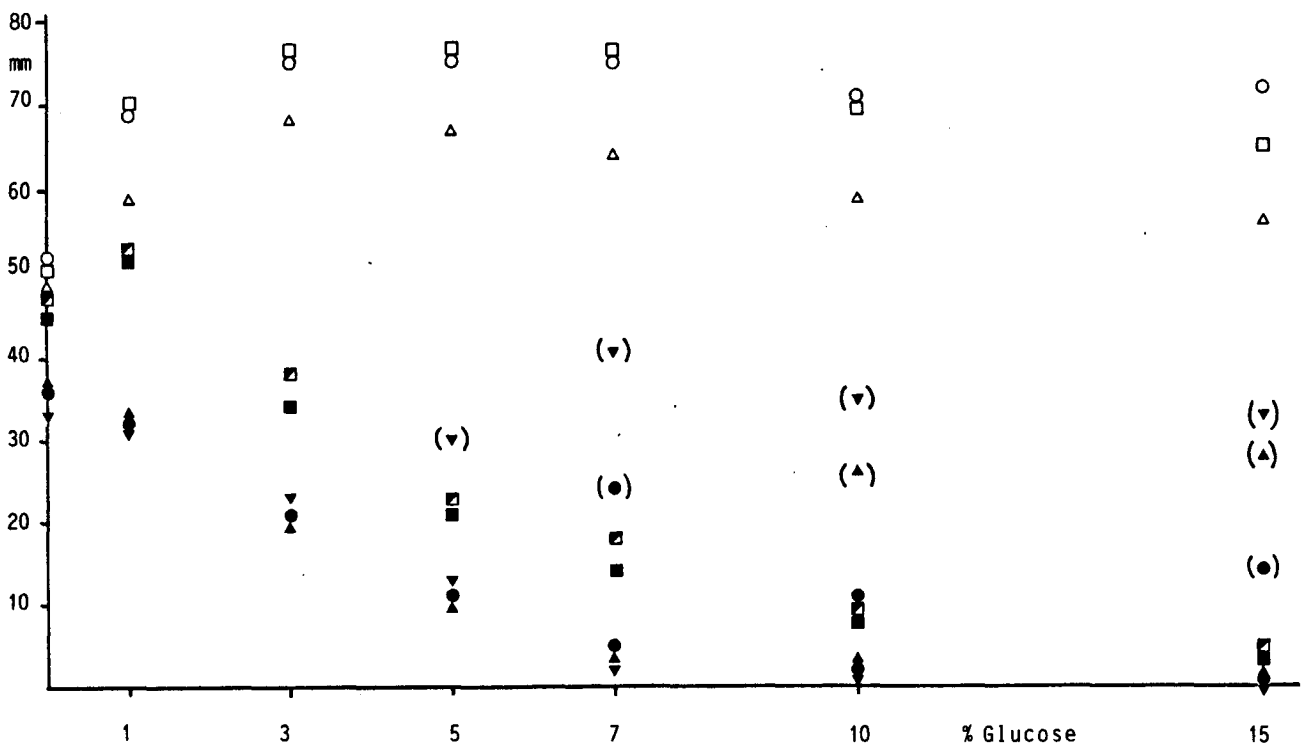


Abb. 16 : Text siehe folgende Seite

Abb. 16 : Myzelwachstum von sensiblen Isolaten und von den daraus entstandenen laborresistenten Stämmen nach drei Tagen Inkubation auf Malzagar mit verschiedenen Glucosekonzentrationen, Durchschnittswerte aus drei Wiederholungen, Symbolen in Klammer bezeichnen einzelne Varianten innerhalb der Wiederholungen, die bei den höheren osmotischen Drucken weniger gehemmt waren

3.4.2. Enzymuntersuchungen an sensiblen Isolaten und laborresistenten Stämmen

Die Fähigkeit Polysaccharide pflanzlicher Zellwände abzubauen, ist bei den Mikroorganismen weit verbreitet und nicht nur auf Pathogene beschränkt. Bei der Bezeichnung dieser Polymere ist die Veresterung der Carboxylgruppen mit Methanol entscheidend: nicht veresterte Polymere werden Pektinsäuren, stark veresterte Pektine genannt. Zum Abbau beider Formen von Polysacchariden sind zwei Enzymgruppen fähig: Polygalacturonase und Lyasen. Bei den Polygalacturonasen wird die Bindung durch Hydrolyse gespalten, die Lyasen bilden durch Transeliminierung eine ungesättigte Bindung zwischen C4 und C5 der Gal Molekülen an den nicht reduzierenden Enden der gespaltenen Kette. Eine weitere Unterteilung in Exo- und Endo-Formen stützt sich auf die Ansatzstelle des Enzyms: terminal (exo) oder zufällig verteilt, im Inneren der Kette (endo) (Callow, 1983). Diese Enzyme sind extracellulär und somit im Medium nachweisbar. Die Botrytis-Isolate und ihre Mutanten wurden für 14 Tagen als Standkultur in zwei verschiedenen Medien inkubiert. Einerseits wurde das unter Material und Methoden beschriebene Medium von Zalewska (1975) andererseits dasselbe Medium, das an Stelle des Pektins gewaschenes Zellwandmaterial der Apfelsorte Golden Delicious enthielt. Nach Abtrennung des Myzels wurden die Proteine gereinigt, lyophilisiert und deren Konzentration nach der Methode von Lowry (1951) bestimmt.

Die Proteine der verschiedenen Botrytis cinerea-Isolate sowie der resistenten Stämme liessen sich mit der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamid-Gelen trennen. Neben der allgemeine Proteinfärbung mit Comassie R 250, wurden auch die Isoenzyme der Polygalacturonase, Pektin-Lyase und Pektin-Esterase untersucht. Die isoelektrische

Fokussierung dauerte sechseinhalb Stunden wovon die Vorfokussierung ohne Probe 45 Minuten in Anspruch nahm. Die Spannung wurde von 200 V bis 1000 V stufenweise manuell erhöht. Der pH-Gradient gab Hinweise über den Verlauf der Fokussierung, variierte kaum innerhalb der einzelnen Gele und verlief linear zwischen pH 2.55 und pH 8.7. Die mit der Elektrolytlösungen durchdränkten 3 cm breiten Streifen befanden sich an den beiden Enden des Gels. Die für die Trennung der Proteine zur Verfügung stehende Länge des Gels betrug 13 cm.

Sowohl die mit Comassie R 250 als auch die mit Ruthenium Rot gefärbten Gele sind in der Abbildung 17 dargestellt. Die drei Freilandisolate und ihre Vinclozolin resistenten Mutanten gaben in die beide Medien eine beachtliche Anzahl extracellulärer Proteine ab. Gut getrennte und gefärbte Banden bei der Comassie-Färbung kennzeichneten eine hohe Konzentration der entsprechenden Proteine, die sich über einen weiten pH-Bereich erstreckten. Die Resistenzbildung war auch mit einer Veränderung der Proteinmuster gekoppelt, traten doch nicht nur Konzentrationsänderungen bei schon vorhandenen Proteinen sondern auch zusätzliche Proteine auf, die durch einzelne neue Banden nachgewiesen wurden. Der resistente Stamm S10a produzierte im Pektin-Medium mehr Proteine als S10, was auch bei K25 und dessen Mutanten K25 3c und K25 3d festgestellt wurde.

Im Fall von M37, M37 3d und M37 3g war bei M37 3g eine reduzierte Anzahl und Intensität der Banden feststellbar. Wurden die Isolate und Laborstämme im Medium mit gewaschenen Apfelzellen kultiviert, waren die Unterschiede nicht so ausgeprägt.

Das Substrat beeinflusste das Spektrum der extracellulären Proteine, zugunsten vermehrt auftretenden Polygalacturonasen. Deutlich unterscheidbare Banden waren vorallem im saueren Bereich feststellbar. Am kathodischen Ende war bei den Stämmen S10, S10a, M37 und dessen Mutanten eine kontinuierliche aufgehellte Zone vorhanden. Bei der Polygalacturonase-Isoenzymen waren zwei Banden eindeutig gemeinsam bei sämtlichen Isolaten und Stämmen in beiden Nährsubstraten. Diese Enzyme zeigten ein pI von 4.1 und 4.3 und waren in allen Untersuchungen sehr aktiv. Es konnte eine weitere in allen Varianten gemeinsame Bande festgestellt werden, die jedoch nicht immer sehr eindeutig war, zumal bei pH 3.5.

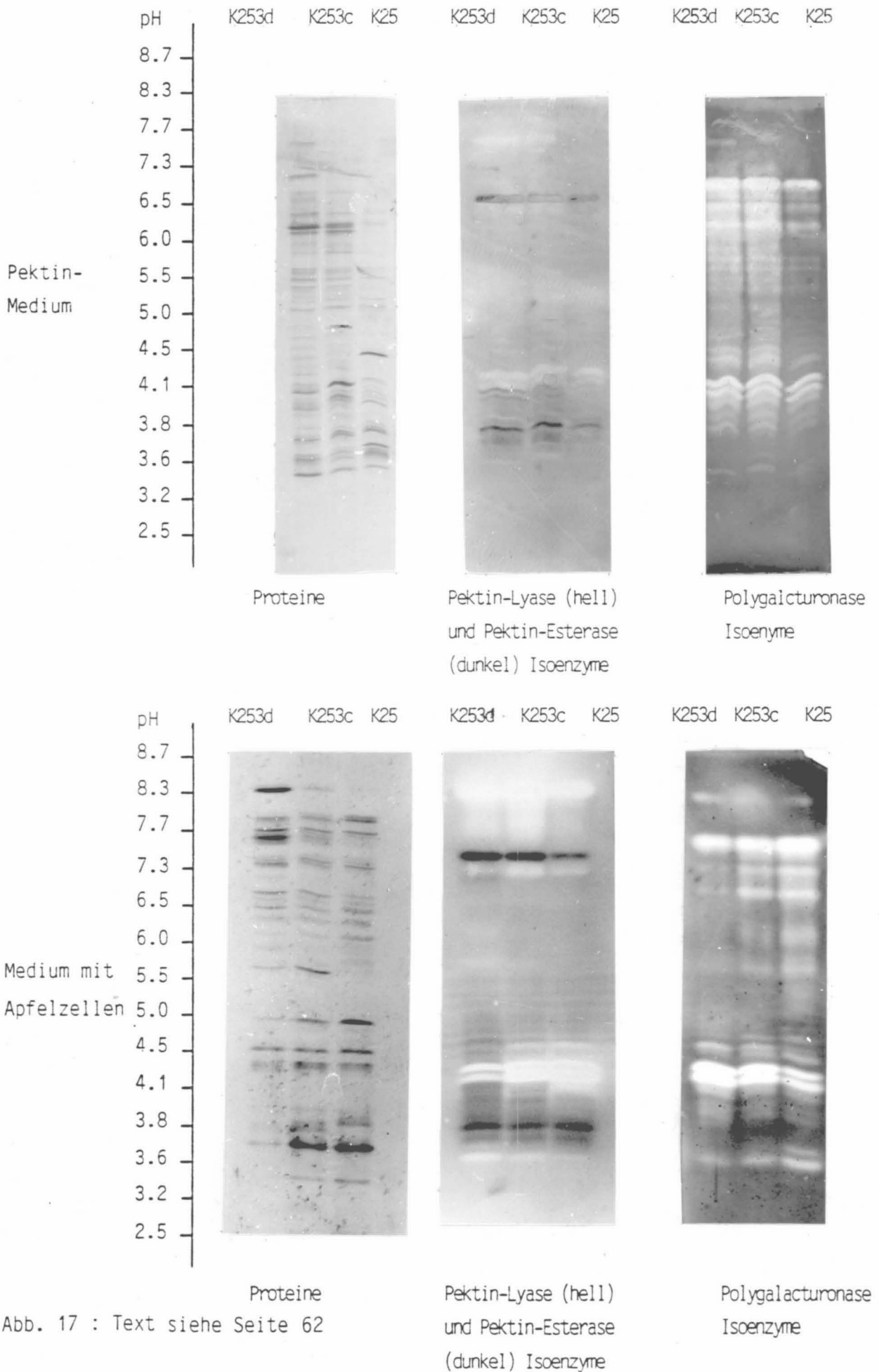


Abb. 17 : Text siehe Seite 62

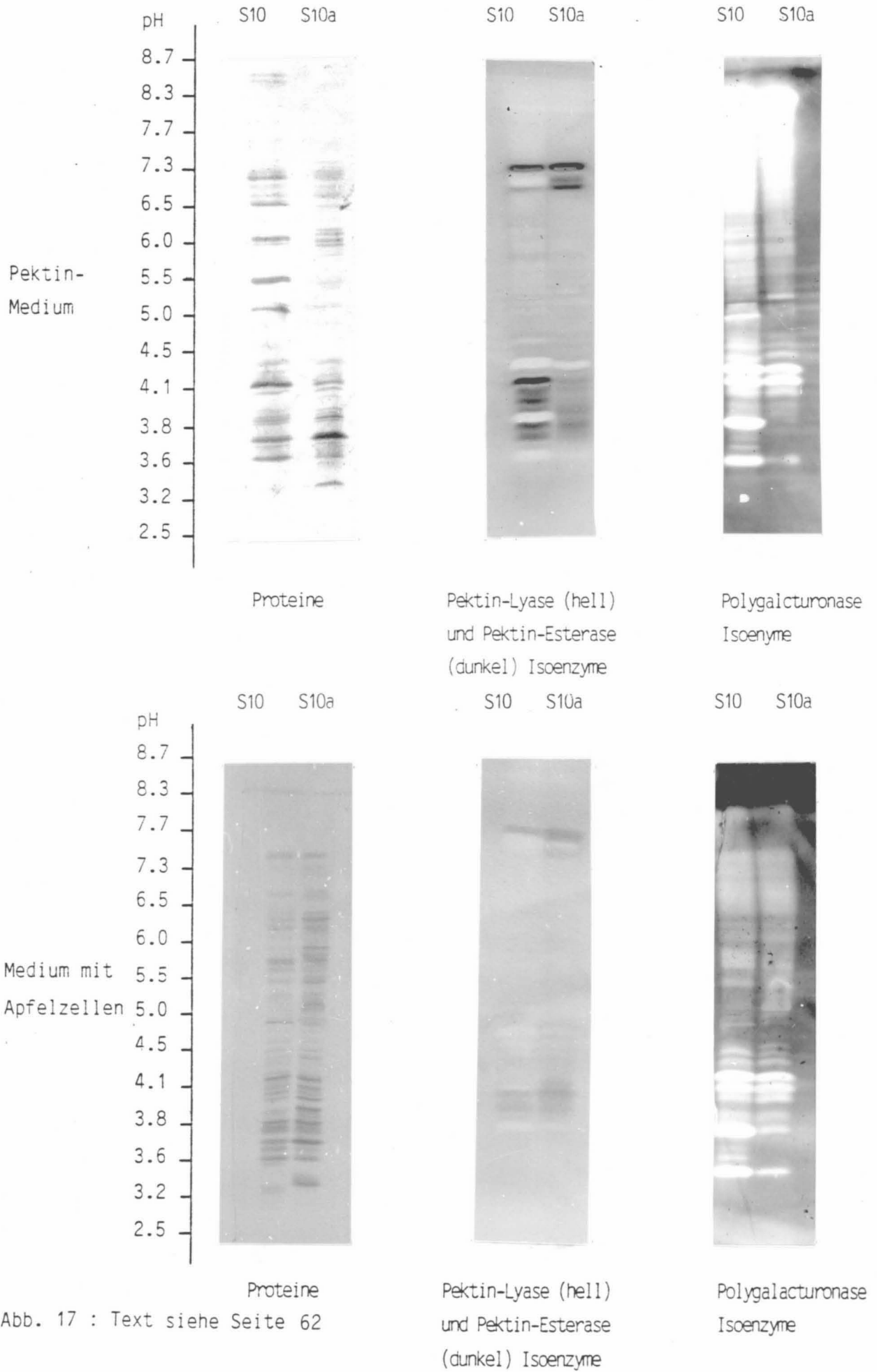


Abb. 17 : Text siehe Seite 62

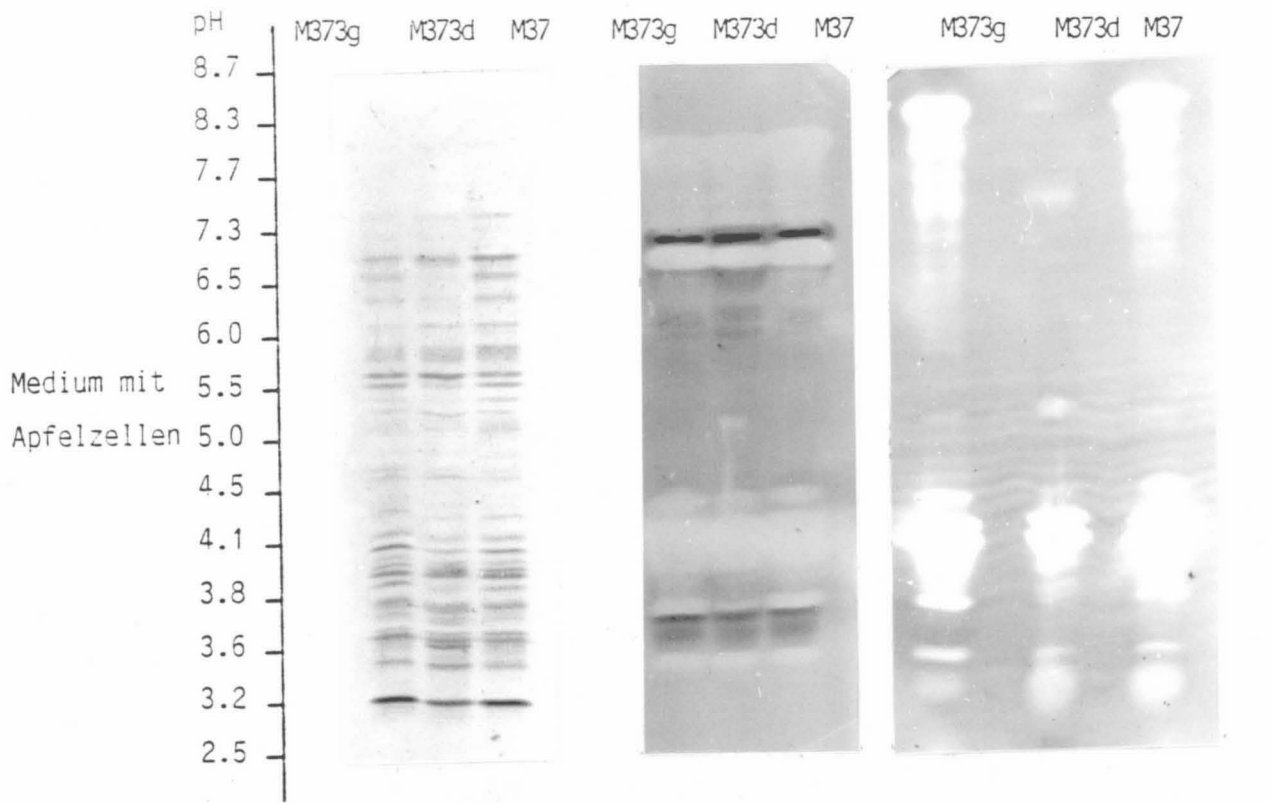
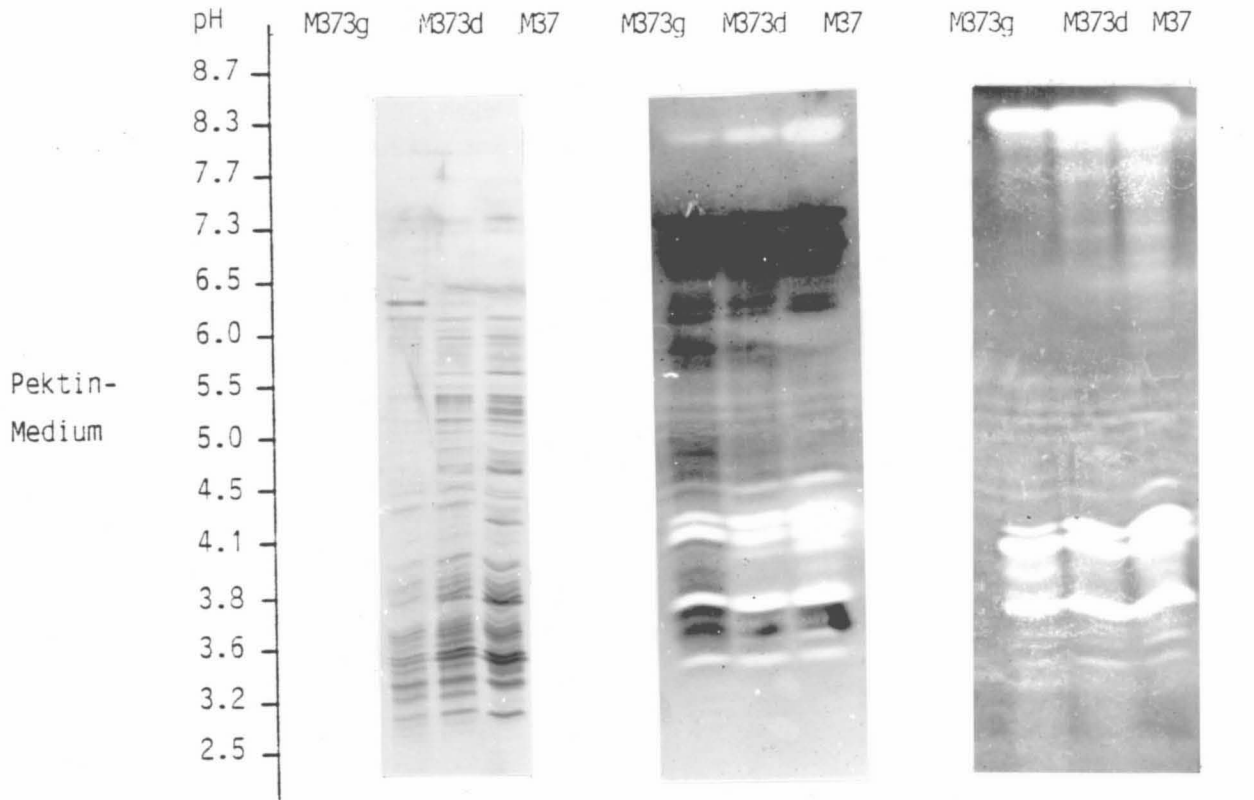


Abb. 17 : Text siehe Seite 62

Abb. 17 : Proteinmuster, Isoenzyme von Pektin-Lyase, Pektin-Esterase und Polygalacturonase nach der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamid Gelen bei sensiblen, pathogenen Freilandisolaten S10, K25 und M37 sowie ihrer resistenten, nicht pathogenen Laborstämme S10a, K25 3c, K25 3d, M37 3d und M37 3g kultiviert mit Pektin oder Apfelzellen als Kohlenstoffquelle

Resistente, nicht pathogene Stämme kennzeichneten sich durch das Vorhandensein mehrerer Isoenzyme aus. S10a wies im Pektin-Medium bei pH 3.7 eine zusätzliche Bande auf, die bei S10 nicht nachweisbar war. Die Unterschiede bei K25 und dessen resistenten Mutanten K25 3c und K25 3d waren hingegen in den beiden Medien mehr qualitativ als quantitativ, was auf die stärkere Aktivität der Stämme zurückzuführen war. Im Medium mit gewaschenen Apfelzellen zeigte der Stamm M37 3d eine Reduktion der Isoenzyme in neutralem und alkalischem Bereich, sodass nur eine einzige Bande bei pH 7.4 gemeinsam mit M37 und M37 3g blieb. Die nach photometrischen Methoden gemessene Aktivität stimmt gut überein mit derjenige, die aus der Intensität der Banden abgeleitet wurde.

