

**Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt  
für Land- und Forstwirtschaft  
Berlin-Dahlem**

Heft 166

Januar 1976



**Resistenzbildung gegen systemische Fungizide  
(Benzimidazolderivate) bei *Colletotrichum  
lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav.**

Von

**Dr. Ehler Meyer**

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft  
Institut für Gemüsekrankheiten  
Hürth-Fischenich  
und  
Technische Universität München  
Lehrstuhl für Phytopathologie  
Freising-Weihenstephan

Berlin 1976

*Herausgegeben  
von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft  
Berlin-Dahlem*

Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin und Hamburg  
D-1 Berlin 61 (W.-Germany), Lindenstraße 44-47

ISSN 0067-5849

ISBN 3-489-16600-0



Für die finanzielle Unterstützung der Untersuchungen sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn-Bad-Godesberg, vielmals gedankt.

Die vorliegende Arbeit wurde als Dissertation vom Fachbereich für Landwirtschaft und Gartenbau der Technischen Universität München genehmigt.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funk- sendung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Werden einzelne Vervielfältigungsstücke in dem nach § 54 Abs. 1 UrhG zulässigen Umfang für gewerbliche Zwecke hergestellt, ist an den Verlag die nach § 54 Abs. 2 UrhG zu zahlende Vergütung zu entrichten, die für jedes vervielfältigte Blatt 0,40 DM beträgt.

1976 Kommissionsverlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, D - 1000 Berlin 61, Linden- straße 44-47, Printed in Germany by Arno Brynda GmbH, 1 Berlin 62. Buchbinder: C.F. Walter, 1 Berlin 61.



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einführung und Problemstellung	7
2. Ausgangsmaterial	12
2.1. Herkünfte von <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	12
2.1.1. Verwendung differenzierter Rassen	13
2.1.2. Verwendung von Wildherkünften	14
2.1.3. Isolierungsverfahren	15
2.1.4. Kulturbedingungen in vitro	16
2.2. Charakterisierung der einbezogenen Fungizide	20
3. Zur Sensibilität der Erregerherkünfte	22
3.1. Verfahren zur Prüfung der Sensibilität	23
3.1.1. Fungizideinbringung in Nährböden und deren Beimpfung	23
3.1.2. Auswertungs- und Darstellungsverfahren	25
3.2. Wachstum auf Nährböden mit Fungizidzusatz	27
3.2.1. Morphologische Auswirkung des Fungizideinflusses	27
3.2.2. Untersuchungen zur Bestimmung des Wachstumsverlaufes und der ED <sub>50</sub> -Werte	31
3.2.3. Sensibilität verschiedener Erregerherkünfte gegen Fungizide	37
3.2.4. Nebenwirkungen von Formulierungsbestandteilen	46
4. Zur Resistenzbildung gegen Benzimidazolfungizide	48
4.1. Verfahren zur Erzielung von Resistenz	49
4.1.1. Wirkstoffsteigerungsverfahren	49
4.1.2. Massenauslese unter hohem Selektionsdruck	50
4.1.3. Mutagene UV-Behandlung	51
4.2. Ergebnisse	52
4.2.1. Resistenzbildung durch Wirkstoffsteigerung	52
4.2.2. Resistenzbildung durch Massenselektion aus der Mycelphase	57

	Seite
4.2.3. Resistenzbildung durch Massenselektion aus der Konidialphase mit und ohne Anwendung mutagener UV-Dosen	58
5. Charakterisierung der Fungizidresistenz	64
5.1. Zur Einstufung der Resistenz	64
5.2. Wuchseigenschaften resistenter Stämme	69
5.2.1. Mycelwachstum	69
5.2.2. Konidienbildung und -keimung	73
5.3. Stabilität der Resistenz	74
5.4. Beispiele für Gruppenresistenz	80
5.5. Verhalten gegen weitere Fungizide	83
6. Pathogenitätsprüfungen	84
6.1. Infektionsmethoden	84
6.2. Pathogenität und Rassendifferenzierung	88
6.2.1. Erregerherkünfte	89
6.2.2. Resistente Stämme	91
6.2.3. Verhalten nach Wirtspassagen	94
7. Auswirkung der Fungizidresistenz in vivo	95
7.1. Methoden der Fungizidapplikation	96
7.2. Fungizidnachweis in Pflanzenteilen	97
7.3. Befall fungizidbehandelter Pflanzen	100
8. Verhalten resistenter Stämme in Mischpopulationen	102
8.1. Prüfverfahren	102
8.2. Populationsveränderungen in Wirtspassagen	103
9. Diskussion	108
10. Zusammenfassung	118
11. Summary	121
12. Literaturübersicht	124

## 1. Einführung und Problemstellung

Die Idee, therapeutisch wirkende Substanzen als Pflanzenschutzmittel einzusetzen, reicht bis weit ins vorige Jahrhundert zurück, in eine Zeit, in der der Transport von Mineralsalzen in den Pflanzen näher erforscht wurde. Mitte der 30iger Jahr dieses Jahrhunderts begann eine rasche Entwicklung systemischer, fungizider Wirkstoffe (Antibiotika), wobei wesentliche Impulse von der Anwendung dieser Wirkstoffe in der Humanmedizin ausgingen. Die Entwicklung führte über die Sulfonamide (HASSE-BRAUCK, 1951, 1952 a, b) und die Antibiotika Penicillin (BROWN und BOYLE 1944) und Streptomycin (ANDERSON und NIENOW 1947) zu Hunderten von chemotherapeutischen, fungiziden Verbindungen.

Wegen ihrer teilweise nachteiligen Nebenwirkungen und nicht zuletzt wegen ihrer Produktionskosten konnten nur wenige Antibiotika wie etwa Griseofulvin (BRIAN 1960), Cycloheximid und neuerdings Blastocidin (MISATO 1970) Bedeutung als chemotherapeutische Fungizide zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten erlangen.

Ein weiterer Anstoß zur Entwicklung systemischer Fungizide ging von der Einführung insektizider Organophosphorverbindungen, zum Beispiel Metasystox(i) 1950 aus. Im Jahre 1960 wurde der systemische Wirkstoff Triamphos in die Praxis eingeführt, der sowohl insektizide wie auch fungizide Eigenschaften besitzt. Einen umfassenden Überblick über die historische Entwicklung chemotherapeutischer Fungizide geben WAIN und CARTER (1972).

Die heute weltweit eingesetzten systemischen Fungizide wurden etwa Mitte des vorigen Jahrzehnts entwickelt (VAN DER KERK 1969; ERWIN 1970; KIRBY 1972; CREMLYN 1973) und umfassen im wesentlichen folgende Wirkstoffgruppen:

- Benzimidazole
- Carboxanilide
- Pyrimidine
- Morpholine
- Piperazine

Die diesen Gruppen zugehörigen systemischen Fungizide haben

sich wegen ihrer vorteilhaften Anwendungsmöglichkeiten in erstaunlich kurzer Zeit breiten Eingang in die landwirtschaftliche und gärtnerische Praxis verschafft.

An die Entwicklung systemischer Wirkstoffe wurden hohe Erwartungen geknüpft, die die heutigen Fungizide nur zum Teil erfüllen können. Die Aufnahme der Wirkstoffe über Wurzeln und Blätter erlauben einen kurativen und eradikativen Einsatz insbesondere gegen tief in den pflanzlichen Geweben parasitierende Erreger, wie zum Beispiel im Tracheensystem parasitierende Pilze und Flugbrandpilze, die mit ektotherapeutischen Mitteln nicht erreichbar sind. Der über die lokale Ausbreitung hinausgehende Transport der Wirkstoffe im Transpirationsstrom des Xylems (apoplastische Weiterleitung) eröffnet die Möglichkeit, einen Schutz der oberirdischen Pflanzenteile durch Bodenapplikation oder Saatgutbeizung zu erzielen. Die toxikologisch meist unbedenklichen Wirkstoffe besitzen neben den genannten Vorteilen und einer ganzen Reihe weiterer positiver Anwendungsmöglichkeiten auch nachteilige Wirkungen. Beispielsweise findet durch den fehlenden Phloemtransport keine wesentliche Wirkstoffverlagerung in Organe mit geringer Transpiration (z.B. Früchte) statt. Außerdem resultiert aus dem Xylemtransport eine ungleichmäßige Wirkstoffverteilung mit starker Anreicherung an den Transpirationsendpunkten (Blattränder).

Die phylogenetisch enge Verwandtschaft zwischen höheren Pflanzen und phytopathogenen Pilzen bedingt einen sehr ähnlichen Metabolismus bei Wirt und Parasit, so daß die Aufnahme der meisten fungiziden Wirkstoffe in pflanzliche Zellen auch dort toxische Wirkungen zur Folge hat. Daher können nur Wirkstoffe Anwendung finden, die durch ihre sehr große Spezifität unter den Anwendungsverhältnissen im Konzentrationsbereich der fungiziden Wirkung noch keine phytotoxischen Schäden verursachen (SIJPESTEIJN 1970; POMMER 1971). Diese Spezifität wird bei den systemischen Wirkstoffen offenbar durch begrenzte Eingriffe in bestimmte Stoffwechselfvorgänge der Pilze erzielt. Damit ist ein deutlicher Unterschied zu den komplexen Wirkungsmechanismen der meisten konventionellen Fungizide gegeben.



Der Wirkungsmechanismus des den Benzimidazolderivaten, mit Ausnahme des Thiabendazols, zu Grunde liegenden 2-(Methoxycarbamoyl)-benzimidazols (MBC) beruht nach SISLER (1969) und CLEMONS und SISLER (1971) auf einer Unterbrechung der DNA-Synthese, die eine Folge der Bildung ungeeigneter Nucleotide aus den Molekülen des Wirkstoffs sein könnte. HASTIE (1970) vermutet ein Einwirken auf die Chromosomenteilung.

Nach GEORGOPOULOS und SISLER (1970) soll durch die Carboxanilidderivate des Elektronentransportsystem in der Atmungskette gestört werden. MATHRE (1971) fand vorwiegend die RNA-Synthese behindert. Auch in vielen weiteren Untersuchungen zu den Wirkungsmechanismen anderer systemischer Fungizide wird das spezifische Einwirken auf nur einzelne Funktionen sichtbar.

Als Folge derartiger Wirkungsmechanismen ergeben sich sehr enge oder doch zumindest differenzierte Wirkungsspektren. Die Fungizide Ethirimol und Dimethirimol aus der Gruppe der Pyrimidine zeigen ausschließlich Wirkung gegen Echte MehltauPilze (ELIAS et al. 1968; BEBBINGTON et al. 1969). Carboxanilide wirken im wesentlichen gegen Pilze aus der Klasse der Basidiomyceten (SNEL et al. 1970).

Die Fungizide aus der Gruppe der Benzimidazolderivate zeigen ein verhältnismäßig breites Wirkungsspektrum. Ascomyceten und Fungi imperfecti werden zum großen Teil, Basidiomyceten zum geringeren Teil erfaßt. Keine wesentliche Wirksamkeit ist gegen Phycomyceten gegeben (BOLLEN und FUCHS 1970; EDGINGTON et al. 1971). In der Spezifität der Wirkungsmechanismen und den dadurch bedingten differenzierten Wirkungsspektren unterscheiden sich die systemischen Fungizide kaum von Antibiotika, wie zum Beispiel Griseofulvin und Kasugamycin.

Das aus dem humanmedizinischen Anwendungsbereich bereits bekannte Auftreten einer Wirkstoffresistenz gegen Penicillin und Streptomycin (JAWETZ et al. 1963) setzte sich in einer analogen Entwicklung im phytomedizinischen Bereich fort. Genannt seien hier lediglich Fungizidresistenzbildungen gegen die Antibiotika Kasugamycin (OHMORI 1967), Antimycin A (LEBEN et al. 1955) und Cycloheximid (DUTTA und GARBER 1962). Bei den neueren, auf synthetischem Wege hergestellten, systemischen Fungiziden wurde erstmals 1968 die Bildung einer

Fungizidresistenz beobachtet.

SCHROEDER und PROVVIDENTI (1968, 1969) und NETZER und DISHON (1970) fanden eine Resistenzbildung von *Sphaerotheca fuliginea* bzw. *Erysiphe cichoracearum* an Gurken gegen das Benzimidazol-derivat Benomyl. Darüber hinaus wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeiten Resistenzerscheinungen von *Botrytis cinerea* und *Penicillium*-Arten gegen Benzimidazol-derivate (BOLLEN und SCHOLTEN 1971; BOLLEN 1971) und von *Sphaerotheca fuliginea* gegen Dimethirimol (BENT et al. 1971) bekannt. Das Auftreten fungizidresistenter Pilzstämme bereits innerhalb eines Anwendungsjahres (BENT et al. 1971) ließ einen Problemkreis erkennbar werden, der bei den konventionellen Fungiziden unbekannt war. Die Anwendung anorganischer Fungizide über viele Jahrzehnte und der weltweite Einsatz von Dithiocarbamaten über mehr als 30 Jahre brachten keine Resistenzbildung von praktischer Bedeutung zum Vorschein. Lediglich gegen aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen wie PCNB und Dicloran trat vereinzelt Resistenz auf (GEORGOPOULOS und ZARACOVITIS 1967; WEBSTER et al. 1970; LANKOW 1971; ESURUOSO und WOOD 1971). Ferner konnte Resistenz von *Venturia inaequalis* gegen Dodine (SZKOLNICK und GILPATRICK 1969) festgestellt werden.