Unterschiede in den Pektin-Esterase-Isoenzymen wurden zwischen S10 und S10a festgestellt. In sauerem pH Bereich (pH 3.6-4.0) zeigte der resistente Stamm S10a im Pektin-Medium intensiv gefärbte Banden ; beim pH 6.5 wies S10 Pektin-Esterase-, S10a hingegen Pektin-Lyase-Aktivität.

Ebenfalls beim Pektin-Medium wurde im pH-Bereich 3.8-4.1 Esterase-Aktivität beim Stamm M37 3g festgestellt, keine hingegen bei M37 3d und M37.

Pektin-Lyase-Isoenzyme waren bei der verwendeten Färbemethode oft schwer zu identifizieren wegen des geringen Kontrastes mit der Gelfarbe. Mehrere Banden mit Pektin-Lyasen befanden sich im gleichen pH-Bereich wie diejenige mit Polygalacturonase-Aktivität. Zu beachten war ferner je eine bei pH 4.1 und pH 3.5 allen Stämmen gemeinsame Bande. Im Medium mit gewaschenen Apfelzellen konnte besonders bei K25 und dessen Mutanten aktiven Pektin-Lyasen festgestellt werden während M37 3d ein ähnliches Verhalten wie M37 und M37 3g zeigte.

3.4.2.1. Aktivitätsbestimmung der Polygalcturonasen mit Dinitrosalycilsäure

Die Anwendung von Dinitrosalycilsäure ermöglicht, die Aktivität der bei Pilzen oft vorhandenen Polygalacturonasen zu bestimmen. Die Bindung des Reagens mit den aus dem hydrolytischen Abbau entstandenen reduzierenden Zuckern, führt zu einem gefärbten Produkt, das bei einer Wellenlänge von 575 nm sein Absorptionsmaximum aufweist.

Als Substrat diente eine 1% Polygalcturonsäure Lösung in 0.1 M Na-Acetat Puffer mit pH 4.0, da diese Enzyme im pH-Bereich 4-5 am aktivsten sind. Die Inkubation der Enzymsubstratlösung fand bei 30°C statt. Zur Herstellung der Eichkurve wurde Galacturonsäure verwendet und als Kontrolle wurden Enzyme ohne Substrat sowie Polygalcturonsäure mit inaktivem Enzym verwendet. Die Inaktivierung erfolgte durch Erhitzen der Proteine bei 100°C während 3 Minuten. Durch Zugabe einer Verdünnungsreihe von Enzymen zu gleich bleibenden Substratmengen konnte die spezifische Aktivität jedes Stammes ausgerechnet werden. Aus der Absorption bei 575 nm konnte anhand der Eichkurve die Konzentration der reduzierenden Zucker in der Lösung bestimmt werden und daraus die spezifische Aktivität ermittelt werden d.h. es wurde errechnet wieviel mg Galacturonsäure 1 µg Protein nach 30 Minuten bei 30°C und pH 4.0 spaltet (Tab.17)

Bei allen geprüften Isolaten und Stämmen war die Menge freigesetzter reduzierenden Zucker direkt proportional zur Proteinkonzentration. Die Aktivität der Polygalacturonasen zeigte unterschiedliche Werte je nach Nährsubstrat; mit Ausnahme des Isolates S10 und seiner Mutante S10a war sie bei allen Kulturen im Medium mit Apfelzellen geringer. Die in der Tabelle 17 zusammengefassten Daten deuten darauf hin, dass die Aktivität der Polygalcturonasen nicht mit dem Verlauf der Fäulnisbildung auf den Äpfeln übereinstimmte. Es ergaben keine gesicherten Unterschiede zwischen den sensiblen, pathogenen Isolaten und den nicht pathogenen, resistenten Stämmen. Auf dem Apfelzellen-Medium konnten bezüglich Polygalacturonase-Aktivität nur zwischen den aktivsten Kulturen S10 und S10a und denjenigen mit der geringsten Aktivität (M37, M37 3d und M37 3g) Unterschiede festgestellt werden.

Tab. 17 : Durchschnittliche Aktivität der sensiblen Freilandisolate und den daraus spontan entstandenen laborresistenten Stämme.
Mittelwerte aus 6-10 Verdünnungsstufen mit je 2 Wiederholungen

Isolat	Stamm	Pektin-Medium		Medium mit Apfelzellen	
		Aktivität	95% Vertr. Interv.	Aktivität	95% Vertr. Interv.
S10		0.019	± 0.002	0.033	± 0.007
	S10a	0.026	± 0.008	0.033	± 0.008
K25		0.042	± 0.003	0.024	± 0.006
	K25 3c	0.088	± 0.022	0.020	± 0.004
	K25 3d	0.065	± 0.009	0.025	± 0.013
M37		0.052	± 0.006	0.014	± 0.008
	M37 3d	0.031	± 0.003	0.013	± 0.006
	M37 3g	0.034	± 0.007	0.015	± 0.005

Um die Kinetik der Enzyme zu untersuchen, wurden Enzym und Substrat konstant gehalten und die Zeit als variable betrachtet. 10 µg Proteine wurden mit 1% Polygalacturonsäure in Na-Acetat Puffer während den in Abbildungen 18-20 angegebenen Zeiten bei 30°C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte nach der von Miller (1959) modifizierten Methode nach Nelson (1944), zu jeder Zeit wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die in den Abbildungen 18-20 dargestellten Resultate zeigen eine lineare Korrelation zwischen Inkubationszeit und Freisetzung von reduzierenden Zuckern. Während der Versuchsdauer wurden weder eine Hemmung noch eine Sättigung der Enzyme festgestellt. Nur M37 zeigt eine höhere Enzym-Aktivität als die zugehörigen nicht pathogenen Stämme. Dieser Unterschied ist jedoch zu gering, um die grosse Differenz der Pathogenität in vivo zu erklären.

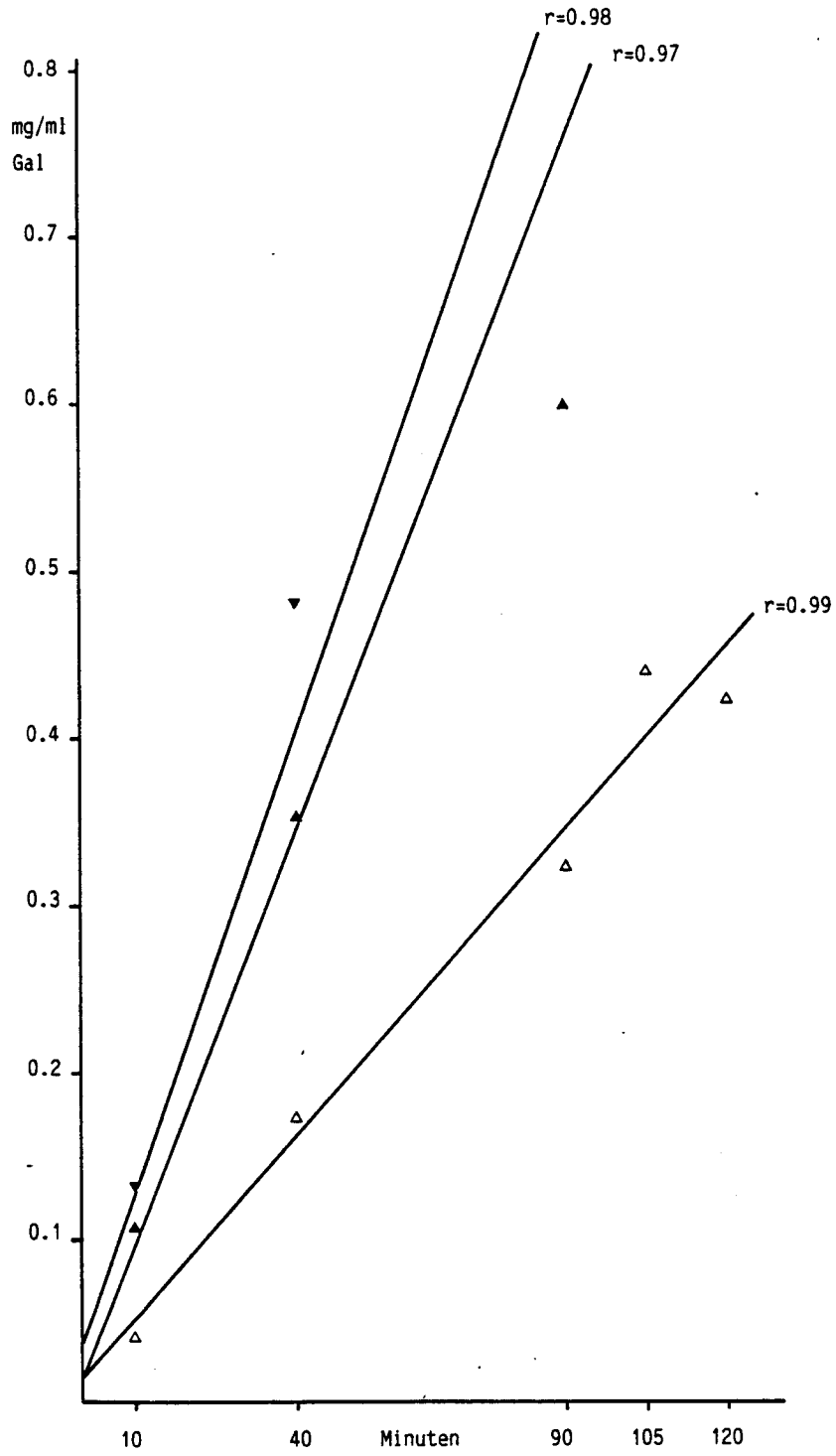


Abb. 18 : Korrelation zwischen der Konzentration freigesetzter Galacturonsäure und Inkubationszeit beim Isolat K25 und dessen resistenten Mutanten

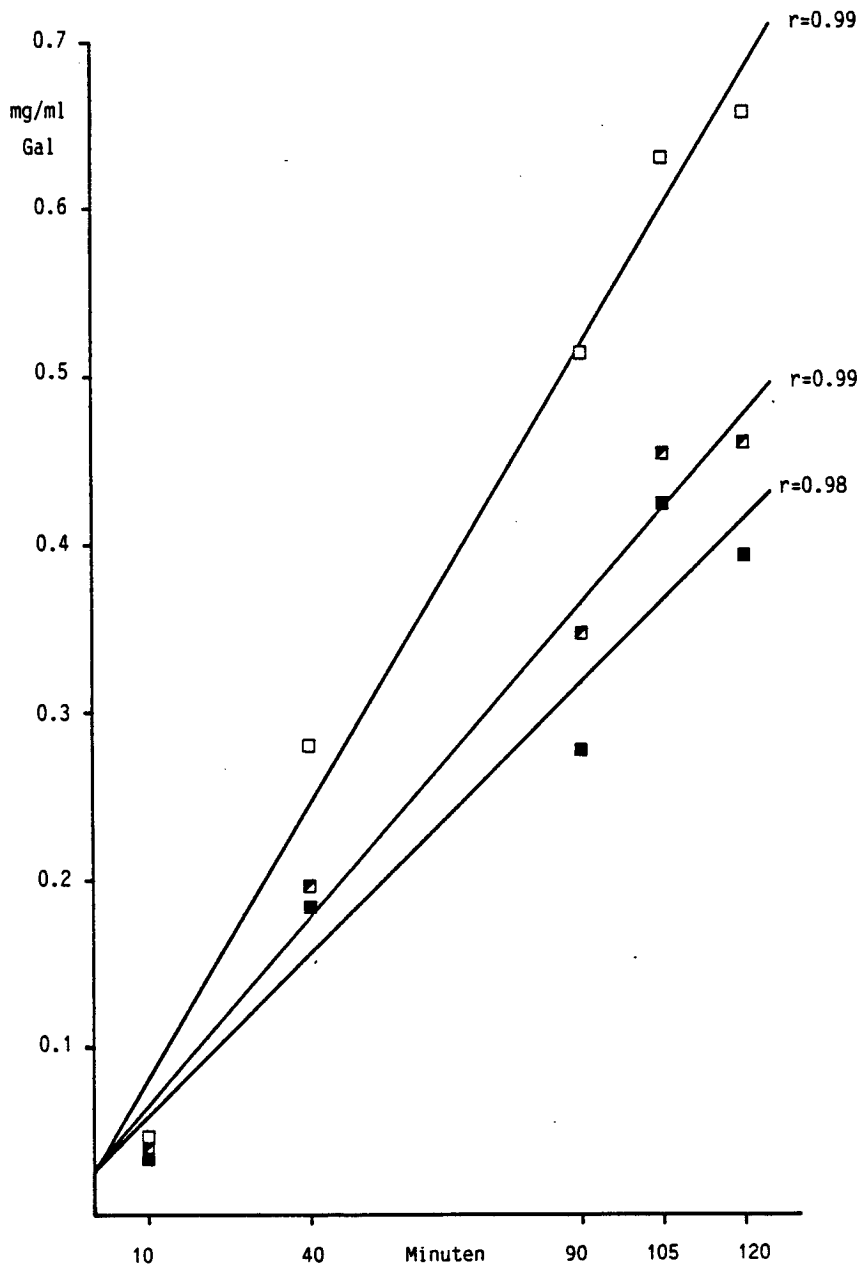


Abb. 19 : Korrelation zwischen der Konzentration freigesetzter Galacturonsäure und Inkubationszeit beim Isolat M37 und dessen resistenten Stämmen

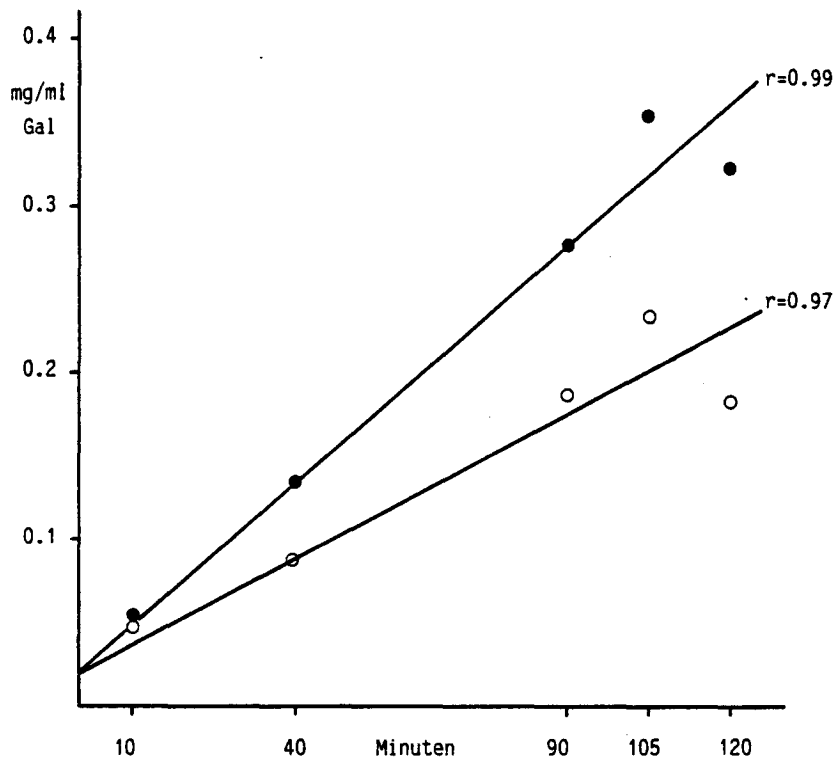


Abb. 20 : Korrelation zwischen der Konzentration freigesetzter Galacturonsäure und Inkubationszeit bei S10/S10a

3.4.2.2. Aktivitätsbestimmung der Polygalacturonasen mit Thiobarbitursäure

Ayers und Mitarbeiter (1966) modifizierten eine Methode zur Prüfung von Polygalacturonasen sowie Tanseliminase-Reaktionen. Für Polygalacturonase erfolgte der Abbau in leicht saurem pH-Bereich mit Polygalacturonsäure als Substrat. Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Reaktion gestoppt und die Aktivität durch die Messung der optischen Dichte bei 515 nm bestimmt. Als Referenz diente eine Probe mit erhitztem Enzym. Die Untersuchungen die sowohl mit Pektin als auch mit Apfelzellen als C-Quelle durchgeführt wurden sind in der Tabelle 18 zusammengefasst.

Es konnten beträchtliche Aktivitätsunterschiede in Abhängigkeit vom Medium festgestellt werden, wobei die Werte der Polygalacturonasen im Medium mit Apfelzellen niedriger waren als diejenigen im Pektin-Medium.

Tab. 18 : Polygalacturonase-Aktivität von Enzymextrakten verschiedener Kulturen auf 20 unterschiedlichen Nährsubstraten nach einer Stunde Inkubation. Die Werte sind als Galacturonsäure-Äquivalente (mg/ml) pro 100 µg Protein angegeben

Isolat	Stamm	Pektin-Medium	Medium mit Apfelzellen
S10		0.40	0.27
	S10a	0.57	0.29
K25		0.85	0.30
	K25 3c	1.78	0.25
	K25 3d	1.22	0.23
M37		1.34	0.17
	M37 3d	0.69	0.11
	M37 3g	1.08	0.24

Aus dem Nährsubstrat mit Pektin als C-Quelle konnten die Spaltprodukte der Polygalacturonsäure chromatografisch identifiziert werden. Der Auftrag auf Papier erfolgte nach 10, 15, 30, 45, 60 und 90 Minuten Inkubation. Wie Tabelle 19 zeigt, konnten keine Tri- und Tetramere als Untereinheiten der Na-Polygalacturonsäure festgestellt werden. Bei den aktivsten Stämmen und Isolaten traten Mono- und Digalacturonsäure am häufigsten auf. Wie auch aus den Bestimmungen mit anderen Methoden hervorgeht, besitzen die beiden Laborstämme des Isolates K25 erhebliche Polygalacturonase-Aktivitäten. Nur bei diesen wurde das Substrat schon nach 60 Minuten vollständig abgebaut. Bei M37 3d und M37 3g war ein Anteil der Polygalacturonsäure selbst nach 90 Minuten erhalten geblieben. Neben den, durch ihre R_f -Werte eindeutig bestimmbaren Komponenten, traten bei den Isolaten K25 3c, K25 3d, M37 und M37 3d auch schwer identifizierbare Untereinheiten auf, vor allem zu Beginn des Abbaues. Diese Stämme und Isolate produzierten vermutlich Endo- und Exo-Polygalacturonasen, die anderen fast ausschliesslich die Exo-Form. Die R_f -Werte der Mono- und Digalacturonsäure waren 0.46-0.56 bzw. 0.29-0.38.