Das Problem der Resistenzbildung gegen systemische Fungizide löste weltweit eine intensive Forschung aus. Dabei stand im Mittelpunkt die Frage, ob Resistenzerscheinungen grundsätzlich bei allen systemischen Fungiziden zu erwarten sind oder ob nur einzelne Wirkstoffe oder Wirkstoffgruppen betroffen sind. Da bisher nur bei einzelnen Pilzarten eine Resistenzbildung auftrat, stellt sich auch die Frage, inwieweit dieses auf besonders variable Pathogene begrenzt ist oder auch darüber hinausgeht. Im übrigen ist die Bedeutung der genetischen Variabilität und des Vermehrungspotentials der Organismen noch weitgehend unbekannt. Untersuchungen über die Resistenz gegen systemische Fungizide bei natürlichen Pilzpopulationen fehlen noch weitgehend, so daß bisher die Frage noch ungeklärt ist, ob sich Resistenz erst im Zuge vielfacher Applikationen bildet oder durch einen reinen Selektionsprozeß zutage tritt. Zum Problem der Permanenz von Fungizidresistenz liegen bisher praktisch keine Anhaltspunkte vor; es können lediglich Analogschlüsse aus dem Bereich der

Insektizide gezogen werden. In Zukunft wird die Industrie vor einer breiten Einführung neuer systemischer Fungizide eine Beurteilung der Resistenzsituation vornehmen müssen, wo bisher noch wesentliche Grundlagen fehlen.

Ziel dieser vorliegenden Untersuchungen war es, am Beispiel eines phytopathogenen Pilzes, bei dem bisher noch keine Resistenz festgestellt wurde, den Komplex der Resistenzbildung gegen Benzimidazolderivate zu bearbeiten und damit einen Beitrag zur Klärung einiger der oben aufgeworfenen Fragen zu leisten.

Der Erreger der Brennfleckenkrankheit an Bohnen, *Colletotrichum lindemuthianum*, vereinigt in dieser Hinsicht eine Reihe wesentlicher Vorteile in sich. Durch die saprophytische Phase dieses Pilzes werden in-vitro-Versuche zur Sensibilität und Resistenzbildung ermöglicht. Die leichte Handhabung von Infektionsversuchen begünstigt Gegenüberstellungen zwischen den in vitro gefundenen Ergebnissen zu den Verhältnissen in vivo. Das Vorhandensein definierter Rassen erlaubt die Auffindung möglicher Korrelationen zwischen Fungizidempfindlichkeit und pathophysiologischen Eigenschaften.

Zur Abklärung der aufgezeigten Problematik wurde das folgende Versuchsprogramm entwickelt: Ausgehend von definierten Rassen und einer größeren Zahl von Feldisolaten sollten Untersuchungen zu deren Fungizidempfindlichkeit aufzeigen, inwieweit hier bereits Anhaltspunkte für eine Resistenzbildung sichtbar werden und welche Kriterien für die Abgrenzung sensibler von resistenten Stämmen unter in-vitro-Verhältnissen möglich sind.

Längere Einwirkzeiten der Fungizide sowie mehrere Selektionsverfahren sollten Hinweise darauf geben, ob der Mechanismus der Resistenzbildung in einer physiologischen Adaptation liegt, wie dies für einige konventionelle Fungizide nachgewiesen wurde (WEBSTER 1970; LANKOW 1971; PARRY 1959) oder ob eine genetisch bedingte Resistenz möglich ist, wie Versuche zur Resistenzbildung gegen Antibiotika gezeigt haben.

Eine adaptive Resistenz erreicht selten eine hohe Effektivität und geht unter wirkstofffreien Verhältnissen rasch ver-

loren. Daher wurden Versuche zur Stabilität der Resistenz durchgeführt, wobei mehrere "Generationen" auf wirkstofffreien Nährböden zu erfolgen haben. Die Mutationsrate bezüglich Resistenz gegen systemische Fungizide ist zur Zeit noch weitgehend unbekannt, jedoch sehr bedeutungsvoll für die Beurteilung der Resistenzsituation überhaupt. Daher waren entsprechende Untersuchungen über die natürliche Entstehung von Resistenz gegen Benzimidazolderivate erforderlich. Darüber hinaus erschien es notwendig, durch Einfluß mutagener Agenzien die Möglichkeiten zur Beeinflussung der Mutationsrate zu erfassen.

Die Untersuchungen sollten zunächst auf MBC und Benomyl beschränkt bleiben. Im Anschluß war daher zu klären, wieweit die gewonnenen Ergebnisse in qualitativer und quantitativer Art auch auf andere Benzimidazolfungizide und weitere Wirkstoffgruppen auszudehnen sind. Wesentlich erschienen auch Beobachtungen über die Veränderung allgemeiner Wachstumsmerkmale verschiedener Stämme des Erregers im Zuge der Resistenzbildung. Entscheidend ist die Klärung der Frage, ob eine in vitro gewonnene Fungizidresistenz auch während der Erreger-Wirt-Interaktionen, d.h. in vivo zur Wirkung kommt.

Für die Beurteilung des Gesamtkomplexes und für die Ableitung von Perspektiven ist die Frage von besonderer Bedeutung, ob mit der Resistenzbildung eine Veränderung der Virulenz und des Rassencharakters verbunden ist. Im weiteren ist entscheidend, inwieweit durch Änderung der Reproduktionsrate die Überlebenschancen (Fitness) eingebüßt werden und ob die Konkurrenz mit natürlich vorkommenden sensiblen Stämmen bei Abwesenheit des Selektionsdruckes durch Fungizide beeinträchtigt ist.

## 2. Ausgangsmaterial

### 2.1. Herkünfte von Colletotrichum lindemuthianum

Wie einleitend erwähnt, wurde zur Bearbeitung der Versuchsfragen der Pilz *Colletotrichum lindemuthianum* herangezogen,

der weltweit in Buschbohnenkulturen eine bedeutende Rolle spielt.

Die Gattung *Colletotrichum* wird in der Systematik wegen des fehlenden Sexualzyklus zu den Fungi imperfecti gestellt und dort auf Grund der Bildung von Acervuli der Ordnung Melanconiales zugeordnet.

Nach von ARX (1957), der eine Neuordnung der Gattungen *Colletotrichum* und *Gloeosporium* vornahm, wird die frühere Unterscheidung anhand des Vorhandenseins oder Fehlens von Setae auf den Acervuli nicht aufrechterhalten. Als Charakteristikum für *Colletotrichum* wird die Bildung von Appressorien bei der Keimung der einzelligen Konidien angesehen.

*Colletotrichum lindemuthianum* wird als eine auf *Phaseolus* spezialisierte Art aufgefaßt, die sich auf Grund morphologischer Merkmale nicht von der Art *Colletotrichum gloeosporioides* unterscheidet. Als Unterscheidungsmerkmal zu anderen Arten wird einerseits das Fehlen von Sklerotien und Chlamydosporen und andererseits die Form und Größe der einzelligen Konidien benutzt. Nach Untersuchungen von STEPHAN (1966) zur Variabilität von *Colletotrichum gloeosporioides* können durch Anastomosenbildung und Kernwanderungen heterokaryotische Zustände im Mycel auftreten und parasexuelle Vorgänge möglich werden. Die Hyphenzellen dieses Pilzes sind überwiegend einkernig, auch die Konidien enthalten zu über 95 % einen haploiden Kern, so daß Einzelkonidialnachkommenschaften im Regelfall genetisch einheitlich sind.

#### 2.1.1. Verwendung differenzierter Rassen

Auf Grund intensiver züchterischer Bearbeitung der Bohnen wurde frühzeitig eine Rassenbildung von *Colletotrichum lindemuthianum* festgestellt und Resistenzzüchtung betrieben (BARRUS 1918; BURKHOLDER 1923; SCHREIBER 1932). Zusätzlich zu den seinerzeit beschriebenen Rassen (Alpha, Beta und Gamma) wurden in den Folgejahren weitere gefunden, die jeweils in der Lage waren, die in die Kultursorten eingekreuzte Resistenz gegen die vorher bekannten Rassen zu durch-

brechen. Genannt seien hier insbesondere die Rasse Delta (ANDRUS und WADE 1942) und die von HUBBELING\* 1959 gefundene Rasse Alpha-Mutante (Labda). Erst vor wenigen Jahren wurde eine neue, zunächst nach ihrem Auffindungsort benannte Rasse 'Ebnet' identifiziert (HOFFMANN et al. 1974). Diese ist in der Lage, die Resistenz der 'Cornell 49-242' gegen alle Rassen einschließlich Alpha-Mutante zu durchbrechen, die vielfach in neuere Buschbohnsensorten eingekreuzt wurde. Für Untersuchungen zur Fungizidresistenzbildung wurden Stämme der Rassen Alpha, Beta, Gamma, Delta und Alpha-Mutante vom Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz der TU Hannover zur Verfügung gestellt. Mit Ausnahme der Rasse 'Ebnet' handelt es sich um Isolierungen von HUBBELING. Diese Stämme wurden zunächst auf ihre Pathogenität auf einer anfälligen Buschbohnsensorte überprüft und Einzelkonidialkulturen der Reisolat in die Versuche einbezogen. Aus schreibtechnischen Gründen sind die Stämme im weiteren Verlauf wie folgt bezeichnet:

a/1	Alpha
b/1	Beta
c/1	Gamma
d/1	Delta
a-M/1	Alpha-Mutante
f/1	Rasse 'Ebnet'

### 2.1.2. Verwendung von Wildherkünften

Um die Untersuchungen auf eine genügend breite Basis stellen zu können, wurde von Saatgut des Jahres 1972 aus unterschiedlichen Anbaugebieten Isolate gewonnen. Von diesen wurden schließlich 14 verschiedenartige Herkünfte ausgewählt, um sie in die Versuche zur Sensibilität gegen Fungizide aufzunehmen (Tabelle 1).

Die Untersuchungen zur Einordnung dieser Isolate in das Rassensystem sind im Zusammenhang mit den Pathogenitätsprüfungen in Kapitel 6 dargestellt.

\* Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Wildherkünfte

Bez.	isoliert von Bohnensorte	angebaut in
C1/1	Saxa o.F.	Osnabrück
C2/1	Troketta o.F.	Italien
C3/1	Jupiter o.F.	Niederlande
C4/1	Kultursammlung/BBA *	-
C5/1	Wachs Superba	Fischenich/Köln
C6/1	Midas	Fischenich/Köln
C7/1	Simplo o.F.	Tansania
C8/1	White Marrow	Ebnet/Freiburg
C9/1	Michelite 62	Ebnet/Freiburg
C10/1	Emerson 51	Ebnet/Freiburg
C11/1	Fulgreen	Ebnet/Freiburg
C16/1	Blake	Ebnet/Freiburg
C17/1	Rodeo	Fischenich/Köln
C21/1	Frühe dickfl. Wachs	Griechenland

\* Institut für Mykologie der BBA, Berlin

### 2.1.3. Isolierungsverfahren

Die Isolierung der Erreger vom befallenen Saatgut wurde nach zwei verschiedenen Methoden vorgenommen.

Soweit ein starker Befall vorlag, der durch große dunkle, oft eingesunkene Flecke auf den Samen sichtbar wurde, konnte eine direkte Isolierung vorgenommen werden. Dazu wurden die Samen zum Teil für 2 Minuten zur oberflächlichen Sterilisation in 0,1 % Sublimat getaucht und anschließend in sterilem Wasser nachgespült. Die auf den Befallsflecken sekundär vorhandenen Bakterien und Pilze können weitgehend auch durch vorsichtiges Abziehen der Samenschale entfernt werden.

Die Samen werden zur Quellung und damit auch zur Anregung der Wachstumsvorgänge und insbesondere der Konidienbildung des Parasiten auf feuchtes Filterpapier in geschlossenen Glasgefäßen bei Zimmertemperatur ausgelegt. Nach wenigen Tagen können unter dem Binokular bei geringer Vergrößerung die typischen Acervuli vor allem anhand der gebildeten Setae be-

obachtet werden. Der aus ihnen zum Teil in großen Massen hervorquellende, schwach rötlich aussehende Konidienschleim kann meist bereits makroskopisch festgestellt werden.

Die zweite Methode hat sich bei einer Isolierung des Erregers von schwach befallenen Samen bewährt. Die Samen wurden relativ flach ausgesät und dem Erreger ebenso wie unter natürlichen Verhältnissen die Möglichkeit gegeben, während der Keimung auf das Hypokotyl überzugehen und hier nach der Streckung des Keimlings deutliche Befallsflecke hervorzurufen, auf denen insbesondere bei hoher relativer Luftfeuchte in großen Mengen Acervuli und Konidien gebildet werden.

Zur Isolierung wurde Konidienschleim mit der Impfnadel von den Befallsstellen entnommen, auf Nährböden ausgestrichen und das Isolat in mehreren Reinigungsschritten von Bakterien befreit. Für die Versuche wurden ausschließlich Einzelkonidialkulturen dieser Isolate benutzt, die durch Entnahme einzelner gekeimter Konidien nach Ausbreitung einer verdünnten Konidien suspension auf der Oberfläche von Nährböden gewonnen werden konnten.

#### 2.1.4. Kulturbedingungen in vitro

In Hinblick auf die angestrebten Untersuchungen zur quantitativen Erfassung der Fungizidwirkung in vitro mußten weitgehend optimale Wuchseigenschaften für *Colletotrichum lindemuthianum* geschaffen werden. Der Pilz wächst sowohl in belüfteten Nährlösungen wie auch meist oberflächlich in festen Agarnährböden. Für die Versuche wurden wegen der besseren Handhabung ausschließlich Nährböden, die in 9 cm-Polystyrol-Petrischalen gegossen wurden, verwandt.

Das Wachstum von *Colletotrichum lindemuthianum* auf Nährböden hängt wesentlich von der Zusammensetzung und dem pH-Wert des Substrates sowie den Temperaturverhältnissen ab.