Die Proteinmenge bei Isolat S10 und dem zugehörigen Stamm S10a mussten von 10 µg auf 15 µg erhöht werden da, wie aus den Tabellen 17 und 18

ersichtlich die geringsten Aktivitäten vorlagen. Aus den beiden Chromatogramme ging hervor dass es auch um eine Mischung von Endo- und Exopolygalcturonase handelt. Neben Galacturonsäure (schon nach 30 bzw. 15 Minuten nachweisbar) waren während dieser Abbauzzeit keine anderen Komponenten eindeutig ersichtlich. Diese Tatsache lässt auf zufällig verteilte Angriffstellen am Polymer schliessen

Tab. 19 : Zeitlicher Verlauf des Abbaues von Polygalacturonsäure durch pektolytischen Enzymen aus verschiedenen Botrytis cinerea-Isolaten und ihren resistenten Stämmen

<u>K25</u>	1	2	3	<u>K25 3c</u>	1	2	3	<u>K25 3d</u>	1	2	3
10	-	-	-		±	-	-		±	±	-
15	-	-	-		+	±	-		±	±	-
30	±	-	-		++	+	-		+	+	-
45	+	±	-		++	±	-		++	+	-
60	++	+	-		+++	-	-		+++	-	-
90	+++	+	-		+++	-	-		+++	-	-
<u>M37</u>	1	2	3	<u>M37 3d</u>	1	2	3	<u>M37 3g</u>	1	2	3
10	-	-	-		-	-	-		-	-	-
15	-	-	-		-	-	-		-	-	-
30	±	±	-		-	-	-		±	-	-
45	+	±	-		±	-	-		+	-	-
60	++	+	-		±	±	-		+	-	-
90	+++	-	-		+	+	-		++	-	-
<u>S10</u>	1	2	3	<u>S10a</u>	1	2	3				
10	-	-	-		-	-	-				
15	-	-	-		±	-	-				
30	±	-	-		+	±	-				
45	+	-	-		+	±	-				
60	++	-	-		++	+	-				
90	++	+	-		+++	+	-				

1 = Monomere, 2 = Dimere, 3 = Trimere;

- nicht nachweisbar, ± Spuren, + bis +++ relative Fleckengrösse auf 3 MM-Whatmann Papier

3.5. Das Fungizid Z 1

In Anbetracht des beachtlichen Anpassungsvermögen von Botrytis cinerea an veränderte Umweltbedingungen, sind Untersuchungen über ein allfälliges Auftreten von Resistenz gegenüber neu entwickelten Fungiziden von grosster Bedeutung. Die Wirksamkeit des Fungizides Z 1 (mit vorläufig noch nicht bekanntgegebenem Chemismus) auf Konidien und Myzel von Botrytis-Isolaten verhält sich ähnlich wie diejenige der Dicarboximide. Z 1 hat stärkeren Einfluss auf Konidien als auf Myzel: Konzentrationen höher als 0.1 µg/ml hemmen die Keimung von Dicarboximid sensiblen und resistenten Freilandisolaten. Auf 0.5 µg/ml zeigen 60% davon sehr geringe Keimungsraten (0.2 bis 1%). Der ED₅₀ beträgt für Myzelwachstum bei der Mehrheit der Isolate 1 µg/ml. Auf 5 µg/ml zeigt keines der geprüften Isolate normales Wachstum. Es besteht weder Kreuzresistenz zwischen Z 1 und den Dicarboximiden noch eine natürliche Resistenz gegenüber Z 1 bei Freilandisolaten. In ähnlicher Weise wie bei den Dicarboximiden treten auch bei Z 1 im Myzeltest laborresistente Stämme auf. Die in Tabelle 20 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass die laborresistenten Stämme vor allem auf subletalen Z 1-Konzentrationen und zwischen dem dritten und zehnten Inkubationstag entstehen. Als Inokulum für den Myzeltest dienen PDA-Rondelle, die aus dem Rand einer dreitägiger Kolonie ausgestochen werden.

Tab. 20 : Prozentualer Anteil spontan gebildeter gegenüber Z 1 resistenter Stämme aus je 10 Dicarboximid sensiblen und resistenten Isolaten, 4 Wiederholungen pro Fungizidkonzentration und Isolat

	1 µg/ml	10 µg/ml
Dicarboximid sensible Isolate	25 %	15 %
Dicarboximid resistente Isolate	37 %	10 %

3.5.1. Myzelwachstum und Konidienkeimung laborresistenter Stämme

Im Zusammenhang mit den in vitro gebildeten resistenten Stämme sollen Untersuchungen über Resistenzgrad, Pathogenität und Stabilität der Resistenz wichtige Hinweise für die Praxis geben. Zur Prüfung des Resistenzgrads wurden die Stämme nach einmaliger Passage über fungizidfreiem Medium auf höheren Z 1 Konzentrationen (1 bis 100 µg/ml) überimpft und während 16 Tagen beobachtet.

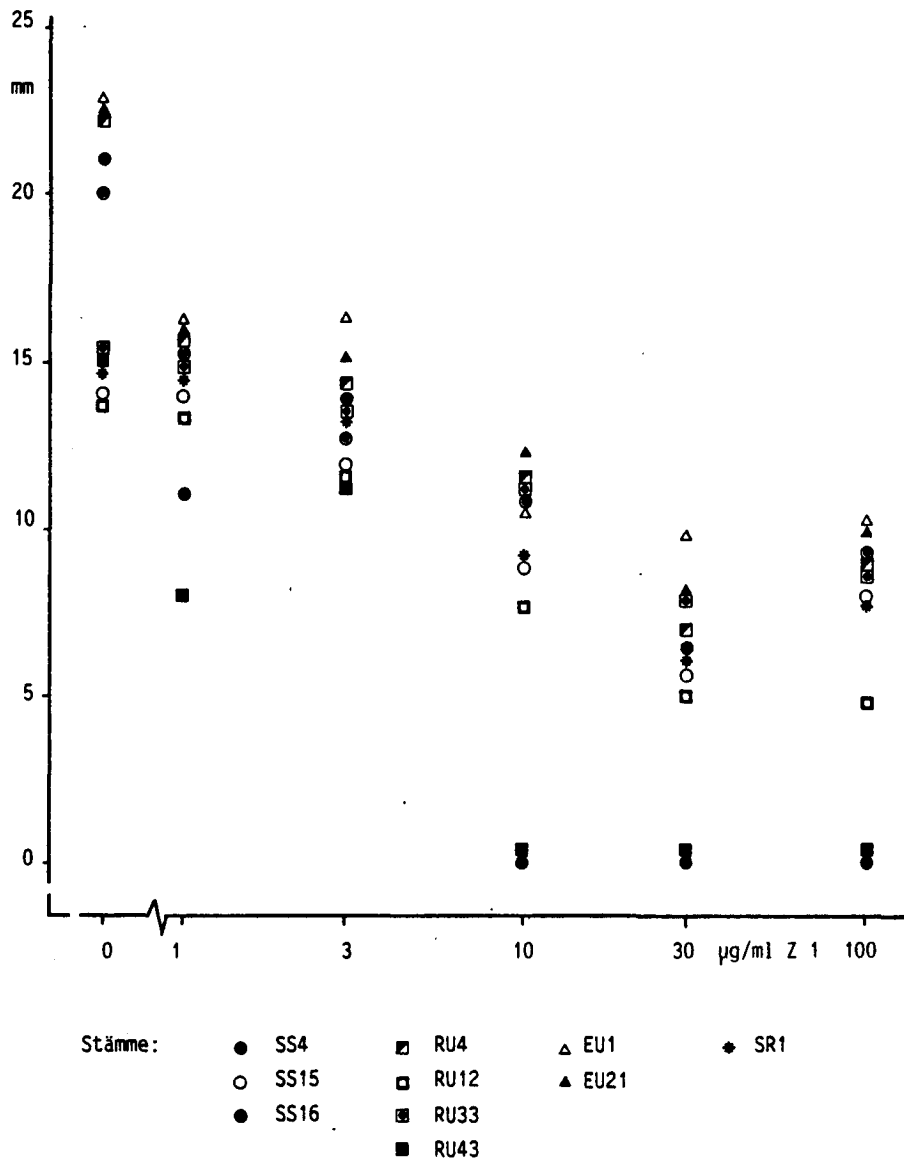


Abb. 21 : Durchschnittliche tägliche Zunahme des Koloniedurchmessers von 10 auf 1 µg/ml spontan aufgetretenen Stämmen bei verschiedenen Konzentrationen von Z 1, drei Wiederholungen pro Stamm und Konzentration

In dem in Abbildungen 21 und 22 dargestellten Versuch wurde das durchschnittliche tägliche Wachstum von 10 und 4 laborresistenten Stämmen mit einem Resistenzniveau von 1 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ Z 1 auf verschiedenen Konzentrationen untersucht.

Auch die schwach resistenten Stämme (1 $\mu\text{g/ml}$) konnten mit Ausnahme von SS4 und RU43 beachtliche Fungizidmengen ertragen. Auf den drei Konzentrationen von 10, 30 und 100 $\mu\text{g/ml}$ zeigten sich ähnliche, gegenüber den beiden niedrigen Konzentrationen von 1 und 3 $\mu\text{g/ml}$ nur leicht verlangsamte Wachstumsraten. Die leicht höheren Wachstumsraten bei 100 $\mu\text{g/ml}$ ist aufgrund der vorliegenden Untersuchungen nicht erklärbar.

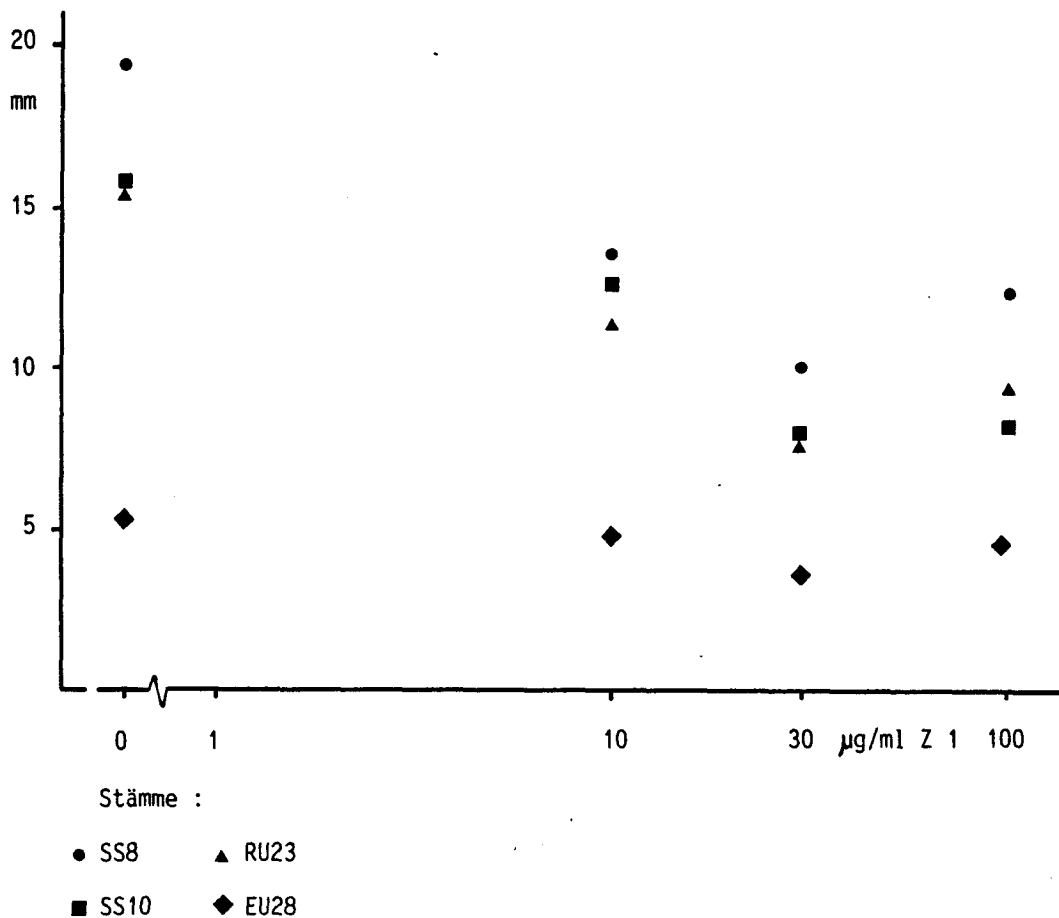


Abb. 22 : Durchschnittliche tägliche Zunahme des Koloniedurchmessers von 4 auf 10 $\mu\text{g/ml}$ spontan aufgetretenen Stämmen bei verschiedenen Konzentrationen von Z 1, drei Wiederholungen pro Stamm und Konzentration

Nachdem die laborresistenten Stämmen die ganze Schale überwachsen hatten, setzte die Konidienbildung ein. Keimtests wurden mit allen Stämmen auf den jeweils höchsten Fungizidkonzentrationen, auf denen noch Sporulation aufgetreten war, durchgeführt. Mit Ausnahme der Stämme RU4, RU43 und SS4 erfolgte die Konidienbildung auch auf den höchsten Konzentrationen. Die im Myzeltest bis 3 µg/ml gewachsenen Stämme SS4 und RU43 bildeten Konidien mit niedrigem Resistenzniveau von 3 µg/ml. Die Konidien der Stämme EU1, EU21 und RU4, die zwar im Myzeltest bis 100 µg/ml wachsen konnten, waren bereits auf Konzentrationen höher als 3 µg/ml zu einem hohen Prozentsatz gehemmt. Die Sporen der übrigen bis 100 µg/ml gewachsenen Stämme waren auch auf dieser Konzentration fast voll keimfähig. Im Gegensatz zu den Freilandisolaten besitzen die Konidien laborresistenter Stämmen einen, zwischen 2 und 1000 variierenden Resistenzfaktor.

3.5.2. Pathogenität der laborresistenten Stämme im Vergleich zu den sensiblen Ausgangsisolaten

Die Prüfung der Aggressivität der Stämme bzw. Isolate erfolgte aufgrund der Fäulnisbildung auf Äpfeln. Wie aus den in Abbildung 23 dargestellten Resultaten hervorgeht, verloren die Isolate in der Regel ihre Pathogenität mit zunehmender Resistenz fast vollständig. Bei den Stämmen EU1, EU21 und RU4, deren Konidien bei der oben beschriebenen Untersuchung ein Resistenzniveau von 3 µg/ml zeigten, konnte ähnlich hohe Pathogenität wie die entsprechenden Ausgangsisolate festgestellt werden.

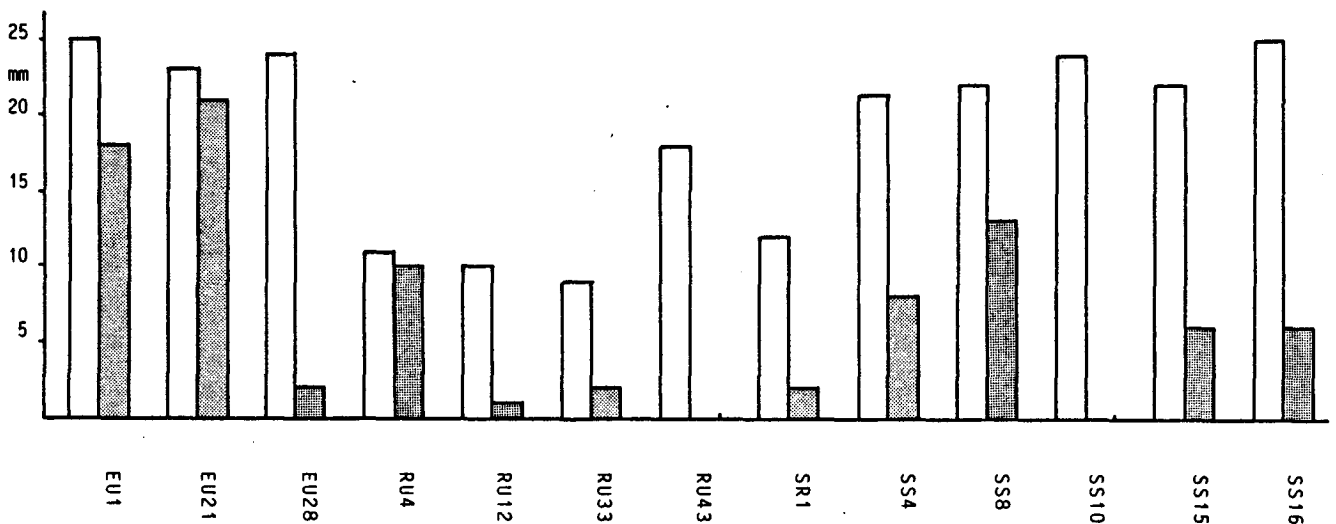


Abb. 23 : Text siehe folgende Seite

Abb. 23 : Durchmesser der Faulstellen bei Infektionsversuchen an Äpfeln mit resistenten Laborstämmen und den entsprechenden Ausgangsisolaten 5 Tagen nach der Inokulation, die Durchschnittswerte aus den drei Wiederholungen zeigen sehr geringe Abweichungen. Die laborresistenten Stämme sind als ausgefüllte Säulen dargestellt, die nicht ausgefüllten Säulen links davon geben die Werte der entsprechenden sensiblen Ausgangsisolate wieder

3.5.3. Stabilität der Resistenz

Untersuchungen über die Stabilität der Resistenz sind von besonderer Bedeutung, da eine nicht genetisch gebundene Adaptation durch einen Mangel an Stabilität gekennzeichnet ist. Die Konstanz des Resistenzverhaltens gegenüber Z 1 nach mehreren Generationen auf fungizidfreiem Nährsubstrat oder nach Rückisolation aus Fäulnisstellen beim Apfeltrost weisen auf im Erdgut festgelegte Eigenschaft hin.

Abbildung 24 zeigt, dass die Stämme ihre Resistenzniveau nach einer Besiedlung von Äpfeln unverändert beibehalten. Die in Abbildung 24 nicht erwähnten Stämme vermochten keine Fäulnis zu verursachen. Die tägliche Zunahme des Durchmessers der Kulturen auf 100 µg/ml schwankt zwischen 6.3 und 9.8 nur bei Stämmen mit Resistenzniveau von 1 µg/ml und zwischen 9.5 und 10 mm bei 10 µg/ml resistenten Stämmen. Gegenüber den Kontrollplatten sind beachtliche Unterschiede festzustellen.

Aus sensiblen Isolaten aus noch nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerefeldern hervorgegangene resistente Stämme wurden viermal auf fungizidfreiem Nährmedium in wöchentlichen Abständen überimpft und anschliesslich auf Myzelresistenz geprüft. Die in Tabelle 21 dargestellten Resultate deuten auf eine gewisse Stabilität der Resistenz hin, da nur geringe, nicht gesicherte Unterschiede im Myzelwachstum nach einer einmaligen bzw. nach viermaliger Passage auf fungizidfreiem Medium bei Stämmen beider Resistenzniveaus auftraten.