#### Nährböden

Zur Auffindung geeigneter Nährböden wurde eine Überprüfung des Einflusses der Nährbodenzusammensetzung auf die Wachsraten durchgeführt. Folgende komplexe Nährböden wurden mit einigen Stämmen des Pilzes beimpft und das Wachstum beob-



achtet.

Potato-Dextrose-Agar	(PDA)
Biomalz-Agar	(BA)
Biomalz-Pepton-Agar	(BPA)
Glucose-Pepton-Agar	(GPA)
Hefeextrakt-Agar	(HA)

Dabei ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede in den Wachstumsraten. Lediglich bei Glucose-Pepton-Agar lag die Zuwachsrate etwas niedriger. Außerdem war bei diesem Nährboden die Hyphendichte und die Pigmentierung der Kolonien wesentlich geringer, die Acervulibildung und Konidienproduktion bei allen überprüften Stämmen aber wesentlich gesteigert, so daß dieser Nährboden in weiteren Versuchen benutzt wurde, wenn die Gewinnung von größeren Konidienmengen erforderlich war. Die Zusammensetzung dieses Nährbodens ist folgende:

Glucose-Pepton-Agar (GPA)

2,8 g Glucose  
 1,2 g  $MgSO_4 \times 7 H_2O$   
 2,7 g  $KH_2 PO_4$   
 2,0 g Pepton aus Casein  
 20,0 g Agar (Difco)

1000,0 ml Leitungswasser

Für alle weiteren Versuche wurde der Fertignährboden Potato-Dextrose-Agar (PDA) der Fa. Difco Laboratories benutzt. Auf diesem Nährboden erzielten die Stämme eine hohe Wachstumsrate, eine dichte Hyphen- und Luftmycelbildung sowie eine starke Pigmentierung. PDA hat besondere Eignung als Differentialnährboden.

pH-Wert

Der Einfluß des pH-Wertes des Nährmediums auf die Wachstumsrate ist im Bereich von pH 4,6 bis pH 7,0 gering. In einem Versuch mit den Stämmen c/1, d/1 und C6/1 auf PDA mit pH-Werten von 4,3, 5,6, 6,3 und 6,6 konnten nur bei dem niedrigsten pH-Wert von 4,3 um bis zu 10 % verringerte Wachsraten festgestellt werden. Wie pH-Messungen Mycelbewachsener Nährböden zeigten, erhöhten die Stämme im Laufe ihres Wachstums durch Ausscheidung und Aufnahme von Ionen den pH-Wert auf

Werte zwischen pH 6 und 7. Aus diesen Gründen wurden die durch ihre Zusammensetzung bedingten pH-Werte der Nährböden von pH 5,6 bei PDA und 5,4 bei GPA beibehalten.

Darüber hinaus mußte berücksichtigt werden, daß der Wirkstoff Benomyl sowohl in wässriger Suspension wie auch in Nährböden einem raschen Abbau in das ebenfalls fungitoxische 2-(Methoxy-carbamoyl)-benzimidazol (MBC) unterliegt (CLEMONS und SISLER 1969). Nach BARTELS-SCHOOLEY et al. (1971) tritt mit sinkendem pH-Wert eine Anlagerung von H-Ionen auf, so daß das MBC in steigendem Maße als Kation vorliegt und dadurch die Aufnahmefähigkeit ins Mycel verringert wird. Ähnliche Aufnahmeveränderungen bei niedrigen pH-Werten dürften auf Grund gleicher oder analoger Molekülstrukturen auch bei den übrigen Benzimidazolfungiziden zu erwarten sein.

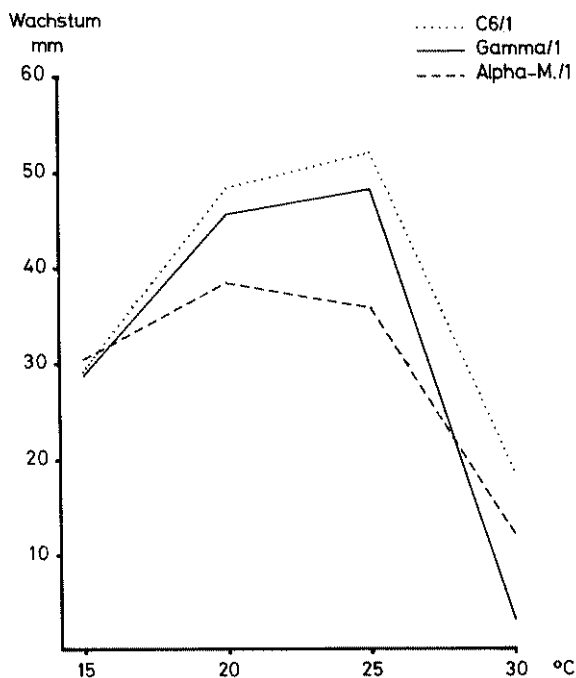
Nach eigenen Untersuchungen führte beim Benomyl erst eine pH-Absenkung unter pH 4,5 im Nährboden zu einer merklichen Wirkungsverminderung.

#### Temperatur

Nach Literaturberichten ist ein Temperaturoptimum für das Mycelwachstum im Bereich um 20°C zu erwarten. MERCER et al. (1974) benutzten für in vitro-Kulturen 22<sup>±</sup> 3°C.

In eigenen Versuchen wurden 3 Stämme in Petrischalen auf PDA-Nährböden angeimpft und bei 15, 20, 25 und 30°C in Dunkelheit kultiviert und im Abstand von 2 Tagen das Kolonienwachstum gemessen. Der Kolonienzuwachs in Abhängigkeit von der Temperatur ist in Abb. 1 dargestellt.

Bei Alpha-M./1 liegt das Optimum näher an 20°C, bei Gamma/1 und C6/1 näher an 25°C. Über 25°C hinaus erfolgt ein starker Abfall in der Wachstumsrate. Im niedrigen Temperaturbereich erfolgt ein langsames Absinken der Zuwachsrate. Durch Interpolation der Optimumkurven ergeben sich größte Wachstumsraten in vitro bei 22 bis 24°C.



**Abb. 1:** Mittleres Kolonienwachstum nach 10 Tagen in Abhängigkeit von der Temperatur bei 3 Herkünften von *Colletotrichum lindemuthianum*

Alle quantitativen Versuche wurden bei 23°C durchgeführt, weil davon ausgegangen werden kann, daß die relative Reduktion des Kolonienwachstums durch Fungizideinwirkung am stärksten bei optimalen Temperaturen zur Ausprägung kommt.

#### Lichteinfluß

Ein Lichteinfluß auf das Hyphenwachstum und damit auf den Kolonienzuwachs sowie auf die Konidienbildung konnte in eigenen Versuchen nicht nachgewiesen werden. Jedoch zeigt sich in den Kolonien einiger Stämme ein Tag-Nacht-Rhythmus in Form von schmalen, zentrischen Ringen durch die unterschiedliche Ausprägung der Luftmycel- und Pigmentbildung.

## 2.2. Charakterisierung der einbezogenen Fungizide

Die Entwicklung der Benzimidazolfungizide begann 1964 mit dem als Anthelminthikum schon länger bekannten Wirkstoff Thiabendazol, über dessen systemische Wirksamkeit gegen *Cercospora beticola* STARON und ALLARD (1964) berichteten. In den folgenden Jahren wurden die Fungizide Fuberidazol, DuPont Benomyl, Cercobin, Cercobin M, Bavistin, Folcidin und Derosal entwickelt.

In der Bundesrepublik werden die Fungizide Benomyl, Cercobin M und Derosal vornehmlich zur Bekämpfung von *Botrytis cinerea* und Echten Mehltaupilzen im Gemüse-, Obst-, Wein- und Zierpflanzenbau und von Apfelschorf sowie der Halmbruchkrankheit im Getreidebau eingesetzt. Fuberidazol wird ausschließlich als Komponente von Getreidebeizmitteln zur Bekämpfung von Weizensteinbrand und Schneeschimmel benutzt. Thiabendazol findet derzeit Anwendung gegen *Botrytis cinerea* an Zierpflanzen und zur Nacherntebehandlung von Blumenzwiebeln und -knollen. Das Fungizid Folcidin befindet sich im Entwicklungsstadium. Die in diesen Untersuchungen benutzten Benzimidazolfungizide und die zu Vergleichszwecken einbezogenen Fungizide Calixin, Euparen und Orthocid sind nachfolgend in Tabelle 2 mit den verwendeten Formulierungen, dem Common name, ihrer chemischen Bezeichnung des Wirkstoffs und der Herstellerfirma aufgeführt.

Die Fungizide Bavistin und Derosal enthalten in unterschiedlichen Formulierungen den Wirkstoff Carbendazim, der in der Literatur nach der Abkürzung der englischen Wirkstoffbezeichnung meist als MBC (Methyl-benzimidazol-2-yl-carbamate) bezeichnet wird. Der Wirkstoff Benomyl hydrolysiert in wässriger Lösung in wenigen Tagen unter Abspaltung des Butyl-carbamoyl-Restes in MBC (CLEMONS und SISLER 1969; PETERSON und EDGINGTON 1969). In Pflanzen wurde nach Benomylanwendung ausschließlich MBC gefunden (GRAY und SINCLAIR 1970). Es muß daher angenommen werden, daß die Wirksamkeit des Benomyls zumindest teilweise auf MBC beruht. Ähnliche Verhältnisse liegen beim Thiophanate M vor. Hier kann unter Sonnenbestrahlung eine intramolekulare Umlagerung ebenfalls zum fungitoxischen

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Fungizide

Handelsname	Formulierung	Common name	Chemische Bezeichnung	Hersteller
Bavistin	50 % WP	Carbendazim	2-(Methoxy-carbamoyl)-benzimidazol	BASF AG
Derosal	60 % WP	Carbendazim	2-(Methoxy-carbamoyl)-benzimidazol	Farbwerke Hoechst AG
DuPont Benomyl	50 % WP	Benomyl	Methyl-1-(butylcarbamoyl)-2- benzimidazolcarbamat	DuPont de Nemours & Co.
-	50 % WP	Folcidin	1-(5-Cyan-pentyl-carbamoyl)-2- methoxycarbonylamino)benzimidazol	Bayer AG
Tecto 60	427 g/l FL	Thiabendazol	2-(4-Thiazolyl)-benzimidazol	Merck Chemical Division
Cercobin M	70 % WP	Thiophanate M	1,2-Bis (3-methoxycarbonyl-2- thioureido)benzol	Nippon Soda Company Ltd.
Calixin	750 g/l EC	Tridemorph	N-tridecyl-2,6-dimethyl-morpholine	BASF AG
Euparen	50 % WP	Dichlo- fluanid	N-(dichlor-fluor-methyl)-thio)-N', N'-dimethyl-N-phenyl-schwefelsäure- diamid	Bayer AG
Orthocid	83 % WP	Captan	N -(trichlormethylthio)-4-cyclo- hexan-1,2-dicarboximid	California Chemical Company

Wirkstoff MBC führen (GROSSMANN et al. 1973). Polcidin, eine in der Molekülstruktur dem Benomyl sehr ähnliche Verbindung, wird in wässrigen Lösungen nach KIRKPATRICK und SINCLAIR (1973) ebenfalls in ein fungitoxisches Hydrolyseprodukt umgewandelt. Thiabendazol ist nach Untersuchungen von GRAY und SINCLAIR (1971) und BUCHENAUER und ERWIN (1971) ebenso wie MBC (SIMS et al. 1969) sehr stabil.

Hinweise dazu, wie diese genannten chemischen Umwandlungsprozesse zu MBC wirkungsmäßig zum Tragen kommen, können die Untersuchungen zur Sensibilität der Erregerherkünfte aufzeigen.

### 3. Zur Sensibilität der Erregerherkünfte

Eine Voraussetzung für Untersuchungen zur Resistenzbildung ist die Abklärung der Verhaltensweise der normalempfindlichen Erregerherkünfte in Gegenwart der Wirkstoffe. Die Fungizidwirkung kann in einer spezifischen Beeinträchtigung einzelner Funktionen des Pilzes begründet sein, die sich zum Beispiel in fehlender Konidienkeimung, Verhinderung der Appressorien- oder Fruchtkörperbildung äußern. Im allgemeinen führt eine steigende Fungiziddosis in einem subletalen Bereich zu einer steigenden Hemmung der Wachstumsvorgänge, die bis zu einer vollständigen irreversiblen Inaktivierung der Organismen reicht.

Durch Einmischung der Fungizide in die verflüssigten Nährmedien können die Einwirkungsverhältnisse, wie sie in vivo vorliegen, simuliert werden, soweit keine spezifische Beeinflussung der Fungizidwirksamkeit durch den Metabolismus der Wirtspflanze gegeben ist und keine Veränderung der Fungizidverträglichkeit der Erreger unter den andersartigen Ernährungsverhältnissen in vivo vorliegt.

### 3.1. Verfahren zur Prüfung der Sensibilität

Zur Bewertung der Fungizidwirkung werden in der Regel diejenigen Konzentrationen bestimmt, bei welchen genau erfassbare Auswirkungen beobachtet werden können, wie zum Beispiel das Ausbleiben der Konidienkeimung. Wegen der biologischen Variabilität der Organismen äußern sich diese "Ereignisse" nicht bei einer Grenzkonzentration, sondern über einen Konzentrationsbereich in einer charakteristischen Verteilung.