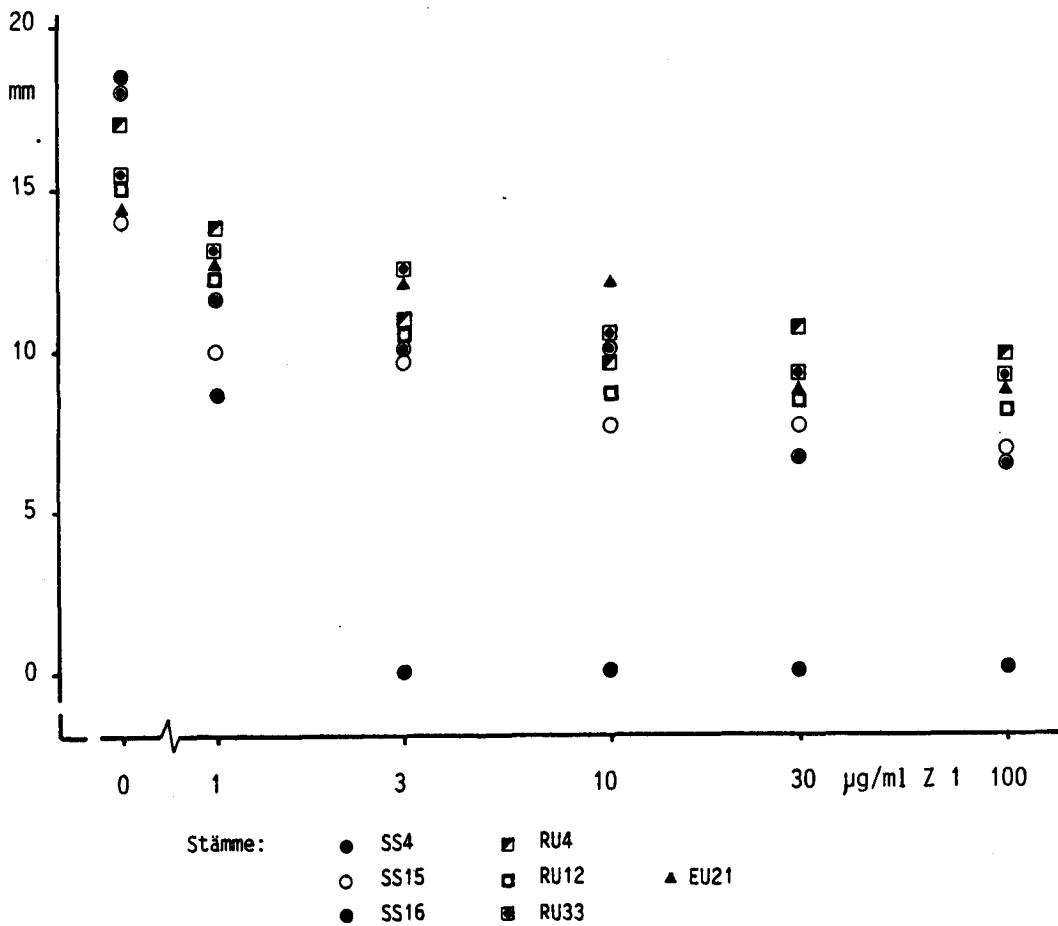


Abb. 24 : Durchschnittliche tägliche Zunahme des Koloniedurchmessers von aus faulen Äpfeln rückisolierten, resistenten Botrytis-Stämmen auf verschiedenen Z 1 Konzentrationen, 3 Wiederholungen pro Stamm und Konzentration

Tab. 21 : Durchschnittlicher Durchmesser in mm aus 23 Stämmen von Resistenzniveau 3 µg/ml und von 20 gegenüber 10 µg/ml Z 1 resistenten Botrytis-Stämmen auf höheren Konzentrationen nach 5 Tagen Inkubation, 3 Wiederholungen pro Stamm und Konzentration

Resistenzniveau der Stämme	10 µg/ml		100 µg/ml	
	a)	b)	a)	b)
3 µg/ml	48 ± 8	39 ± 8	38 ± 11	35 ± 11
10 µg/ml	-	-	38 ± 9	33 ± 14

a) nach einmaliger Passage auf fungizidfreiem PDA

b) nach vier Passagen auf fungizidfreiem PDA

3.6. Vergleich zwischen dem Resistenzverhalten gegenüber Dicarboximiden und gegenüber Z 1

3.6.1. Kreuzresistenz bei laborresistenten Stämmen

Wie im Abschnitt 3.5. dargelegt, wurde keine Kreuzresistenz zwischen den beiden Mitteln bei Freilandisolaten gefunden. Sowohl für Dicarboximid sensible wie für 3 µg/ml resistente Isolate lag der ED₅₀ im Myzeltest bei der Z 1-Konzentration von 1 µg/ml. Da aber bei beiden Fungizidgruppen in ähnlicher Weise hoch resistente Laborstämme auftraten, stellt sich die Frage nach Kreuzresistenz der beiden Fungiziden unter Laborbedingungen.

Die sowohl auf Dicarboximiden wie auf Z 1 aufgetretenen resistenten Laborstämme aus drei, noch nie mit Fungizid behandelten Erdbeerefeldern wurden auf höheren Konzentrationen (10 und 100 µg/ml) beider Fungizide geprüft. Der Myzeltest umfasste 15 gegenüber Dicarboximiden und 11 gegenüber Z 1 resistente Stämme, die auf fungizidfreiem Medium sehr gut wuchsen.

10 der Dicarboximid resistenten Stämme zeigten gutes Wachstum sowohl auf höheren Konzentrationen von Vinclozolin als auch von Z 1, die 5 übrigen Stämme entwickelten auf Z 1 kein Myzel; auf Vinclozolin hingegen zeichneten sich die 15 Stämme durch normales Wachstum aus.

Wie bereits Abbildung 21 zeigt, konnten zwei gegenüber 1 µg/ml Z 1 resistente Stämme nicht auf höheren Konzentrationen wachsen. Ebenso konnten sich von den 11 auf 3 µg/ml Z 1 spontan auftretenden in Tabelle 23 aufgeführten Stämmen 4 auf 10 µg/ml Z 1 und 5 auf 100 µg/ml Z 1 nicht oder nur gehemmt entwickeln. Die auf 10 und 100 µg/ml normal gewachsenen Stämme zeigten stark gesicherten Unterschiede (Kruskall-Wallis Test) im Durchmesser gegenüber den gleichen Stämmen auf fungizidfreiem Medium. Im Gegensatz dazu konnten von den 15 auf 3 µg/ml Vinclozolin aufgetretenen laborresistenten Stämmen sich auf 10 bzw. 100 µg/ml Vinclozolin alle mit je eine Ausnahme normal entwickeln und zudem zeigten sich bei der Wachstumsgeschwindigkeit keine Unterschiede im Kruskall-Wallis Test mit und ohne Fungizid. Sowohl bei Vinclozolin als auch bei Z 1 verhielten sich alle Stämme bei 10 und 100 µg/ml der beiden Wirkstoffe gleich.

Tab. 22 : Verhalten von 15 auf 3 µg/ml Vinclozolin spontan entstandenen Stämmen gegenüber höheren Konzentrationen von Vinclozolin und Z 1. Kolonidurchmesser ermittelt nach viertägiger Inkubation, 3 Wiederholungen pro Stamm und Fungizidkonzentration

Fungizidkonzentration	normal wachsende Stämme		gehemmt wachsende Stämme		nicht wachsende Stämme
	Anzahl	Durchmesser	Anzahl	Durchmesser	Anzahl
ohne Fungizid	15	50 ± 0			
10 µg/ml Vinclozolin	14	45 ± 6	1	17 ± 0.5	
100 µg/ml Vinclozolin	14	44 ± 7	1	17 ± 0	
10 µg/ml Z 1	10	39 ± 9			5
100 µg/ml Z 1	10	31 ± 7			5

Tab. 23 : Verhalten von 11 auf 3 µg/ml Z 1 spontan entstandenen Stämmen gegenüber höheren Konzentrationen von Z 1 und Vinclozolin. Kolonidurchmesser ermittelt nach viertägiger Inkubation, 3 Wiederholungen pro Stamm und Fungizidkonzentration

Fungizidkonzentration	normal wachsende Stämme		gehemmt wachsende Stämme		nicht wachsende Stämme
	Anzahl	Durchmesser	Anzahl	Durchmesser	Anzahl
ohne Fungizid	11	49 ± 3			
10 µg/ml Z 1	7	39 ± 4	1	9 ± 0	3
100 µg/ml Z 1	6	36 ± 6	1	12 ± 3	4
10 µg/ml Vinclozolin	8	48 ± 3			3
100 µg/ml Vinclozolin	8	45 ± 7			3

3.6.2. Auftreten von Laborresistenz bei Kombination von Vinclozolin und Z 1

Für die Praxis ist es von grosser Bedeutung zu wissen, ob eine Kombination von Dicarboximiden mit Z 1 die Resistenzbildung im Freiland verzögern oder verhindern kann.

Da bis jetzt keine Erfahrungen mit Z 1 im Freiland vorliegen, wurde seine Kombination mit Dicarboximiden vorerst im Labor geprüft. Isolate aus noch nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerefeldern verhielten sich bei der Prüfung der Resistenz gegenüber beiden Mitteln sensibel und auf der Konzentration von 3 µg/ml entwickelten sich spontan auftretende laborresistente Stämme. Bei dem in diesem Abschnitt beschriebene Experiment ging es um die Frage, ob die Bildung solcher resistenter Stämme bei gleichzeitiger Einwirkung beider Mittel (je mit einer Konzentration von 3 µg/ml) reduziert würde.

Der Myzeltest wurde mit 10 Isolaten nach der oben beschriebenen Methode durchgeführt. Die Anzahl Wiederholungen wurden pro Isolat und Variante von 3 auf 9 erhöht. Auf den Schalen mit einzeln zugegebenen Wirkstoffen entwickelten sich zahlreiche resistente Laborstämme vom 3. bis 19. Tag nach dem Ansatz. Die gesamte Anzahl der resistenten Stämme betrug 65 bei Z 1 und 59 bei Vinclozolin. Je nach Isolate war der Anteil resistenter Stämme sehr verschieden; innerhalb der 9 Wiederholungen konnten jedoch bei allen Isolaten, wenn auch oft nur vereinzelt resistente Stämme gefunden werden. Der in Abbildung 25 dargestellte Verlauf des Auftretens resistenter Stämme zeigt bei Z 1 ein Maximum zwischen dem 7. und dem 12. Tag, bei Vinclozolin jedoch erst gegen Ende dieser Zeitspanne bis zum 14. Tag. Alle Stämme zeigten normales Wachstum und die Kulturen erreichten nach 4 bis 5 Tagen den Petrischalenrand.

Auf der Kombination der beiden Wirkstoffe wurde Botrytis cinerea fast völlig unterdrückt; nur ein einzelner resistenter Stamm wurde am 14. Tag festgestellt. Ob die Verhinderung der Bildung laborresistenter Stämme durch die Kombination der beiden Fungiziden auch unter Freilandbedingungen von Bedeutung sein konnte, ist in weiteren Versuchen abzuklären.

Im Gegensatz zur Freilandresistenz, wo keine Kreuzresistenz festgestellt wurde (Kapitel 3.5.), sind sowohl gegenüber Vinclozolin als auch gegenüber Z 1 laborresistente Stämme in den meisten Fällen auch resistent gegenüber hohen Konzentrationen des jeweilig anderen Wirkstoffes.

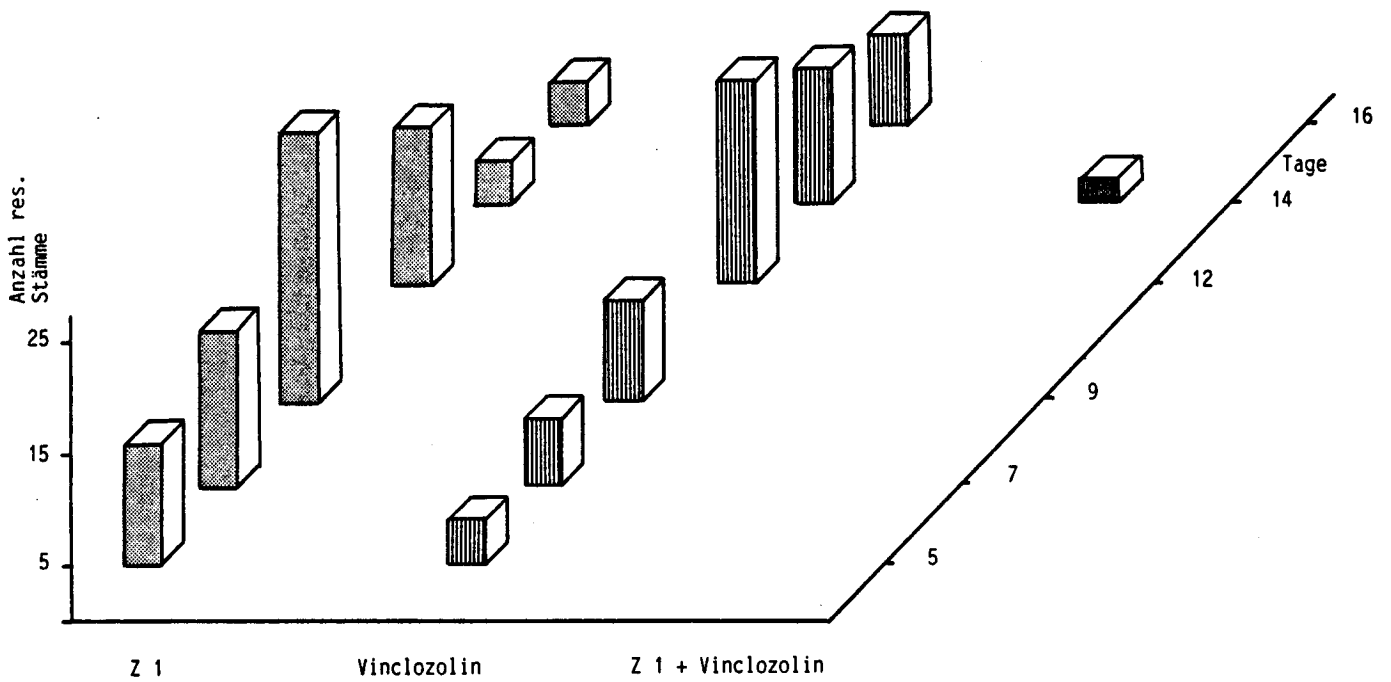


Abb. 25 : Zeitlicher Verlauf des Auftretens laborresistenter Stämme auf 3 µg/ml sowohl von Z 1 als auch von Vinclozolin allein sowie ihre Kombination in gleicher Konzentration am 5. bis 16. Tag nach Ansatz von 10 Botrytis cinerea Isolaten aus noch nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerefeldern

3.7. Vergleich zwischen Freiland- und Laborresistenz bei Dicarboximiden

3.7.1. Verträglichkeit erhöhter osmotischen Drucke

Im Abschnitt 3.4.1. wurde zusammen mit anderen Eigenschaften auch die Verträglichkeit erhöhter osmotischer Drucke als Unterscheidungsmerkmal einbezogen. Zusammenhänge zwischen Dicarboximid-Resistenz, verminderter Pathogenität, verringerter Verträglichkeit erhöhter osmotischer Drucke sind auch in der Literatur (Leroux und Gredt, 1982; Beever, 1983) aufgezeigt. Wie unter 3.1.1. bis 3.1.4. erwähnt übersteigt das Resistenzniveau von freilandresistenten Isolaten bei dem in dieser Arbeit verwendeten Myzeltest nie 3 µg/ml Vinclozolin. Bei den in den Jahren 1983 und 1984 für die vorliegenden Untersuchungen aus behandelten Rebbergen entnommenen freilandresistenten Isolaten war eine Konidienkeimung bis 100 µg/ml zu einem hohen Prozentsatz zu beobachten. Laborresistente Stämme zeichnen sich hingegen durch gleich hohe Resistenz sowohl bezüglich Myzelwachstum als auch bezüglich Sporenkeimung aus.

Für pathogene Organismen auf Früchte stellt die Verträglichkeit für hohe Zuckerkonzentrationen eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche Besiedlung des Wirtes dar, so muss das Myzel von Botrytis cinerea, um in die reifen Beeren eindringen zu können erhöhte osmotische Drucke auszuhalten. Bei den hochresistenten Laborstämmen und in einem etwas geringeren Ausmass auch bei freilandresistenten Isolaten lässt sich der Zusammenhang zwischen Zuckerverträglichkeit und Dicarboximid-Resistenz bestätigen (Abb. 26). Jede Kurve stellt das durchschnittliche Wachstum von 10 Botrytis-Isolaten auf zunehmendem Glucose Gehalt im Nährsubstrat dar. Auf Kontrolle d.h. 2% Malzagar, wurden keine gesicherten Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen festgestellt. Erst bei einer Konzentration von mehr als 3 % Glucose wird das Wachstum der resistenten Stämme signifikant gehemmt. Niedrige Glucose Mengen hatten bei 3 µg/ml freilandresistenten Isolaten im Gegensatz zu den resistenten Laborstämmen keine Wirkung. Wie bei den sensiblen Isolaten bewirkten Konzentrationen von 1 und 3 % sogar eine Wachstumssteigerung. Die sensible Isolate beider Herkünfte verhielten sich gleich und zeigten bis und mit 15% Glucose signifikant besseres Wachstum als auf Malzagar ohne Glucose.

Aufgrund dieser Eigenschaft wäre anzunehmen, dass freilandresistente Isolate eine verminderte Konkurrenzskraft bereits auf heranreifenden Trauben hätten.

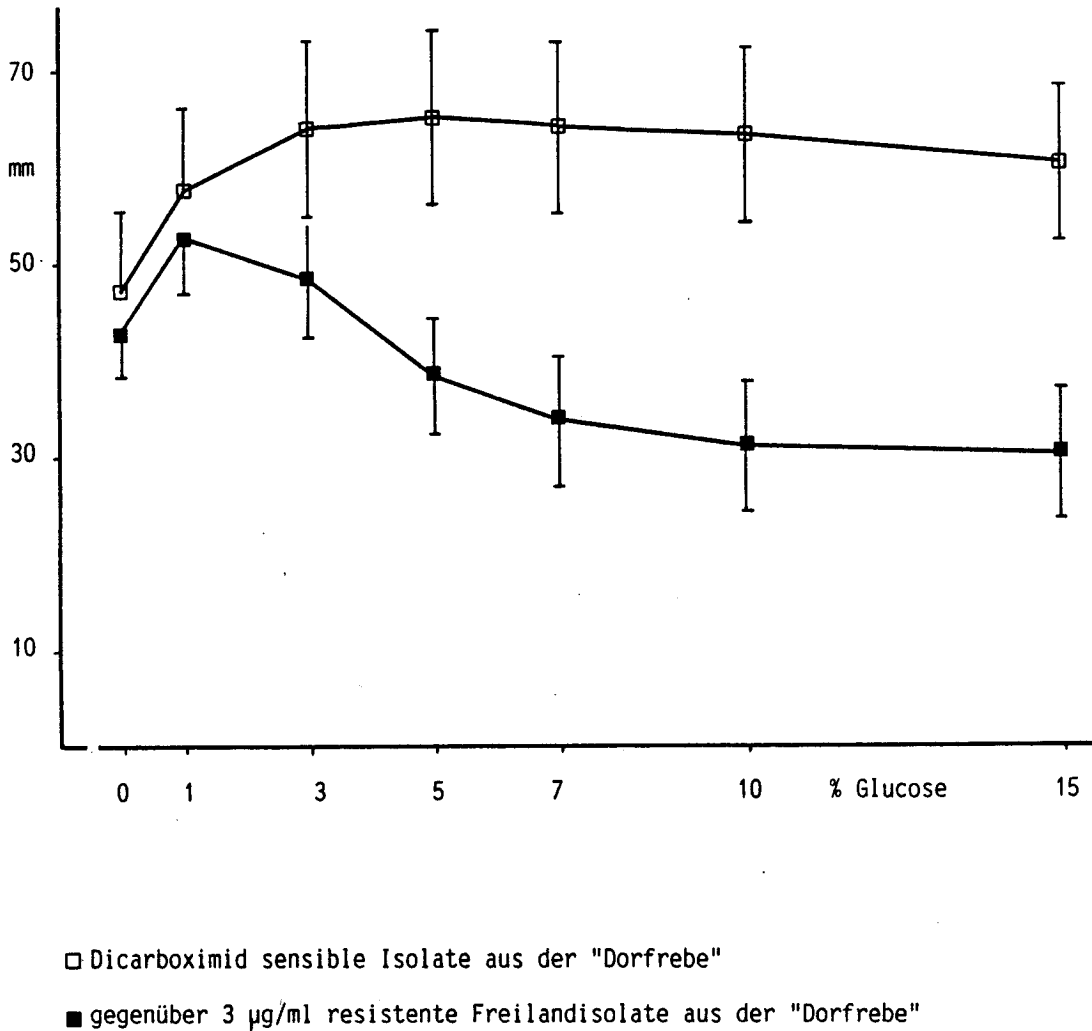
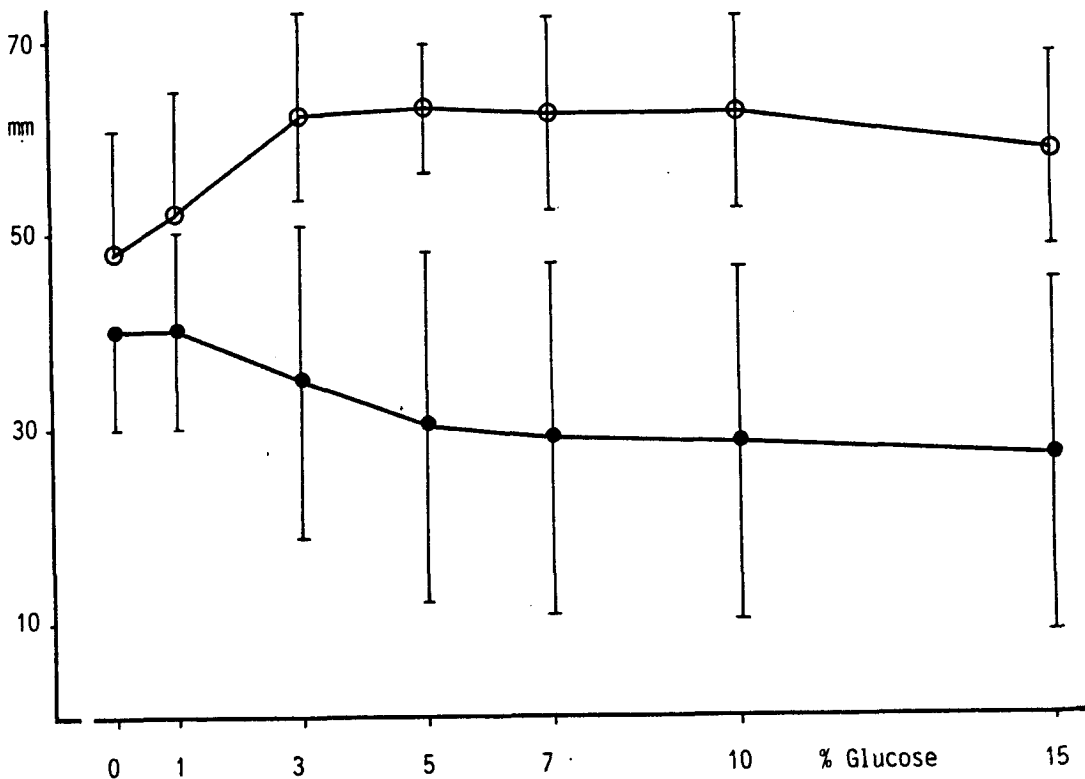


Abb. 26 : Mittlerer Durchmesser der Kulturen nach drei Tagen Inkubation von 10 gegenüber 3 µg/ml Vinclozolin resistenten Freilandisolate und von 10 sensiblen Isolate aus der "Dorfrebe", 3 Wiederholungen pro Stamm und Glucosekonzentration



- Dicarboximid sensible Isolate aus unbehandelten Erdbeeren
- gegenüber 100 µg/ml laborresistente Stämme ausgehend von Isolaten aus unbehandelten Erdbeerefeldern

Abb. 27 : Mittlerer Durchmesser der Kulturen nach drei Tagen Inkubation von 10 sensiblen Isolaten aus unbehandelten Erdbeerefeldern und von 10 daraus spontan hervorgegangenen, gegenüber 100 µg/ml Vinclozolin laborresistenten Stämmen, 3 Wiederholungen pro Stamm und Glucosekonzentration

Die Konidien der laborresistenten Stämmen unterschieden sich von denen der Freilandisolate in der Keimung, die ein gegenüber äusseren Einflüssen empfindlich reagierender Vorgang darstellt. Obwohl sie auf Malzagar das gleiche Resistenzniveau bezüglich Sporenkeimung aufwiesen, zeigten sie merkliche Unterschiede bei der Keimung auf höheren Zuckerkonzentrationen. Die Konidien der untersuchten Freilandisolate keimten bei allen geprüften Glucosekonzentrationen 100 %ig und zeigten auch ein gleiches Keimverhalten wie auf Malzagar.

Bei 6 der 10 laborresistenten Stämmen bewirkte 5% Glucose hingegen bereits eine eindeutig abnormale Anschwellung der Keimschläuche und auf höheren Konzentrationen traten bei diesen Stämmen auffällige morphologische Veränderungen beim Keimvorgang auf und zum Teil kam es zum Platzen der gekeimten Konidien. Die Keimungsrate zeigte einen steilen Abfall beim Konzentrationsanstieg von 5% auf 7% (Abb. 28).

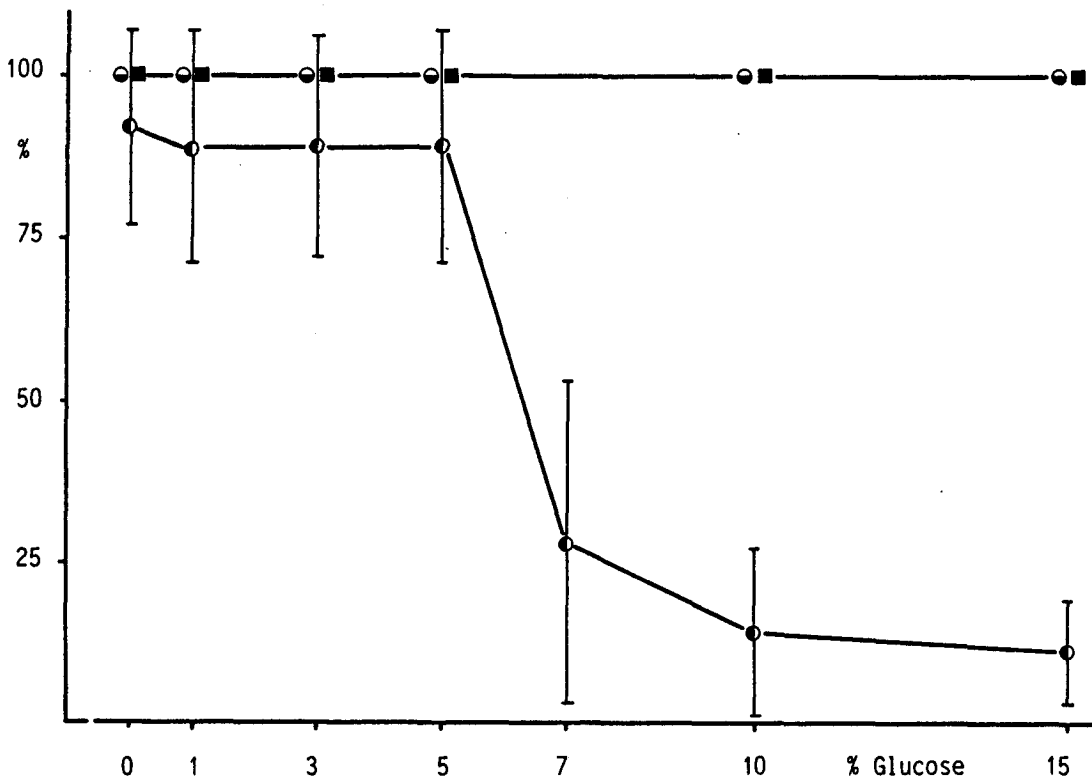
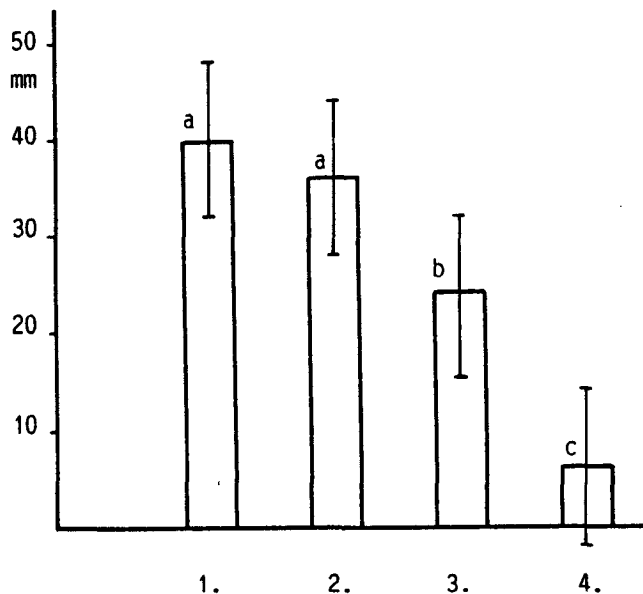


Abb. 28 : Keimungsrate von 10 freilandresistenten Isolaten (■), von den 4 der 10 gegenüber 100 µg/ml Vinclozolin laborresistenten gegenüber erhöhten Glucosekonzentrationen toleranten Stämmen (○) und von den 6 der laborresistenten, jedoch von der Glucosekonzentration stark abhängigen Stämmen (●) auf Malzagar mit verschiedenen Glucosekonzentrationen. Pro Isolat bzw. Stamm und Konzentration wurden 4x100 Konidien ausgezählt

3.7.2. Pathogenitätstest mit den beiden Resistenztypen

Für den Pathogenitätstest auf Äpfeln der Sorte Golden Delicious wurden von den 4 in den Abbildungen 26 und 27 erwähnten Gruppen je 5 Isolate bzw. Stämme verwendet; bei der Auswahl der Stämme wurde auf eine gleichmässige Verteilung innerhalb der Streuung bezüglich der Verträglichkeit erhöhter osmotischer Drucke geachtet. Die Infektion erfolgte durch die Applikation einer Malzagarrondelle mit 16 stündigem Myzel auf die verletzte Apfelschale. Nach 5 Tagen Inkubation zeigten die Früchte Faulstellen verschiedener Grösse, deren Durchmesser ermittelt wurde. Die sensible Isolate erwiesen sich als pathogener als die resistenten Freilandisolate bzw. Laborstämme. Die letzteren zeigten eine sehr geringe Infektionsfähigkeit. Nur ein laborresistenter Stamm war ebenso pathogen wie die freilandresistenten Isolate.



1. sensible Isolate aus der "Dorfrebe"
2. sensible Isolate aus einem unbehandelten Erdbeerfeld
3. freilandresistente Isolate aus der "Dorfrebe"
4. aus sensiblen Isolaten eines unbehandelten Erdbeerfeldes hervorgegangene laborresistente Stämme

Abb. 29 : Durchmesser der Faulstellen von je 5 Isolaten bzw. Stämmen auf Golden Delicious nach 5 Tagen Inkubation, Mittelwerte aus drei Wiederholungen pro Isolat bzw. Stamm, unterschiedliche Buchstaben bezeichnen die signifikanten Unterschiede in Duncan Test ($p=0.01$)

Die Resistenz gegenüber Dicarboximiden ist nach den in diesem Abschnitt dargelegten Resultaten sowohl mit einer verminderter Verträglichkeit erhöhter osmotischer Drucke als auch mit einer geringeren Infektionstüchtigkeit korreliert. Zwar zeigte sich sowohl bei Freilandisolaten als auch bei laborresistenten Stämmen eine verminderte Pathogenität, die jedoch bei den hochresistenten Laborstämmen besonders stark in Erscheinung trat.

4. DISKUSSION

4.1. Resistenz bei Dicarboximid-Fungiziden

4.1.1. Quantitative und qualitative Resistenz im Freiland

Die zur Bekämpfung von Botrytis cinerea eingesetzten Dicarboximide greifen im Gegensatz zu den sogenannten "multiside inhibitors" im pilzlichen Metabolismus an einer spezifischen Stelle ein. Sie sind ausschliesslich gegenüber Botrytis und Vertreter nahe verwandter Gattungen wirksam. Es besteht somit eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass gewisse Pilzstämme diese vom Fungizid bedingte, spezifische Blockierung des Stoffwechsels zu umgehen vermögen.

Forschungsgruppen aus allen Weinbaugebieten Europas haben sich seit bald 10 Jahren mit dem "Monitoring", der Ueberwachung einer allfälligen Resistenzbildung von Botrytis cinerea gegenüber Dicarboximiden, beschäftigt. 1978 wurden in Deutschland an der Mosel (Holz, 1979) und in der Pfalz (Lorenz und Eichhorn, 1980) erstmals gegen Dicarboximide resistente Isolate im Freiland gefunden. Auch in Frankreich, vor allem in der Champagne und im Elsass, wo die Dicarboximide von Anfang an in zahlreichen Spritzungen eingesetzt wurden, traten seit 1978 resistente Freilandisolate auf (Leroux et. al., 1982). Erst ein Jahr später wurde Freilandresistenz auch in Rebbergen der Ostschweiz festgestellt (Schüepp et. al., 1982). In Gebieten mit warmem Klima traten auch Schwierigkeiten bei der Bekämpfung der Graufäule auf Gemüse und Zierpflanzen im Gewächshaus infolge von Resistenzbildung auf (Katan, 1982). Die Interpretation und der Vergleich der Resultate über Resistenzuntersuchungen bei Botrytis cinerea bezüglich Dicarboximiden erwies sich manchmal schwierig wegen der unterschiedlichen Isolations- und Testmethoden.

Lorenz und Eichhorn (1980) prüften Konidien von Freilandisolaten aus behandelten Parzellen und stellten fest, dass sich einzelne auf höheren Dicarboximid-Konzentrationen (500 µg/ml) entwickeln konnten. In einem Myzeltest unterschieden sie bei den sich aus den Konidien bildeten Kulturen drei Resistenzgrade. Auch Hill und Schlamp (1980) berichteten über das Vorkommen von hoch resistenten Konidien (500 µg/ml) in behandelten Rebanlagen. Die Konidien wurden in Rebbergen direkt aus der Luft in fungizidhaltigem Medium gefangen. Die von Holz (1979) und Dieter (1983)

verwendete Methode der Schalendiffusion (Gärtel, 1967) beruht ebenfalls auf die Konidienkeimung. Das Fungizid wird aber nicht dem Nährmedium beigemischt, sondern ist in Filterpapier Rondellen enthalten, welche auf der Medium-Oberfläche verteilt sind.

In dieser Arbeit wurde in erster Linie die Resistenz des Myzels bei Freilandisolaten verschiedener Herkünfte untersucht. Zusätzlich wurde aber auch die Wirkung des Fungizides auf die Konidienkeimung bei Isolaten aus resistenten Populationen und aus noch nie mit Fungiziden behandelten Parzellen mit sensiblen Botrytis cinerea-Populationen.

Die resistenten Freilandisolate zeigen ein niedrigeres Resistenzniveau im Myzel. Der ED_{50} lag bei 3 $\mu\text{g/ml}$, d.h. 10 bis 30 mal höher als bei den sensiblen Isolaten. In den für die Untersuchungen ausgewählten Parzellen wurden seit 1974 Dicarboximide verwendet und das im Myzeltest festgestellte Resistenzniveau stabilisierte sich seit 1981 auf 3 $\mu\text{g/ml}$ Vinclozolin.

Auch Leroux und Gredt (1982) bestätigten die Verbreitung von Isolaten von niedrigem bis mittlerem Resistenzniveau (1.5 bis 3 $\mu\text{g/ml}$) im Freiland.

Schüepp und Mitarbeiter (1982) berichteten über die Uebereinstimmung der Myzel- und Konidienresistenz bei sensiblen sowie bei 1 und 3 $\mu\text{g/ml}$ resistenten Freilandisolaten. Bei Untersuchungen in den Jahren 1983 und 1984 wurde aber eine erhöhte Resistenz der Konidien der im Myzeltest bloss für 3 $\mu\text{g/ml}$ resistenten Isolate festgestellt.

Leroux und Mitarbeiter (1977) sowie Pappas und Fisher (1979) berichteten über eine bessere Wirkung des Fungizides auf die Myzelzellen als auf die Konidien. Die Unterschiede waren aber bedeutend geringer als die von uns im Rahmen dieser Arbeit festgestellte Differenz zwischen Myzelwachstum und Sporenkeimung. Da diese Unterschiede bei den sensiblen Freilandisolaten nicht auftraten, ist anzunehmen, dass es sich tatsächlich um eine Resistenzerhöhung bei den Konidien der gegenüber 3 $\mu\text{g/ml}$ Vinclozolin resistenten Freilandisolate handelt. Auch Panayotakou und Malathrakis (1983) konnten beim Vergleich von Myzel- und Konidienresistenz von Isolaten aus Gewächshauskulturen bei niedriger Myzelresistenz eine erhöhte Konidienresistenz feststellen.

Die Botrytis-Populationen unterschiedlichen Resistenzgrades zeigten eine relativ geringe Durchmischung innerhalb desselben Rebbergs in behandelten bzw. unbehandelten Parzellen (Abb. 7 und 8). Einerseits verhinderte der vom Fungizid ausgeübte selektive Druck in den behandelten Reihen die Durchmischung der Populationen weitgehend und andererseits vermochte die resistente Population vermutlich wegen der verminderten Konkurrenzkraft

die unbehandelten Flächen nicht leicht zu besiedeln. Die rasche prozentuale Rückgang der resistenten Isolate nach einem Unterbruch der Dicarboximid-Behandlung deutet auf verminderte Aggressivität und Fitness der resistenten Population hin. Ein sehr geringer Anteil resistenter Isolate blieb jedoch auch nach zwei Jahren ohne Fungizideinsatz erhalten, was als eine der Ursachen für den raschen Anstieg resistenter Isolate nach erneuten Fungizidbehandlungen anzusehen ist. Diese in Abwesenheit des Fungizides selektierten Isolate waren bezüglich der gesamten resistenten Population bezüglich Fitness und Konkurrenzkraft den sensiblen sehr ähnlich.

Das Monitoring bezüglich Resistenzbildung gegenüber den Dicarboximiden in den Jahren 1976-1980 (Schüepp et. al., 1982) in der Ostschweiz zeigte einen langsamen Anstieg resistenter Stämme. Der rasche Wiederaufbau einer resistenten Population nach der Resensibilisierung bei erneutem Fungizideinsatz ist wohl auf eine genetische Veränderung der resensibilisierten Stämme zurückzuführen. Es ist daher nicht mit einer erneuten Wirkung der Präparate nach einem Behandlungsunterbruch von wenigen Jahren zu rechnen.

Die durchgeführten Untersuchungen mit sensiblen Isolaten aus noch nie mit Fungiziden behandelten Parzellen (Kapitel 3.1.5.) deuteten auf das Vorkommen resistenter Konidien in der Natur hin. Die Entwicklung dieser Sporen auf fungizidhaltigem Agar zu normal wachsenden Kulturen konnte von Anfang an derjenigen der Konidien auf Kontrollschalen gleichgesetzt werden.

Eine Adaptation ist daher mit grosser Wahrscheinlichkeit auszuschliessen. Ähnliche Befunde wurden auch bei anderen Pilzen und Wirkstoffen gemacht; so konnten Bosshard und Schüepp (1983) aus unbehandelten Parzellen ein, gegenüber Matalaxyl resistentes Isolat von Plasmopara viticola isolieren und Bolton (1976) fand natürliche Resistenz bei Botrytis cinerea bezüglich Benomyl, Thiophanatmethyl und Dicloran. Nach Delp (1980) beträgt die Frequenz der spontan mutierten Resistenzgene bei phytopathogenen Pilzen ca. $1.5 \cdot 10^8$, d.h. eine von 150 Millionen Sporen ist Träger von R-Genen. Resistenzmutanten können somit schon vor dem praktischen Einsatz eines neuentwickelten Fungizids in einer Pilzpopulation vorhanden sein. In der vorliegenden Arbeit war die Häufigkeit resistenter Sporen höher, jedoch bei niedrigen Fungizidkonzentrationen (3 und 10 µg/ml). Davis und Dennis (1981) fanden auf 50 µg/ml resistente Konidien von Botrytis cinerea ausgegangen von sensiblen Isolaten und konnten ähnliche Verhältnisse feststellen. Die verwendete hohe Dosis des Fungizids im Nährmedium (500 µg/ml)

verhinderte vermutlich die Entwicklung resistenter Konidien aus unbehandelten Parzellen bei den ersten Untersuchungen im Anbaugebiet Rheinhessen (Hill und Schlamp, 1980; Lorenz und Eichhorn, 1978).

Konidien, aus welchen sich nur punktförmig gehemmte Kulturen entwickelten, konnten nicht als resistent bezeichnet werden: das minimale Wachstum deutete auf einen Verbrauch der in der Konidie enthaltenen Reservestoffe hin.

4.1.2. Das Auftreten von Resistenz in vitro: die sogenannte Laborresistenz

Eine auffällige Erscheinung bei Resistenzuntersuchungen von Botrytis cinerea bezüglich Dicarboximiden war die Fähigkeit des Pilzes, im Labor Stämme zu bilden, die höhere Fungizidkonzentrationen zu ertragen vermochten.

Schüepp und Küng (1978) und Gullino und Garibaldi (1979) publizierten über die Bildung von resistenten Stämmen aus Myzel in vitro schon vor dem Auftreten von Resistenz im Freiland. Die im Kapitel 3.3.1. angegebenen Resultate zeigen, dass die Konzentration des Fungizides nicht ausschlaggebend für das Auftreten resistenter Stämme ist. Diese Erscheinung unterscheidet sich also von einer langsamen Anpassung an zunehmende Mengen des Wirkstoffes.

Morphologisch traten sowohl sektorielles als auch regelmässiges Wachstum um die Malzagarrondelle auf. Sektoren waren am häufigsten zu treffen bei vorerst stark gehemmtem Myzelwachstum; als ob die dicht gedrängten abnormal verzweigten Hyphen ein physikalisches Hindernis für die Entwicklung des resistenten Myzels darstellte. Die Fähigkeit zur Resistenzbildung in vitro, d.h. die Häufigkeit des Auftretens resistenter Stämme erwies sich als unabhängig vom Ursprung der Isolate. Im Gegensatz zu Gullino und Garibaldi (1979) konnte keine Korrelation mit der Anzahl der Dicarboximid-Behandlungen festgestellt werden. Auch bei Isolaten aus unbehandelten Parzellen konnte sich im Labor eine beträchtliche Anzahl resistenter Wiederholungen entwickeln. Die früh auftretenden resistenten Stämmen wuchsen meist normal und fruktifizierten auch teilweise. Es waren jedoch für die Bildung resistenter Stämme mehrere Tagen erforderlich (vergleiche auch Hisada und Mitarbeiter, 1979; Gualco und Mitarbeiter, 1983).