In Analogie zur Konidienkeimhemmung äußert sich die biologische Variabilität bei einem wachsenden Pilzthallus darin, daß mit steigender Konzentration des Wirkstoffes immer weniger Hyphen in der Lage sind, ihr Wachstum fortzusetzen. Dadurch wird eine steigende Wachstumshemmung der Kolonie sichtbar, die gut zu erfassen ist und in diesen Untersuchungen im wesentlichen als Maßstab zur Beurteilung der Fungizidwirkung bzw. zur Bestimmung der Sensibilität der Pilzstämmen benutzt wurde.

#### 3.1.1. Fungizideinbringung in Nährböden und deren Beimpfung

Um den Pilz während seines Wachstums mit bestimmten Wirkstoffkonzentrationen in Kontakt zu bringen, bietet sich die Einmischung der Fungizide in den Nährbodenansatz an. Dabei wurde von handelsüblichen Formulierungen ausgegangen, da reine Wirkstoffe nicht in allen Fällen verfügbar waren und diese wegen ihrer geringen Löslichkeit in Wasser nicht ohne organische Lösungsmittel dem Nährboden beigemischt werden konnten. Die Wirkstoffe sind meist als Spritzpulver (WP) oder als Emulsionskonzentrate (EC) formuliert. Sie enthalten neben Wirk- und Füllstoffen auch suspendierende und emulgierende Substanzen, die in ihrer Wirksamkeit so ausgelegt sind, daß sie bei den zugelassenen Anwendungskonzentrationen für eine optimale Verteilung der Wirkstoffe in der Spritzbrühe sorgen. Diese Funktion wirkt sich auch positiv bei der Einmischung der Fungizide im Nährboden aus, da letzteres ein ebenfalls hydrophiles Medium darstellt.

Es kann davon ausgegangen werden, daß die Fungitoxizität der Formulierungsbeistoffe wesentlich geringer ist als die der Wirkstoffe. Der Einfluß der Formulierungsbestandteile bei höherer Wirkstoffdosierung wurde in Versuchen mit Leerformulierungen erfaßt.

Bei der Einmischung mußte weiterhin berücksichtigt werden, daß Suspensionspulver und Emulsionskonzentrate einerseits nicht steril sind und andererseits die Wirkstoffe meist nicht so thermostabil sind, daß sie mit dem Nährbodenansatz autoklaviert werden können. Auch ist eine Sterilisierung des Fungizidansatzes durch entsprechende Filtration meist nicht möglich, da die ungelösten Bestandteile der Suspensionspulver die Filter nicht passieren können.

Aus diesen Schwierigkeiten heraus wurden geringe Bakterienkeimzahlen in den Formulierungen hingenommen und die Fungizide unter weitgehend sterilen Verhältnissen in sterilisiertem Wasser suspendiert. Den um eine entsprechende Wassermenge reduzierten Nährbodenansätzen wurde nach Abkühlung auf etwa 45°C ein Aliquot der Suspension zugesetzt. Dabei wurden die Fungizidsuspensionen in der Regel als 10fache Dosierungen angesetzt, so daß durch Vermischung von 1/10 Volumen Suspension mit 9/10 Volumen Wasseraufwandmenge im Nährbodenansatz die gewünschte Konzentration sowohl des Wirkstoffs wie auch der Nährstoffe erzielt werden konnte. Soweit sehr geringe Wirkstoffkonzentrationen erforderlich waren, wurde wegen des größeren Meßfehlers beim Abwägen kleiner Mengen von höheren Fungizidkonzentrationen ausgegangen und eine entsprechende Verdünnungsreihe hergestellt.

Alle im weiteren Text gemachten Konzentrationsangaben beziehen sich unter Berücksichtigung der Gehalte der Formulierungen jeweils auf die Wirkstoffmengen in den Substraten.

Ausgangspunkte für eine Kolonienbildung des Pilzes auf den Nährböden können einzelne oder mehrere Konidien, Hyphenstücke oder größere Mycelteile sein. Jeweils erfolgt eine Thallusbildung durch radiales Hyphenwachstum auf und im Nährboden, so daß in der Regel kreisförmige Kolonien entstehen. Um eine jeweils gleichartige Ausgangssituation zu



gewährleisten und wegen der technisch einfachen Handhabung wurde von mycelbewachsenen Agarscheiben ausgegangen. Diese wurden nach dem Ausstanzen mit einem sterilisierten Korkbohrer von 5 mm Durchmesser aus dem Kolonienrand etwa 8 Tage alter Kulturen entnommen und zentral auf die Nährböden der zu beimpfenden Petrischalen mit ihrer Oberseite nach unten aufgelegt.

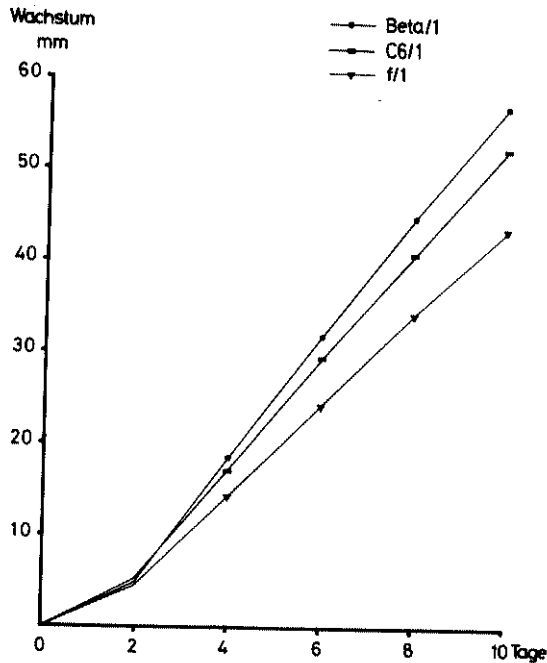
### 3.1.2. Auswertungs- und Darstellungsverfahren

Als leicht erfaßbare Größe für die Bewertung des Pilzwachstums wurde der Zuwachs im Koloniedurchmesser in bestimmten Zeitabschnitten ausgewählt. Innerhalb bestimmter Grenzen kann eine konstante Zuwachsrate erwartet werden. Andere Parameter wie z.B. die Kolonienfläche müssen unter diesen Bedingungen eine annähernd quadratische Zunahme aufweisen.

Nach der Beimpfung der Platten erfolgt nach einer Anwuchsphase eine lineare Zunahme der Koloniedurchmesser bis der Schalenrand erreicht ist, wie Abb. 2 zeigt. Dabei tritt ein dichtes Hyphenwachstum im wesentlichen auf der Oberfläche bzw. dicht unter der Oberfläche auf, so daß die Kolonienausbreitung mit der Mycelmassenzunahme im wesentlichen parallel läuft.

Reduziert ein Wachstumsfaktor die Zuwachsrate, so steigen im Laufe der Zeit die absoluten Differenzen zum Koloniedurchmesser der Kontrolle ständig an. Daher wurde zur quantitativen Auswertung die Wachstumsdauer benutzt, nach welcher die am stärksten wachsenden Stämme bei Temperaturen von 23°C den Schalenrand erreichen. Dies ist nach etwa 10 Tagen der Fall.