Die Sensibilität der Konidien gegenüber Fungiziden wird an die sich entwickelten Hyphen übertragen. Gewisse Hyphenzellen werden jedoch später in

der Lage sein, höhere Fungizidkonzentrationen zu ertragen und ein resistentes Myzel zu erzeugen. Der grundlegende genetische Mechanismus der Umwandlung zur Resistenz bleibt noch unklar. Vermutlich sind mehrere Faktoren an dieser Erscheinung im Zusammenspiel von Mutationen und Heterokaryose beteiligt. Bezüglich Heterokaryose wird durch Kernaustausch und Kernwanderung ein Zustand erreicht, wo die Mehrheit der Kerne einer Zelle resistente Gene tragen, sodass die Zelle als Ganzes resistent ist. Die Verzögerung beim Auftreten der resistenten Hyphen würde den Zeitabschnitt entsprechen, in welchen diese Veränderungen vollzogen werden. Die Problematik der Entstehung von, in vitro resistenten Stämmen, wurde in der Literatur bisher kaum besprochen.

Bei dem im Kapitel 3.3.1.1. angegebenen Experiment wurde erläutert, dass auch nach sechs Generationen bei Einsporlinien die Fähigkeit zur Bildung resistenter Stämme beibehalten wird, sie nimmt aber nicht zu.

Die Konidien ausgehend von einem sensiblen Isolat bleiben also über sechs Generationen von Einspokulturen vorwiegend sensibel, jedoch imstande, Laborresistenz zu erzeugen. Nur eine gegenüber 3 µg/ml resistente Konidie konnte selektiert werden; bei ihrer Reproduktion blieb die Resistenz stabil, d.h. keine der Wiederholungen zeigte eine Hemmung auf Fungizidmedium. Die von Lauber (1971) beschriebene Heterokaryose konnte bezüglich dieser Eigenschaft nicht bestätigt werden. Beaver und Byrde (1982) nahmen an, dass Resistenz bezüglich Dicarboximiden, chromosomal gebunden sei. Dies trifft vermutlich auch bezüglich der Laborresistenz zu, da diese durch Passage auf natürlichen Substraten wie z.B. Äpfeln (Schüepp und Küng, 1978) oder durch vermehrte Übertragungen auf fungizidfreiem Medium in ihrem Niveau unverändert bleibt. Das Zustandekommen der Laborresistenz benötigt als Voraussetzung Myzelzellen, deren Heterokaryon keine oder eine nicht überwiegende Anzahl Resistenzgene trägt. Die Resistenz kommt erst zustande, nachdem die Myzelzelle für eine gewisse Zeit im Kontakt mit dem Fungizid gewesen ist.

Die Anzahl der gebildeten resistenten Laborstämme auf 3 und 10 µg/ml Vinclozolin-Malazar nimmt mit steigender Konzentration der Konidien (Abb.11) zu. Es ist anzunehmen, dass nur unter einer grossen Anzahl von Sporen Kernkombinationen auftreten, bei welchen resistente Gene zum Durchbruch kommen. Das häufige Auftreten von 1 µg/ml resistenten Stämmen beim Isolat Col A7 ist aufgrund dieses Experimentes nicht erklärbar.

4.1.3. Eigenschaften laborresistenter Stämme

Untersuchungen über Fitness und Konkurrenzkraft sowie des Resistenzniveaus der resistenten Stämme im Vergleich zu den sensiblen Isolaten können wertvolle Hinweise geben auch wenn Resultate aus Laboruntersuchungen nur bedingt auf Freilandverhältnisse übertragbar sind (Dekker, 1976).

In Tabelle 13 wurde dargestellt, dass das Wachstum auf höheren Fungizidkonzentrationen (10-300 µg/ml) von der Konzentration abhängig ist, auf der sich der resistente Stamm entwickelt hat. Auf 10 µg/ml entstandene resistente Stämme wuchsen normal bis auf 300 µg/ml, 21% der auf 3 µg/ml und 47% der auf 1 µg/ml entstandenen Stämme konnten höhere Konzentrationen nicht ertragen oder waren lediglich imstande sektorielles Wachstum aus dem gehemmten Myzel zu bilden. Diese Eigenschaft ist auf sensible Isolate beschränkt und ist es anzunehmen, dass das Niveau 3 µg/ml nicht immer genügt, um auch Resistenz gegenüber höheren Konzentrationen zu bewirken. Diese Ergebnisse zeigen eine Möglichkeit, Stämme niedrigen Resistenzgrades (1µg/ml) von solchen höherer Resistenzgrade (3 und 10 µg/ml) zu trennen um vergleichende Experimente durchzuführen.

Gullino und Garibaldi (1979) stellten fest, dass sich auf "100 ppm" entwickelnde Stämme teilweise in der Lage waren, Konzentrationen bis "6400 ppm" zu ertragen. Davis und Dennis (1981) publizierten auch über sehr hohen Vinclozolin-Konzentrationen (500 µg/ml) die das Wachstum laborresistenter Stämmen sogar begünstigten. Nothover (1983) stellte keinen Einfluss der ursprünglich bei der Entstehung resistenter Stämmen wirkenden Konzentrationen fest, wenn diese auf 10 und 100 µg/ml Iprodione (in PDA-Nährboden) kultiviert wurden.

In dieser Arbeit wurden resistente Laborstämme aus sensiblen Isolaten verschiedener Herkünften untersucht. Der Einfluss des Ursprunges der untersuchten Isolate lässt sich nicht eindeutig festhalten, da die Unterschiede zwischen Mutanten von Isolaten aus mit Dicarboximiden behandelten und unbehandelten Parzellen nur die Sporenkeimung und nicht das Myzelwachstum betreffen. Bei einzelnen Herkünften zeigen die auf fungizidfreiem Medium gebildeten Konidien resistenter Stämmen eine Tendenz zur verminderten Resistenz (Abb. 12).

4.1.4. Die Behandlung der Konidien mit mutagener Substanz

Es liegen nur wenige Untersuchungen über die Anwendung von mutagenen Agentien zur Erzeugung von auf Dicarboximiden resistenten Konidien. Leroux und Mitarbeiter (1977) konnten durch ultraviolette Bestrahlung die Frequenz des Auftretens resistenter Konidien auf 30 µg/ml Vinclozolin erhöhen. Die Behandlung der Konidien sensibler Isolate mit N-Methyl N'Nitro-N-Nirosoguanidin bewirkte eine massive Erhöhung der Anzahl resistenter Wiederholungen bei dem auf 3 µg/ml angesetzten Myzel. Das vermehrte Auftreten laborresistenter Stämmen gibt Hinweise für die Bedeutung von Mutationen bei der Resistenzbildung.

Mutagene Agentien konnten jedoch nicht gleichzeitig auch Resistenz auf 10 µg/ml Vinclozolin erzeugen. Da genaue Kenntnisse über den Wirkungsmechanismus dieser Gruppe von Fungiziden noch fehlen, stellen auch die Mechanismen der Resistenz bis jetzt ungelöste Probleme dar. Beaver und Byrde (1982) behaupteten dass, bei der Resistenzbildung von Neurospora crassa bezüglich Dicarboximiden mehr als ein chromosomales Gen beteiligt sei. Ihre Aussage stützen sich auf die Tatsache, dass Mutanten bezüglich der Toleranz gegenüber erhöhten osmotischen Druck von Neurospora crassa bezüglich Dicarboximide resistent waren. Es ist bekannt, dass 6 Gene die Eigenschaft bezüglich Osmose bei N. crassa kontrollieren; deshalb könnten die unterschiedlichen Resistenzniveaus bei diesem Pilz im Zusammenhang mit der Anzahl mutierter Loci stehen.

Mit mutagener Substanz behandelte Stämme von 3 µg/ml freilandresistenten Isolaten zeigte sich eine Zunahme des Myzelwachstums auf 10 und 100 µg/ml. Die auf 10 µg/ml Fungizid entstandenen Kolonien können auch höhere Konzentrationen ertragen. N-Methyl N'Nitro-N-Nitrosoguanidin ermöglicht durch Destabilisierung des genetischen Materials und hervorgerufene Punktmutationen erhöhte Resistenz bezüglich Myzelwachstum. Diese Erscheinung wurde ohne Einsatz mutagener Substanz bei den vorliegenden Experimenten nie beobachtet, Die 3 µg/ml resistenten Freilandisolaten bleiben in vitro auf ihr Resistenzniveau festgelegt und konnten keine laborresistenten Stämme erzeugen.

Versuch mit derselben Substanz zur Bildung von in vitro resistenten Stämmen bezüglich Benzimidazolen blieben erfolglos.

Nach der mutagenen Behandlung der Konidien wurden diese entweder direkt auf fungizidhaltiges Nährmedium gebracht oder vorerst auf fungizidfreiem Medium während 16 Stunden keimen und wachsen gelassen und anschliessend auf Fungizid-Agar übertragen. In beiden Fällen bewirkte die Behandlung mit N-Methyl N-Nitro-N-Nitrosoguanidin eine Erhöhung resistenter Nachkommen. Die Entwicklung resistenter Stämme setzte, wie bei der spontanen Bildung resistenter Stämme ohne mutagene Behandlung, erst mit einigen Tagen Verzögerung ein; so war besonders zwischen den 5. und 6. Tag nach Ansatz auf Fungizid-Agar (3 µg/ml) eine deutliche Zunahme der Entwicklung resistenter Myzels feststellbar.

4.1.5. Fitness laborresistenter Stämme im Vergleich zu den sensiblen Freilandisolaten

Die Verbreitung von gegenüber Fungiziden resistenten Pilzen ist gewährleistet, wenn deren Fitness und Konkurrenzkraft nicht negativ verändert sind. Nur so behält die resistente Population eine Überlebenschance auch in Abwesenheit des durch den fungiziden Wirkstoff bedingten selektiven Druckes.

Die Freilandresistenz von Botrytis cinerea bezüglich Benzimidazolen war nicht mit einer reduzierten Fitness gekoppelt, sodass sich die neuentwickelten Stämme bei der hohen Stabilität der Resistenz (Dekker, 1982) unter Freilandbedingungen ausbreiten konnten.

In zahlreichen Untersuchungen wurde die Fitness Vinclozolin-resistenter Stämme geprüft. Meist wurde festgestellt, dass die Laborresistenz verminderte Pathogenität, Sporulation und Konkurrenzfähigkeit miteinschliesst. Da der Pilz sich fast ausschliesslich mit Konidien ausbreitet, stellt eine verminderte Sporulation einen bedeutenden Nachteil dar. Davis und Dennis (1981 a) behaupten, dass die Ursachen der eingeschränkten Verbreitung der resistenten Stämme sowie der geringeren Häufigkeit der Infektionen auf Früchte auf verminderten Sporulation zurückzuführen sind. Die in dieser Arbeit untersuchten sensiblen Isolate zeigen eine höhere Anzahl Konidien vor allem auf PDA. Gullino und Garibaldi (1981) hingegen setzten Malzagar mit PDA gleich und betrachteten sie im Vergleich zu anderen Medien (Czapeck, Karottenagar) als ungünstiger für die Sporulation.

Grindle und Temple (1985) untersuchten Wachstum, Sporulation und Verträglichkeit hoher osmotischer Drucke bei Isolaten von Neurospora crassa, deren die Empfindlichkeit gegenüber dem osmotischen Druck regulierenden Gene (os-Gene) mutiert waren. Diese Isolate zeigten eine höhere Resistenz bezüglich Dicarboximide als das Freilandisolat. Innerhalb der os-Isolate waren jedoch Unterschiede in der Wachstumsrate auf Minimalmedium mit oder ohne Zusatz von Glucose und in der Sporulation feststellbar. Es wurde auch ein Isolat gefunden, die hohe Resistenz, gute Sporulation und geringe Sensitivität gegenüber osmotischem Druck aufwies d.h. die Resistenz bezüglich Vinclozolin beeinträchtigte in vitro die Fitness des Isolates nicht.

Die in dieser Arbeit untersuchten Mutanten ausgehend vom selben Isolat konnten auch verschiedenen Konzentrationen des Fungizides ertragen. Sowohl gegenüber 100 µg/ml als auch gegenüber 3 µg/ml Vinclozolin resistente Stämme zeigten aber eine erhöhte Sensitivität auf glucosehaltigen Nährmedien. Beever (1983) konnte diese Eigenschaft ebenfalls bei Dicarboximid resistenten Varianten von Botrytis cinerea, Aspergillus nidulans und Penicillium expansum beobachten aber keinen signifikante Zusammenhang zwischen den Resistenzniveaus feststellen.

Einzelne Wiederholungen bei den in dieser Arbeit einbezogenen resistenten Stämmen konnten aber erhöhte Glucosekonzentrationen ertragen. Dieses dem "Wild-Type" ähnliche Myzel behält seine Fungizidresistenz bei. Perkins und Mitarbeiter (1982) beschrieben bei Neurospora crassa Mutanten, die nach verzögertem Wachstum zu der Wuchsform des "Wild-Types" übergangen. Dieses "semicolonial Typ" (smco) war durch Mutationen an sieben verschiedenen Loci bedingt; nach Untersuchungen von Grindle und Temple (1983) waren nur drei davon resistent gegenüber Vinclozolin, zeigten aber gleichzeitig erhöhte Sensitivität bezüglich 2% und 4% Natriumchlorid im Nährmedium. Es wurde daher angenommen, dass an der Resistenz gegenüber Dicarboximiden und gewisse aromatische Kohlenwasserstoffen (Dichloran, Quintozene) auch drei smco Gene beteiligt sind. Das in dieser Arbeit festgestellte Wachstum einzelner Wiederholungen bei resistenten Stämmen deutet aber auf einer Veränderung der für die Verträglichkeit osmotischer Drucke ausschlaggebenden Genen hin. Aus Vorversuchen geht hervor, dass es möglich ist aus sensiblen Freilandisolaten auf kombiniertem Medium in vitro Mutanten zu bekommen, die sowohl Resistenz bezüglich Fungiziden als auch geringe

Sensitivität bezüglich osmotischem Druck, jedoch eine reduzierte Pathogenität im Aepfeltest aufwiesen. Diese Resultate beweisen, dass die Laborresistenz nicht unbedingt mit der Unfähigkeit, erhöhtem osmotischem Druck auszuhalten, gekoppelt sein muss. Eine möglich Koppelung der Resistenz mit erhöhter Sensitivität gegenüber osmotischem Druck ist trotz dieser Erscheinung nicht vollständig auszuschliessen.

Bis heute wurde bei Neurospora crassa Allelität nur zwischen einem Resistenzgen und dem Os-1 Gen nachgewiesen (Grindle, 1984). Es wird vermutet, dass auch an der Dicarboximid-Resistenz und Verträglichkeit erhöhter osmotischer Drucke bei Botrytis cinerea mehrere Gene beteiligt sind. Als Folge davon ist mit zahlreichen möglichen Kombinationen sowohl der verschiedenen Genen in einem Kern als auch der verschiedenen Kerne in einer Zelle zu rechnen.

In Anbetracht der Laborresultate stellt sich die Frage nach dem Risiko der Entstehung solcher Stämme unter Freilandbedingungen. Die geringe Pathogenität von laborresistenten Stämmen, die sich sowohl auf fungizidhaltigem Medium wie auch auf Vinclozolin-Glucose kombinierten Malzagar entwickelt haben, wurde unter Freilandbedingungen einen bedeutenden selektiven Nachteil darstellen. Das Fehlen von Stämmen mit hoher Myzelresistenz unter Freilandbedingungen ist auf mehreren Faktoren zurückzuführen. Mit hohem Resistenzniveau ist immer verminderte Pathogenität verbunden, die komplexen Ursprung hat. Sporulation und Verträglichkeit erhöhten osmotischen Druckes sind die wichtigsten Komponenten, die diese Eigenschaft bestimmen. Untersuchungen über Fitness laborresistenter Stämme im Vergleich zu den Freilandisolaten sind in der Literatur sehr häufig. Es wurden unterschiedliche Testorganismen zum Pathogenitätstest sowie verschiedene Nährmedien zur Prüfung der Sporulation verwendet. Uebereinstimmend mit meinen Resultaten über Pathogenität sind Ergebnisse von Gullino und Garibaldi (1981), die mit Traubenbeeren gearbeitet haben, Hisada und Mitarbeiter (1979) mit Gurkenkeimlingen, sowie Northover (1983) mit Äpfeln und Traubenbeeren.

Resistenz gegenüber Iprodion wurde auch bei Rhizoctonia solani Kühn. festgestellt (Gualco et. al., 1983). Die in vitro gebildeten resistenten Stämme dieses Krankheitserregers waren auch weniger aggressiv auf Bohnensamen. Die Pathogenität eines Organismus beruht auch auf der Aktivität bestimmter Enzyme, die Polymere der Zellwände bis zu verwertbaren Einheiten spalten.

4.1.6. Die Variabilität der Enzymmuster und Enzymaktivitäten

Bei Infektion und Besiedlung trifft der Pflanzenpathogen mehrmals auf die Zellwand seines Wirtes. Um die Zellwand zu durchdringen haben viele Parasiten ein weites Spektrum von Enzymen, die die entsprechenden Komponenten der pflanzlichen Zellwände abbauen können. Der Kontakt zwischen diesen extracellulären Enzymen des Pathogens und der Zellwand des Wirtes ist häufig die erste molekulare Wechselwirkung in der Wirt-Parasit Beziehung, von welcher der weitere Verlauf der Krankheit abhängig ist. Der Abbau von Polysacchariden der Primärzellwände ist vermutlich während der Pathogenese von grösster Bedeutung. Polymere mit pektinischem Gerüst sind überwiegend in der Mittellamelle vorhanden. Sie bestehen aus langen Ketten von α -1,4 gebundenen Gal A Molekülen, die mit 1,2 gebundene Rha durchgesetzt sind. Die Carboxyl Gruppe von Gal A kann methyliert werden oder an Calcium gebunden sein, was zur Brückenbildung mit anderen Ketten führt. Diese komplexen Strukturen verleihen diesen Verbindungen Gel-Eigenschaften und haben einen grossen Einfluss auf die Struktur der Zellwand und auf ihre Zugänglichkeit für pektolytische Enzyme. Wie aus Untersuchungen mit dem Elektronmikroskop feststellbar, bleibt der Befall von Botrytis cinerea auf Äpfeln auf die Mittellamelle beschränkt (Tronsmo und Tronsmo, 1977). Erst während eines späteren Stadium der Infektion kann der Pilz auch die Zellulose der Zellwände angreifen. Es wird angenommen, dass die in vitro Pektinase an die in der Zellwand ionisch gebundenen Proteine angelagert sind. Diese Enzyme sind dadurch im Gewebe festgelegt und spalten nur das in unmittelbarer Nähe liegende Substrat, ohne Abwehrreaktionen der Pflanzen auszulösen. Experimentell ist das Fehlen von Pektinasen in Wasserextrakte aus befallenen Geweben nachweisbar (Tronsmo und Tronsmo, 1977). Pektolytische Enzymen von pathogenen Isolaten sowie nicht pathogenen Stämmen wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Isolate und Stämme zeigten auf Kultur sowohl mit Pektin als auch mit gewaschenen Apfelzellen als Kohlenstoffquelle eine Entwicklung von submers und oberflächlich wachsendem Myzel. Das lässt sich auf die Bildung der zum Abbau notwendigen Enzymen, sowie auf die Verwertung der entstandenen Oligomeren zurückzuführen.

Polygalacturonasen und Pektin-Lyasen sind allgemein verbreitet bei Pilzen und nicht nur auf Pflanzenpathogenen beschränkt. Sie sind durch das

Vorhandensein von mehreren Isoenzymen charakterisiert, die je nach Grösse, Ladung, Aktivität und Stabilität sich unterscheiden lassen. Nach Verhoeff und Liem (1978) sind Endopolygalacturonasen in den Konidien enthaltene konstitutive Enzyme. Magro und Mitarbeiter (1980) konnten beweisen, dass das Spektrum von in vitro gebildeten Enzymen innerhalb der Isolate variierte. Eine zunehmende Anzahl von Isoenzymen konnte auch mit zunehmenden Alter der Kulturen bis zum 14. Tag festgestellt werden; aus diesem Grund sollten Experimente mit gleichalten Kulturen durchgeführt werden.

Die Aktivität der Polygalacturonasen wurde sowohl nach der Dinitrosalicylsäure- wie nach der Thiobarbitursäure Methode gemessen und keine Korrelation mit der Pathogenität in vivo konnte festgestellt werden.

Dies lässt sich besonders gut bei den Stämmen S10 a, K25 3c und K25 3d zeigen, die keine oder nur eine geringe Fäulnis im Apfeltest verursachen.

In vitro können diese Stämme sowohl mit Pektin als auch mit gewaschenen Apfelzellen als Kohlenstoffquelle aktive Polygalacturonasen und Pektin-Lyasen produzieren. Lorenz und Pommer (1982) fanden auch keine Korrelation zwischen Pathogenität und Aktivität von Pektin Methylesterasen bei in vitro Kulturen von gegenüber Dicarboximiden sensiblen und resistenten Freilandisolaten. Ähnliche Resultaten wurden auch mit laborresistenten Stämmen und den entsprechenden Wildisolate erhalten.

Weitere Untersuchungen zur Identifizierung der für die verminderte Pathogenität von Stämmen verantwortlichen Faktoren, sind zu unterschiedliche Ergebnisse gekommen. Es handelte sich dabei aber um die natürliche Variabilität der Pathogenität ohne die Zusammenhänge mit Fungizidresistenz. Zalewska-Sobczack und Mitarbeiter (1981) fanden eine erhöhte Aktivität saurer Proteasen von virulenten Botrytis cinerea Stämmen während der ersten Tage sowohl auf Kulturmedium wie auch in befallenen Geweben. In der Aktivität der Polygalacturonasen und Xylanasen konnten sie keine Unterschiede feststellen, Es wurde vermutet dass, die Protease gegen pflanzliche Barrieren sowie proteolytische Inhibitoren (Fiedling, 1981; Brown, 1984) von Bedeutung seien.

Andererseits setzten Punja und Mitarbeiter (1985) die Pathogenität von Sclerotium rolfsii in Verbindung mit der Produktion einer genügende Menge Oxalsäure und Endopolygalacturonasen bei einer gleichzeitig hohen Wachstumsrate.

Die in dieser Arbeit untersuchten sensiblen Freilandisolate und resistenten Laborstämme zeigen eine höhere Anzahl Proteine als diejenige von Magro und Mitarbeiter (1980). Sowohl im Medium mit Pektin als Kohlenstoffquelle als auch im Medium mit Apfelzellen standen die Polygalacturonasen im Vordergrund. Die nach der Methode von Lisker und Redig (1974) nachgewiesene Polygalacturonase-Isoenzyme erstreckten sich vom sauren bis alkalischen Bereich. Weniger häufig waren die Banden, die Aktivität von Pektin-Lyase- und Pektin-Esterasen-Isoenzymen entsprachen. Bei gewissen Stämmen waren kaum sichtbaren Aufhellungen vorhanden, sodass die Aktivität der Pektin-Lyase nach der Methode von Ayers und Mitarbeiter (1966) nicht bestimmbar war. Eines der in dieser Arbeit in allen Isolaten identifizierte Polygalacturonase-Isoenzym (pI 4.1) entsprach demjenige, das Magro und Mitarbeiter (1980) in Czapeck Medium mit Pektin aus Citrus Früchte bei drei Botrytis cinerea-Isolaten fanden. Innerhalb der grosse Variabilität der Isolate und Stämme sind artspezifische Polygalacturonasen vorhanden.

Urbanek und Zalewska-Sobczak (1984) wiesen auf eine synergistische Wirkung mehrerer verschiedener glycolytischer Hydrolasen in vitro und in vivo bei einem Botrytis cinerea-Isolat aus einem befallenen Apfel hin. Aus den isoelektrischen Fokussierungen geht hervor, dass die meisten extracellulären Proteine hingegen Polygalacturonase Aktivität besitzen. Das Vorkommen von Banden, die gleichzeitig Polygalacturonase als auch Pektinlyase-Aktivität besitzen, ist möglicherweise auf eine ähnliche Aminosäurezusammensetzung der beiden Enzyme zurückzuführen oder auf das Vorhandensein von Enzymkomplexen, die je nach pH-Wert Lyase oder Polygalacturonase Aktivität aufweisen.

Es bestand eine Korrelation zwischen der Freisetzung von Galacturonsäure durch Polygalacturonase und der Dauer der Inkubation. Resistente Mutanten hervorgehend aus einem Wildisolat auf Pektin-Medium zeigten in diesem Experiment ähnliche Polygalacturonase-Aktivität, unterscheiden sich jedoch vom Freilandisolat. Die Resistenzbildung in vitro schliesst demzufolge eine Veränderung der enzymatischen Aktivitäten ein. Die Aktivität ist abhängig vom Nährmedium, wobei sich aufgrund der durchgeführten Untersuchungen die verminderte Aktivität der Polygalacturonasen in Nährmedium mit Apfelzellen nicht erklären lässt. Wie aus der IEF ersichtlich sind die Enzyme zwar vorhanden, jedoch weniger aktiv. Als Ursache wäre anzunehmen, dass sie entweder an Proteine der Zellwände verbunden

(Tronsmo und Tronsmo, 1976) oder von proteolytischen Inhibitoren gehemmt wären (Fiedling, 1981; Brown und Adikaram, 1982). Beide Möglichkeiten sind in diesen Experimenten ziemlich unwahrscheinlich wegen der Denaturierung der Proteine der Zellwände beim Autoklavieren und wegen der Auslösung der ionisch gebundenen Proteine beim Homogenisieren mit KCl zur Herstellung der gewachsenen Apfelzellen.

Die Ergebnisse aus den Papier Chromatographien deuteten auf das Vorkommen von Endo- sowie Exopolygalacturonasen. Bateman (1972) isolierte aus Kulturen von Sclerotium rolfsii Komplexe, die Exo- und Endopolygalacturonase Aktivitäten aufwiesen. Urbaneck und Zalewska-Sobczak (1975) sowie Marcus und Schejter (1983) reinigten Endopolygalacturonasen, die sich nach Molekulargewicht und nach der Fähigkeit zur Bindung an Polygalacturonsäure differenzierten. Es ist anzunehmen, dass die festgestellte verminderte Pathogenität der Dicarboximid-resistenten Laborstämme nicht nur auf Aktivität pektolytischer Enzymen beruht, sondern in engem Zusammenhang mit dem gehemmten Wachstum auf erhöhten Zuckerkonzentrationen und mit der schwachen Sporulation steht.

4.1.7. Vergleich zwischen Freiland- und Laborresistenz

In den vorhergehenden Kapitel wurde vermutet, dass sich die Freiland- und Laborresistenz bei Botrytis cinerea bezüglich Dicarboximiden auf verschiedene Mechanismen stützten. Resistenz im Freiland ist gekennzeichnet durch niedriges Resistenzniveau des Myzels (3 µg/ml) und erhöhte Resistenz der Konidien (10 µg/ml). Dieser Unterschied ist hingegen bei Laborresistenz nicht feststellbar.

Martinetti (1982) konnte eine verminderte Pathogenität der 3 µg/ml resistenten Freilandisolaten auf Golden Delicious im Vergleich zu den sensiblen feststellen. Lorenz und Pommer (1982) fanden bei sensiblen und resistenten Freilandisolaten sowohl pathogene als auch nicht pathogene wobei der Prozentsatz der nicht pathogene bei den resistenten höher war. Variationen innerhalb der Isolate wurden auch bei Hartill und Mitarbeiter (1983) bei Inokulation von Gurken und Zucchetti Scheiben festgestellt. Gullino und Mitarbeiter (1982) fanden bei resistenten Isolaten auch solche die auf Traubenbeeren gleich pathogen wie die sensiblen waren.

Beim Apfeltest waren die in dieser Arbeit untersuchten hochresistenten Stämme signifikant weniger pathogen als die resistenten und sensiblen

Freilandisolaten. Wie aus Enzymuntersuchungen hervorgeht, ist diese Erscheinung nicht mit Aktivität pektolytischer Enzyme in vitro korrelierbar, sondern eher mit einer verminderten Verträglichkeit osmotischer Drucke. Myzelwachstum sowie Konidienkeimung der Laborstämme werden von Glucosekonzentrationen über 7% in Nährmedium stark beeinträchtigt. Hohe Glucosekonzentrationen hemmen jedoch nur das Myzel und nicht die Konidienkeimung bei freilandresistenten Isolaten. Leroux und Gredt (1982) sowie Beever und Brien (1983) konnten ebenfalls eine erhöhte Sensitivität gegenüber erhöhten Zuckerkonzentrationen zeigen. Die Verträglichkeit der Konidien gegenüber dem osmotischen Druck wurde jedoch nie untersucht. Nach mehrjähriger Anwendung der Fungizide aus der Gruppe der Dicarboximide hat die Situation der Resistenz im Freiland eine gewisse Stabilität erreicht und grosse Veränderungen sind, aufgrund der Erfahrungen der vergangenen Jahren und der Experimente in vitro, nicht zu erwarten. Bei Untersuchungen in Zusammenhang mit der Dicarboximid-Resistenz kommt die grosse Variabilität und Adaptationsfähigkeit der Botrytis cinerea-Isolate besonders zum Ausdruck.

Freiland- und Laborbedingungen üben einen unterschiedlichen Einfluss auf dem Erreger aus und haben zur Entwicklung von zwei Resistenztypen geführt. Die sensiblen Isolaten können als genetisch instabil bezüglich Resistenzbildung betrachtet werden, weil sie in der Lage sind, unter dem selektiven Druck des Fungizides im Freiland sowie im Labor sich zu resistenten Formen umzuwandeln. Freilandresistente Isolate hingegen sind in ihrem Resistenzniveau so stabilisiert, dass nicht mehr spontan Laborresistenz erlangen können.

4.1.8. Einsatz von Dicarboximiden im Pflanzenschutz

Dicarboximide werden gegen Botrytis-Arten im Gewächshaus sowie in Freilandkulturen angewendet. In der Schweiz wurden erst 1979 nach dreijähriger Anwendung von Dicarboximiden die ersten resistenten Freilandisolate gefunden (Schüepp et. al., 1982).

Zur gleichen Zeit wurde über Dicarboximid-Resistenz bei Botrytis cinerea auch aus anderen europäischen Weinbaugebieten und auch aus Neuseeland berichtet (Beever und Brien, 1983). Auch in Griechenland wurden bei verschiedenen Gewächshauskulturen (Pappas, 1982; Panayotakou und Malathrakis, 1983) resistente Botrytis-Stämme gefunden. Das Auftreten resistenter

Isolate war jedoch nicht in jedem Fall mit einem Wirkungsverlust der Präparate korreliert. Erst ab 1981 mussten in gewisse Regionen auch eindeutige Wirkungsverluste der Präparate festgestellt werden (Schüepp und Siegfried, 1983). Solange den Rebbauern keine Ersatzpräparate zur Verfügung stehen, wird die Graufäule durch fachgerechte Kulturmassnahmen einzudämmen versucht sowie durch Einsatz von Mittel gegen Plasmopara viticola mit gleichzeitiger Nebenwirkung auf Botrytis (Dichlofluamid, Folpet) unterdrückt. Wo noch mit einer erfolgreicher Bekämpfung mit Dicarboximiden zu rechnen ist werden meist zwei Behandlungen mit diesen Fungiziden durchgeführt.

4.2. Das Fungizid Z 1

Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten der Botrytis cinerea-Populationen bezüglich Z 1 gegenüber demjenigen früher zur Anwendung gekommenen Fungiziden sind von erheblicher Bedeutung. Wegen der höheren Wirksamkeit auf Konidienkeimung (ED_{50} zwischen 0.1 und 0.5 $\mu\text{g/ml}$) als auf Myzelwachstum (ED_{50} 1 $\mu\text{g/ml}$) unterscheidet sich Z 1 von den Dicarboximiden, die das Myzelwachstum stärker hemmen. 3 $\mu\text{g/ml}$ Vinclozolin resistente und sensible Freilandisolate verhalten sich gleich gegenüber Z 1. Es besteht somit keine Kreuzresistenz zwischen den beiden Gruppen, was auf einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus zurückzuführen ist. Jedoch ist ebenfalls bei Z 1 die Entstehung von laborresistenten Stämmen festzustellen, die höhere Fungizidkonzentrationen ertragen können, ihre Wachstumsrate sinken jedoch bei Konzentrationen über 10 $\mu\text{g/ml}$ Z 1 im Vergleich zur Kontrolle.

Das Wachstum sowohl von gegenüber Dicarboximiden wie gegenüber Z 1 resistenten Stämmen bleibt bei zehnfacher Erhöhung der entsprechenden Fungizidkonzentrationen von 10 auf 100 $\mu\text{g/ml}$ unverändert. Die Mehrheit der gegenüber Z 1 resistenten Stämmen konnten sich nicht nur auf Z 1 sondern auch auf denselbe Konzentration von Vinclozolin entwickeln. Es konnte eine grosse Variabilität festgestellt werden, wobei neben Stämme, die auf beiden Fungiziden wie auf Kontrolle wachsen konnten, anderen auf 10 und 100 $\mu\text{g/ml}$ stark gehemmt waren. Diese Erscheinungen führten zu grossen Streuungen.

Das Auftreten von Kreuzresistenz bei laborresistenten Stämmen zwischen Z 1

und Vinclozolin konnte, wenn auch nicht bei allen untersuchten Stämmen, festgestellt werden. Da bei Freilandisolaten keine Kreuzresistenz zwischen den beiden Mitteln besteht, unterscheidet sich der molekulare Mechanismus der Entstehung von Laborresistenz von demjenigen der Feldresistenz.

Die Pathogenität der resistenten Stämme ist allgemein reduziert im Vergleich zu derjenigen der sensiblen Isolaten, wobei jedoch grosse Variabilität zu berücksichtigen ist. Im Thallus laborresistenter Stämme sind nicht ausschliesslich resistente Kerne enthalten. Die auf Fungizidplatten nicht gekeimten Konidien weisen auf sensible Kerne in den konidiogenen Zellen hin. Da dieses Myzel ständig unter dem Selektionsdruck des Fungizides gestanden ist, ist eine Resensibilisierung durch Rückmutation unwahrscheinlich. Diese heterogenen Stämme weisen eine erhöhte Pathogenität auf und unterscheiden sich nicht vom entsprechenden Freilandisolat (Abb.23). Die laborresistenten Stämme behalten ihr Resistenzniveau auch nach Passage auf einem natürlichen Substrat sowie nach mehrmaligem Ueberimpfen auf fungizidfreiem Malzagar. Die entstandene Resistenz ist, bei Z 1 wie bei den Dicarboximiden stabil und demzufolge vermutlich chromosomal gebunden.

Das gleichzeitige Vorhandensein beider Fungizide bewirkt eine bedeutende Reduktion der Anzahl laborresistenter Stämme. Im Gegensatz zur Kombination Glucose-Dicarboximid ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer Doppelmutante gegen beiden Fungiziden sehr gering.

Nach Ermittlung der Wirksamkeit des Mittels zur Bekämpfung von Botrytis cinerea im Freiland, wäre es möglich, da keine Kreuzresistenz mit Dicarboximiden feststellbar ist, Z 1 als Ersatz oder in Kombination mit Vinclozolin einzusetzen.

4.3. Resistenz gegenüber MBC (Methylbenzimidazol)-Fungiziden

MBC-Fungizide wurden in den Jahren 1971-1973 zur Bekämpfung der Graufäule intensiv eingesetzt. Ihre Anwendung nahm infolge Resistenzbildung in den folgenden Jahren ab und seit 1976 sind sie im Weinbau nicht mehr zugelassen. Benzimidazolfungizide wirken systemisch und durch Bindung an Tubulin, verhindern die Bildung der Mikrotubuli. Mutationen die, die Affinität von Tubulin zu MBC vermindern ohne jedoch die Funktion der Protein zu beeinflussen, führen zur Entstehung resistenter Stämme. Es wurde gezeigt,

dass die Mutation ein einziges Gen betrifft (van Tuyl, 1977), das als Strukturgen für Tubulin identifiziert wurde (Sheir-Neiss et. al., 1978). Diese monogenetische Resistenz kennzeichnet sich durch das plötzliche Auftreten eines hohen Resistenzniveaus. Im Labor ist es sehr schwierig resistente Stämme künstlich zu induzieren. In Rebbergen sind sie hingegen sehr verbreitet. Schüepp und Küng (1981) stellten im Jahr 1978 einen langsamen Rückgang des Prozentsatzes resistenter Stämme in Parzellen fest, die von 1971 bis 1973 mit MBC behandelt wurden. Die Resistenz bezüglich MBC beeinflusst weder Fitness noch Konkurrenzfähigkeit der Stämme und ist sehr stabil sodass, noch 1984 33% der Population in Rebbergen ein Resistenzniveau von über 100 µg/ml aufwies.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen in den Jahren 1983 und 1984 über Resistenz von Botrytis cinerea gegenüber den Dicarboximiden nach mehrjähriger Anwendung zeigten, dass das Resistenzniveau des Myzels in Freiland auf einer Konzentration von 3 µg/ml stehen blieb. Die durch Bestimmung der Keimungsrate ermittelte Resistenz der Konidien hingegen, nahm in den letzten Jahren beachtlich zu.

Der Anteil sensibler Isolate bei der Resensibilisierung infolge Behandlungsunterbruch war auch nach drei Jahren nicht 100% und der Anteil resistenter Isolate erreichte den ursprünglichen Wert, sobald erneut Dicarboximide zur Anwendung kamen.

Ein sehr geringer Anteil resistenter Konidien wurde auch bei Botrytis-Isolaten aus noch nie mit Fungiziden behandelten Erdbeerfeldern gefunden, es ist deswegen anzunehmen, dass auch bei den Dicarboximiden die Resistenz in der Natur schon vorhanden war.

Im Labor beim Myzeltest mit sensiblen Freilandisolaten traten spontan bei hohen Fungizidkonzentrationen, sehr häufig bei 3 µg/ml jedoch auch bei 10 und 100 µg/ml resistente Laborstämme auf. Da durch Behandlung mit mutagener Substanz das Auftreten hoch resistenter Stämme bei sensiblen wie auch bei resistenten Freilandisolaten erhöht wurde, ist anzunehmen, dass Mutationen in einem oder mehreren Kernen die Entstehung resistenter Stämme auslöste. Wegen der zufälligen Verteilung der resistenten Kerne in Hyphenzellen und Konidien, konnte bei einem sensiblen Freilandisolat durch eine Einsporlinie über sechs Generationen keine Zunahme des Anteils resistenter Laborstämme festgestellt werden.

Die Isolate und Stämme wurden bezüglich Myzelwachstum und Sporenkeimung auf die Verträglichkeit erhöhter osmotischer Drucke geprüft, indem sie auf Malzagar mit zunehmender Glucosekonzentration kultiviert wurden. Die Pathogenität wurde mit dem Apfeltest untersucht, dabei wurde der Durchmesser der Fäulnis auf Äpfeln der Sorte Golden Delicious nach 5 Tagen Inkubation ermittelt. Es konnte eine verminderte Pathogenität sowie eine erhöhte Sensibilität gegenüber erhöhter osmotischer Drucke bei den resistenten Freilandisolaten und besonders bei den resistenten Laborstämmen im

Vergleich zu den sensiblen Isolaten festgestellt werden. Die Keimung der Konidien der meisten laborresistenten Stämme war im Gegensatz zu den resistenten Freilandisolaten auf erhöhten Glucosekonzentrationen im Nährmedium gehemmt.

Laborresistente Stämme zeigten im Vergleich zu ihren sensiblen Ursprungsisolaten auch eine reduzierte Sporulation. Die Korrelation der Resistenz bezüglich Dicarboximiden mit verminderter Verträglichkeit erhöhter osmotischer Drucke wurde weitgehend diskutiert.

Die, *in vitro* gebildeten extracellulären Enzyme wurden mit der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamid-Gele getrennt; dabei konnte Polygalacturonasen, Pektin-Lyase und Pektin-Esterasen durch Färbung mit Ruthenium Rot identifiziert werden. Die gesamten Proteine wurden mit Comassie Blue R 250 gefärbt. Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten konnten auch in Abhängigkeit der verwendeten C-Quelle im Nährmedium gezeigt werden. Zwei Polygalacturonasen mit pI 4.1 und 4.3 konnten jedoch bei allen Isolaten und Stämmen festgestellt werden und sind daher vermutlich artspezifisch. Es bestand eine Korrelation zwischen der gemessenen Aktivität der Polygalacturonasen und der Anzahl Isoenzymen; keine hingegen mit der Pathogenität der Freilandisolaten und Laborstämme in vivo.

Untersuchungen über Resistenzverhalten von Botrytis cinerea wurden auch mit Z 1, ein neuer Wirkstoff aus einer anderen Fungizidgruppe durchgeführt. Sensible und gegenüber 3 µg/ml Vinclozolin resistente Freilandisolate zeigten sensibles Verhalten bezüglich Z 1. Auch bei diesem Fungizid traten im Labor spontan resistente Stämme mit hohem und stabilem Resistenzniveau. Die resistenten Laborstämme zeigten verminderte Pathogenität im Apfeltest. Einige gegenüber Dicarboximiden und einige gegenüber Z 1 resistenten Stämme konnten sich auf Z 1 bzw. Vinclozolin entwickeln.

Laborresistenz bezüglich Dicarboximiden unterscheidet sich daher von der Freilandresistenz, sodass die beiden Resistenztypen eindeutig getrennt werden konnten.

Die Kombination von Z 1 und Vinclozolin in Nährmedium bewirkte eine merkliche Reduktion der Anzahl gebildeter resistenter Laborstämme.

5. SUMMARY

Field isolates of Botrytis cinerea were collected during the growing seasons 1983 und 1984 from vineyards in Wädenswil, Switzerland treated since 1974 with dicarboximide fungicides.

Laboratory examination of the resistant isolates showed a low level of mycelium resistance to the fungicides. Normal growth of fungal hyphae occurred only on malt extract agar amended with 1 or 3 µg/ml of the Vinclozolin. However resistance of conidia was greater than that of mycelium and spore germination was not inhibited on medium with 10 µg/ml of fungicide.

The resistant population was apparently rapidly resensitized to the fungicides in the absence of selection pressure as few resistant isolates were observed after three years without dicarboximide treatments. All sensitive isolates disappeared quickly when these fungicides were used again.

Field isolates of Botrytis cinerea were also collected from four commercial stawberry fields in Canton Zürich, Switzerland which had never been treated with dicarboximide fungicides. The small number of resistant conidia produced by sensitive isolates supported the hypothesis that resistance was already present in nature. Only mycelial plugs from sensitive field isolates transferred on malt extract agar with 3, 10 and 100 µg/ml Vinclozolin segregated resistant laboratory strains which exhibited a high level of resistance. The emergence in vitro of strains resistant to dicarboximides from sensitive and also from resistant field isolates was enhanced by conidial treatment with the mutagen N-Methyl-N' nitro N-Nirosoguanidin . It is therefore possible that segregation of resistant strains was caused by mutations in one or more nuclei. Transferring single spores from one sensitive field isolate over 6 generations did not enable selection of cultures with increased production of resistant strains.

Highly resistant laboratory strains and resistant field isolates were scored for osmotic sensitivity by comparing the extent of their radial hyphal growth on malt extract agar with different glucose concentrations

with that of their parents or other sensitive field isolates. Resistant strains and isolates showed abnormal osmotic sensitivity. Conidial germination of the majority of the highly resistant strains was also inhibited by concentrations higher than 5% glucose. No inhibitory effect was recorded by the remaining resistant strains or by resistant and sensitive field isolates. A discussion of the correlation between dicarboximide resistance and sensitivity to high osmotic pressure is presented.

Resistant strains produced lower amounts of conidia and their relative pathogenicity measured as diameter of the rot on apple fruits, was less than that of their parent isolates.

Extracellular pectic enzymes produced in vitro were separated with isoelectric focusing on polyacrylamide gels, polygalacturonases, pectin lyases and pectin esterases were detected by subsequent staining with ruthenium red. Staining patterns of total proteins were obtained with Comassie Blue R 250. Differences between isolates were found, but these differences varied depending upon the carbon source available to the fungi. All sensitive isolates and resistant strains showed two polygalacturonases with isoelectric points of 4.1 and 4.3. These isoenzymes are probably characteristic of the species Botrytis cinerea. A correlation was found between the activity of polygalacturonase and the number of isoenzymes detected on the gels but isoenzymes produced in vitro and pathogenicity on apple fruits were not correlated.

Studies about development of resistance were carried out comparing a new experimental substance, termed Z 1, from a non-dicarboximide group of fungicides, with Vinclozolin. Z 1 is not commercially available. Collections of isolates of Botrytis cinerea from dicarboximide treated vineyards were tested with Vinclozolin and Z 1. No positive cross resistance was found. Z 1 resistant strains were selected in vitro, they exhibited a high level of resistance which was stable even after several transfers on Z 1-free medium. High resistance to Z 1 was correlated with lower pathogenicity on apple fruits.

The most dicarboximid-resistant strains showed, as opposed to the field isolates, normal growth on medium amended with with 10 or 100 µg/ml Z 1.

Therefore, resistance in the field and in vitro had to be considered as two different types of resistance. The number of resistant strains produced in vitro was greatly reduced by simultaneous presence in the medium of dicarboximide and Z 1 at a concentration of 3 µg/ml each.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ayers, W.A., G.C. Papavizas and A.F. Diem, 1966: Polygalacturonate trans-eliminase and polygalacturonase production by Rhizoctonia solani. *Phytopathology* 56, 1006-1011
- Bateman, D.F., 1972: The polygalacturonase complex produced by Sclerotium rolfsii. *Physiol. Plant Pathol.* 2, 175-184.
- Beetz, K.J. und G. Lorenz, 1983: Wo stehen wir mit der Botrytisbekämpfung im Weinbau ? *Der deutsche Weinbau* 13, 699-700.
- Beever, R.E. and R.J.W. Byrde, 1982: Resistance to the dicarboximide fungicides. In: J. Dekker and S.G. Georgopoulos (Eds.): *Fungicide resistance in crop protection*. Pudoc, Wageningen, 101-117.
- Beever, R.E., 1983: Osmotic sensitivity of fungal variants resistant to dicarboximide fungicides. *Trans. Br. mycol. Soc.* 80, 327-331.
- Beever, R.E. and H.M.R. Brien, 1983: A survey of resistance to the dicarboximide fungicides in Botrytis cinerea. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 26, 391-400.
- Besselat, B., 1983: La lutte contre la pourriture grise. *Phytoma* 348, 27-31.
- Bolton, A.T., 1976: Fungicide resistance in Botrytis cinerea, the result of selective pressure on resistant strains already present in nature. *Can. J. Plant Sci.* 56, 861-864.
- Bosshard, E. und H. Schüepp, 1983: Variabilität ausgewählter Stämme von Plasmopara viticola bezüglich ihrer Sensibilität gegenüber Metalaxyl unter Frielandbedingungen. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 90, 449-459.
- Brown, A.E. and N.K.B. Adikaram, 1982: The differential inhibition of pectic enzymes from Glomerella cingulata and Botrytis cinerea by a cell wall protein from Capsicum annum fruit. *Phytopath.* Z. 105, 27-38.

- Brown, A.E., 1984: Relationship of polygalacturonase inhibitor activity to the rate of fungal rot development in apple fruits. *Phytopath. Z.* 111, 122-132.
- Buchenauer, H., 1976: Preliminary studies on the mode of action of vinclozolin. *Med. Fac. Landbouuw. Rijksuniv. Gent.* 41, 1509-1519.
- Cooper, R.M., 1983: The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. In: J.A. Callow (Edt.): *Biochemical plant pathology*. John Wiley & Sons Ltd., 101-135.
- Cruickshank, R.H. and G.C. Wade, 1980: Detection of pectic enzymes in pectin-acrylamid gels. *Analytical biochemistry* 107, 177-181.
- Cruickshank, R.H., 1983: Distinction between Sclerotinia species by their pectic zymograms. *Trans. Br. mycol. Soc.* 80, 117- 119.
- Davis, R.P. and C. Dennis, 1981: Properties of dicarboximide-resistant strains of Botrytis cinerea. *Pestic. Sci.* 12, 521-535.
- Davis R.P. and C. Dennis, 1981a: Studies on the survival and infective ability of dicarboximid-resistant strains of Botrytis cinerea. *Ann. appl. Biol.* 98, 395-402.
- Dekker, J., 1976: Acquired resistance to fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* 14, 405-428.
- Dekker, J., 1982: Can we estimate the fungicide-resistance hazard in the field from laboratory and greenhouse tests ? In: J. Dekker and S.G. Georgopoulos (Eds.): *Fungicide resistance in Crop protection*. Pudoc, Wageningen, 128-138.
- Deld, C.J., 1980: Coping with resistance to plant disease. *Plant Dis.* 64, 652-657.
- Delp, C.J. and J. Dekker, 1985: Fungicide resistance: definitions and use of terms. *EPP0 Bull.* 15, 333-335.

- Dieter (Steigra), A., 1983: Die Entwicklung der Botrytisresistenz gegen Dicarboximide im Weinbaubebiet Franken. Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch 3 346-349.
- Fielding, A.H., 1981: Natural inhibitors of fungal polygalacturonases in infected fruits tissues. Journal of General Microbiology 123, 377-381
- Fritz, R., P. Leroux et M. Gredt, 1977: Mécanisme de l'action fongitoxique la promidione (26019 RP ou glycophène) de la Vinclozoline et du dicloran sur Botrytis cinerea Pers. Phytopath. Z. 90, 150-163.
- Gärtel, W., 1967: Schalen-Diffusionstest zur Prüfung der Wirksamkeit von Fungiziden gegen Botrytis cinerea. Weinberg und Keller 14, 410-413.
- Grindle, M. and W. Temple, 1983: Fungicide resistance of smco mutants of Neurospora crassa. Neurospora Newsletter 30, 7-8.
- Grindle, M., 1984: Isolation and characterisation of vinclozolin resistant mutants of Neurospora crassa. Trans. Br. mycol. Soc. 84, 635-643.
- Grindle, M. and W. Temple, 1985: Sporulation and osmotic sensitivity of dicarboximide-resistant mutants of Neurospora crassa. Trans. Br. mycol. Soc. 84, 369-372.
- Gualco, A., M.L. Romano and M.L. Gullino, 1983: Laboratory resistance in Rhizoctonia solani Kuhn to iprodione. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent. 48, 749-754.
- Gullino, M.L. e A. Garibaldi, 1979: Osservazioni sperimentali sulla resistenza di isolamenti italiani di Botrytis cinerea a vinclozolin. La difesa delle piante 6, 341-350.
- Gullino, M.L. and A. Garibaldi, 1981: Biological properties of dicarboximide-resistant strains of Botrytis cinerea Pers. Phytopath. medit. 20, 117-122.

- Gullino, M.L., M.L. Romano and A. Garibaldi, 1982: Characterisation of dicarboximide-resistant strains of Botrytis cinerea Pers. naturally occurring in Italy. Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent. 47, 781- 792.
- Hartill, W.F.T., G.R. Tompkins and P.J. Kleinsman, 1983: Development in New Zealand of resistance to dicarboximide fungicides in Botrytis cinerea, to acylalanines in Phytophthora infestans, and to guazatine in Penicillium italicum. New Zealand Journal of Agricultural Research 26, 261-269.
- Hill, G.K. und H. Schlamp, 1980: Resistenzsituation bei Botrytis cinerea gegenüber den Dicarboximid-Botrytiziden im Anbaugebiet Rheinhessen. Wein-Wissenschaft 6, 397-412.
- Hisada, Y., H. Takaki, Y. Kawase and T. Ozaki, 1979: Difference in the potential of Botrytis cinerea to develop resistance to procymidone in vitro and in field. Ann. Phytopath. Soc. Japan 45, 283-290.
- Holz, B., 1979: Ueber eine Resistenzerscheinung von Botrytis cinerea an Reben gegen die neuen Kontaktbotrytizide im Gebiet der Mittelmosel. Weinberg und Keller 26, 18-25.
- Katan, T., 1982: Resistance to 3,5-dichlorophenyl-N-cyclic imide ("dicarboximide") fungicides in the grey mould pathogen Botrytis cinerea on protected crops. Plant Pathol. 31, 133-141.
- Lauber, H.P., 1971: Variabilität und Kernverhältnisse bei Botrytis cinerea. Schweizerische landwirtschaftliche Forschung 10, 1-64.
- Lawley, P.D., 1979: Approaches to chemical dosimetry in mutagenesis and carcinogenesis: the relevance of reactions of chemical mutagens and carcinogens with DNA. In: P.L. Grover (Edt.) Chemical carcinogens and DNA. Volume 1 CRC Press Inc. 1-36.
- Leroux, P., R. Fritz et M. Gredt, 1977: Etudes en laboratoire de souches de Botrytis cinerea resistente à la dichlozoline, au dicloran, au quintozone, à la vinchlozoline et au 26019 RP (ou glycophene). Phytopath. Z. 89, 347-358.

- Leroux, P., R. Lafon et M. Gredt, 1982: La résistance de Botrytis cinerea aux benzimidazoles et aux imides cycliques: situation dans les vignobles alsaciens, bordelais et champenois. Bull. OEPP 12, 137-143.
- Leroux, P. et M. Gredt, 1982: Phénomènes de résistance de Botrytis cinerea aux fongicides. La défense des végétaux 213, 3-17.
- Lisker, N. and N. Retig, 1974: Detection of polygalacturonase and pectin lyase isoenzymes in polyacrylamide gels. Journal of chromatography 96, 245-249.
- Lorenz, D.H. und K.W. Eichhorn, 1978: Untersuchungen zur möglichen Resistenzbildung von Botrytis cinerea an Reben gegen die Wirkstoffe Vinclozolin und Iprodione. Wein-Wissenschaft 33, 251-265.
- Lorenz, D.H. und K.W. Eichhorn, 1980: Vorkommen und Verbreitung der Resistenz von Botrytis cinerea an Reben gegen Dicarboximid-Fungizide im Anbaugebiet der Rheinpfalz. Wein-Wissenschaft 35 199-210.
- Lorenz, G. and E.H. Pommer, 1982: Pectolytic and cellolytic enzymes of dicarboximide-sensitive and resistant strains of Botrytis cinerea. Bull. OEPP 12, 145-149.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Magro, P., P. Di Lenna, P. Marciano and C. Pallavicini, 1980: Variability of polygalacturonase and protein isoelectric focusing patterns in Botrytis cinerea isolates. Journal of General Microbiology 120, 105-109.
- Marcus, L. and A. Schejter, 1983: Single step chromatographic purification and characterisation of the endopolygalacturonases and pectinesterases of the fungus, Botrytis cinerea Pers.. Physiol. Plant Pathol. 22, 1-13.

- Martinetti, G., 1982: Epidemieverlauf und Fungizid-Resistenz bei Botrytis cinerea im Rebbau. Diplomarbeit.
- Mathys, G., 1982: Importance économique de la pourriture grise de la vigne. Bull. OEPP. 12, 3-14.
- Menzinger, W., 1965: Karyologische Untersuchungen an Arten und Formen der Gattung Botrytis Mich.. Archiv für Mikrobiologie 52, 178-196.
- Micheli, P.A., 1729: Botrytis 212 Tafel 91. Nova plantarum Genera Florentia
- Miller, G.L., 1959: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31, 426-428.
- Naudin, R., 1982: Incidence de la pourriture grise sur la récolte et sur les vins. Vignes et vins 312, 15-27.
- Nelson, N., 1944: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. of Biol. Chem. 153, 375-380.
- Neukom, H., 1960: Ueber Farbreaktionen von Uronsäuren mit Thiobarbitursäure. Chimia 14, 165-167.
- Northover, J., 1983: Segregation and parasitic fitness of isolates of Botrytis cinerea resistant to iprodione. Can. J. of Plant Pathol. 5, 215-302.
- Panayotakou, M. and N.E. Malathrakis, 1983: Resistance of Botrytis cinerea to dicarboximide fungicides in protected crops. Ann. appl. Biol. 102, 293-299.
- Pappas, A.C. and D.J. Fisher, 1979: A comparison of the mechanisms of action of vinclozolin, procymidone, iprodione and prochloraz against Botrytis cinerea. Pestic. Sci. 10, 239-246.
- Pappas, A.C., 1982: Inadequate control of grey mould on cyclamen by dicarboximide fungicides in Greece. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz 89, 52-58.

- Perkins, D.D., A. Radford, D. Newmeyer and M. Bjorkman, 1982: Chromosomal loci of Nerurospora crassa. *Microbiological Reviews* 46, 426-470.
- Persoon, D.H.C., 1801: *Synopsis methodica fungorum. Pars prima. Gottingae* 690-691.
- Punja, Z.K., J.S. Huang and S.F. Jenkins, 1985: Relationship of mycelial growth and production of oxalic acid and cell wall degrading enzymes to virulence in Sclerotium rolfsii. *Can. J. of Plant. Pathol.* 7, 109-117.
- Rajewsky, M.F., 1980: Specificity of DNA damage in chemical carcinogenesis. In: R. Montesano, H. Bartsch and L. Tomatis (Edts) *Molecular and cellular aspects of carcinogen screening tests*. Lyon, International agency for research on cancer. 41-54.
- Ribereau-Gayon, P., 1982: Incidences oenologiques de la pourriture du raisin. *Bull. OEPP* 12, 201-214.
- Ross, J.K., 1979: *Biology of the Fungi*. Mc Grow-Hill Book Company. 1-499.
- Schmidt, H., 1959: Die Thiobarbitursäurezahl als Mass für den Oxydationsgrad von Nahrungsfetten. *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 61, 127-133.
- Schüepp, H., 1974: Sind die "systemischen Fungizide" noch geeignet zur Bekämpfung der Graufäule im Rebbau ? *Schweiz. Z. Obst- u. Weinbau* 110, 330-332.
- Schüepp, H. und H.P. Lauber, 1977: Toleranz gegenüber MBC-Fungiziden bei Bortytis-Populationen in Rebbergen in Abhängigkeit von der Behandlungshäufigkeit. *Phytopath. Z.* 88, 362-368.
- Schüepp, H. und M. Küng, 1978: Gegenüber Dicarboximid-Fungiziden tolerante Stämme von Botrytis cinerea. *Ber. Schweiz. Bot. Ges.* 88, 63-71.
- Schüepp, H. and M. Küng, 1981: Stability of tolerance to MBC in populations of Botrytis cinerea in vineyards of northern and eastern Switzerland. *Can. J. Plant Pathol.* 3, 180-181.

- Schüepf, H., M. Küng et W. Siegfried, 1982: Développement des souches de Botrytis cinerea résistantes aux dicarboximides dans les vignes de la Suisse alémanique. Bull. OEPP 12, 157-161.
- Schüepf, H. und W. Siegfried; 1983: Die Traubenfäule 1982 und die teilweise ungenügenden Bekämpfungserfolge mit den Dicarboximid-Fungiziden. Schweiz. Z. Obst- u. Weinbau 119, 61-70.
- Sheir-Neiss, G., M.H. Lai and N.R. Morris, 1978: Identification of a gene for α -tubulin in Asperigillus nidulans. Cell 15, 639-649.
- Somogyi, M., 1951: Notes on sugar determination. J. Biol. Chemistry. 195, 19-23.
- Tronsmo, A. and A.M. Tronsmo, 1977: Biochemisrty of pathogenic growth of Botrytis cinerea in apple fruits. In: B. Solheim and J. Raa (Eds.): Cell wall biochemistry releated in host plant pathogen interactions. 263-266.
- Tronsmo, A., A.M. Tronsmo and J. Raa, 1977: Cytology and biochemistry of pathogenic growth of Botrytis cinerea Pers. in apple fruit. Phytopath. Z. 89, 208-215.
- Tuyl, J.M. van, 1977: Genetics of fungicide resistance. Mededelingen Landbouwhogeschool, Wageningen 77-2, 1-236.
- Urbanek, H. and J. Zalewska-Sobczak, 1975: Characterization of polygalacturonases of Botrytis cinerea E-200. Bull. de l'académie polonaise des sciences 23, 669-674.
- Urbanek, H., J. Zalewska-Sobczak, 1984: Multiplicity of cell wall degrading glycosidic hydrolases produced by apple infecting Botrytis cinerea. Phytopath. Z. 110, 261-271.
- Verhoeff, K. and J.I. Liem, 1978: Presence of endo-polygalacturonase in conidia of Botrytis cinerea before and during germination. Phytopath. Z. 91, 110-115.

Young, R.J. and M.E. Corden, 1964: Paper chromatography of galacturonic acid to determine polygalacturonase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 83, 124-126.

Zalewska-Sobczak, J. and H. Urbanek, 1975: Purification of polygalacturonases produced by Botrytis cinerea E-200. *Bull. de l'académie polonaise des sciences* 23, 663- 667.

Zalewska-Sobczak, J., H. Borecka and H. Urbanek, 1981: Comparison of pectinase, xylanase and acid protease activities of virulent and less virulent isolates of Botrytis cinerea. *Pytopath. Z.* 101, 222-227.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. E. Müller danke ich für die Ueberlassung des Themas, die gewährte Freizügigkeit bei dessen Bearbeitung , die materielle und ideelle Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. H. Schüepp für die Förderung und Beratung bei der Durchführung der Arbeit sowie für seine Bereitschaft zur Uebernahme des Korreferentes.

Herrn Dr. W. Müller sei als Direktor der Eidg. Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes gedankt.

Zudem möchte ich bei meinen Freund Renzo, allen Kollegen der Gruppe Mycologie des Mikrobiologischen Institutes der ETH Zürich, allen Mitarbeiter der Sektionen Pflanzenschutz, Chemie und Weinbau der Eidg. Forschungsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil für ihre moralische Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Kameradschaft herzlich bedanken.

LEBENS LAUF

Name : Martinetti
Vorname : Gladys
Tochter von : Bruno und Luce Martinetti
Geboren am : 21.Juli 1959 in Bellinzona TI

1965 - 1970 : Scuola elementare in Lodrino TI
1970 - 1975 : Ginnasio cantonale in Biasca TI
1978 - 1978 : Liceo cantonale in Bellinzona und Erhaltung der
Maturität Typ B
1978 - 1982 : Studium an der Eidgenössischen Technischen Hochschule
in Zürich, Abteilung Naturwissenschaften X Aa
1982 - 1986 : Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin des
Microbiologischen Institutes der ETH Zürich.
Die Dissertation wurde an der Eidg. Forschungsanstalt
für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil,
Abteilung Pythopathologie ausgeführt.