Es wurde jeweils der größte und kleinste Koloniedurchmesser erfaßt und daraus der Mittelwert gebildet. Es waren meist nur geringe Abweichungen von der gleichmäßig radialen Ausbreitung der Kolonien gegeben. Die Mittelwertbildung aus drei Kolonien ergibt eine ausreichende Genauigkeit in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.



**Abb. 2:** Zeitlicher Verlauf des mittleren Kolonienwachstums bei 3 Herkünften von *Colletotrichum lindemuthianum*

Die Sensibilität bzw. Resistenz von Pilzstämmen gegen toxische oder fungistatische Wirkstoffe konnte durch Angabe des wirksamen Konzentrationsbereiches oder deren  $ED_{50}$ -Wert gekennzeichnet werden. Die  $ED_{50}$ -Werte bezeichnen die Konzentrationen, bei denen eine 50 %ige Wachstumsreduktion erreicht ist. Sie wurden durch Interpolation aus den Dosis-Effekt-Kurven bestimmt. Diese läßt sich dann am günstigsten durchführen, wenn eine mathematische Transformation zu einer Geraden möglich ist, weil diese bereits durch 2 Meßpunkte festgelegt ist. Die Dosis-Effekt-Kurven nehmen im allgemeinen in der linearen Abhängigkeit der Wachstumsraten von der Fungizidkonzentration einen S-förmigen Verlauf an und gehen bei logarithmischer Einteilung der Dosis in sogenannte Schulterkurven über. Eine weitere Transformierung der relativen Wachstumshemmung in Probits führt nach den

theoretischen Vorstellungen (WEBER 1957) annähernd zu einer Geraden.

Neben einem exakten Maß für die Sensibilität in Form von ED<sub>50</sub>-Werten wurden vergleichende Untersuchungen über die Wachstumshemmung bei Konzentrationen im Bereich der ED<sub>50</sub>-Werte vorgenommen, um Aufschluß über die Streubreite der Sensibilität der Ausgangsstämme zu erhalten.

### 3.2. Wachstum auf Nährböden mit Fungizidzusatz

#### 3.2.1. Morphologische Auswirkung des Fungizideinflusses

Die erste makroskopisch sichtbare Auswirkung des Fungizideinflusses auf das Kolonienwachstum besteht in der Reduzierung der Wachstumsrate. Die mikroskopische Beobachtung zeigt, daß unter dem Einfluß der Benzimidazolfungizide im Nährboden durch die verringerten Wuchsraten insbesondere der Spitzenhyphen die Hyphenverzweigungen deutlich dichter aufeinanderfolgen.

Mit steigenden Konzentrationen nehmen Hyphenverkrümmungen und korkenzieherartige Hyphenverdrehungen rasch zu. Daneben treten Hyphendeformationen durch örtliche Lumenerweiterungen, besonders auch an den Hyphenspitzen auf. Abb. 3 und 4 zeigen das Hyphenwachstum im Kolonienrand mit und ohne MBC im Nährboden.

Neben der Wachstumshemmung konnten spezifische Wirkungen auf bestimmte Organe des Pilzes im Rahmen der Versuche zur Sensibilität nicht beobachtet werden. Die Acervuli- und Konidienbildung war nach mikroskopischer Beobachtung jeweils nur in Relation zur Wachstumshemmung verringert.

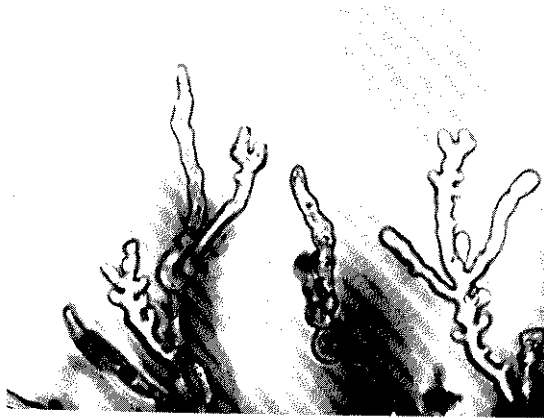


Abb. 3: Hyphenwachstum des Stammes f/1 von *Colletotrichum lindemuthianum* bei 0,5 mg MBC/l in PDA



Abb. 4: Hyphenwachstum des Stammes f/1 von *Colletotrichum lindemuthianum* auf PDA ohne Fungizidzusatz

Die Konidienkeimung verläuft unter Einfluß von Benzimidazol-fungiziden auf Nährbodenoberflächen deutlich gestört. Über einen weiten Konzentrationsbereich tritt beim größten Teil der keimfähigen Konidien eine charakteristische Vergrößerung ihres Ausgangsvolumens auf ein Mehrfaches ein. Einige Konidien sind in der Lage, einen kurzen Keimschlauch zu bilden, dessen weiteres Längenwachstum jedoch begrenzt wird. Auch hier tritt eine überdimensionale Volumenzunahme ein.

Deutlich voneinander unterscheidbare Verhaltensweisen gegen die verschiedenen Benzimidazolfungizide wurden nicht gefunden. Zwischen den geprüften Stämmen bestehen hinsichtlich des Verhältnisses ihrer Reaktionen deutliche Unterschiede. Die Konidien einiger Stämme erreichen nur zu einem geringen Anteil eine Keimschlauchbildung. Andere Stämme zeigen zwar eine hohe Keimrate, aber nur ein stark behindertes Längenwachstum der Keimschläuche. Dieses Konidienkeimverhalten verändert sich in Abhängigkeit von der Fungizidkonzentration auch im Bereich hoher Wirkstoffmengen von etwa 1 mg Wirkstoff/l bis über 100 mg/l nicht. Im niedrigen Konzentrationsbereich nimmt mit sinkender Konzentration die Zahl der nach der Keimschlauchbildung mit steigenden Wuchsraten weiterwachsende Konidien zu. Infolge des kontinuierlichen Überganges zur normalen Keimreaktion ist eine quantitative Bestimmung der Sensibilität der Stämme anhand ihres Keimverhaltens nicht möglich.

Die Abb. 5 und 6 stellen als Beispiel die Keimungsverhältnisse beim Stamm f/1 mit und ohne Fungizideinwirkung dar.

Der Anteil der sich unter Fungizideinfluß durch Auskeimung oder Volumenzunahme verändernden Konidien entspricht etwa dem keimfähigen Anteil unter wirkstofffreien Bedingungen, so daß eine völlige Inaktivierung von Konidien durch den Einfluß der Benzimidazolfungizide nicht gegeben ist. Dieses Keimverhalten gegen Fungizide auf Benzimidazolbasis steht in deutlichem Gegensatz zum Verhalten gegen das nicht systemische Fungizid Dichlofluanid. Bei diesem Wirkstoff trat schon bei sehr geringen Konzentrationen von 0,1 mg/l eine vollständige Inaktivierung der Konidien ein; Keimungs-

prozesse wurden mikroskopisch nicht sichtbar.

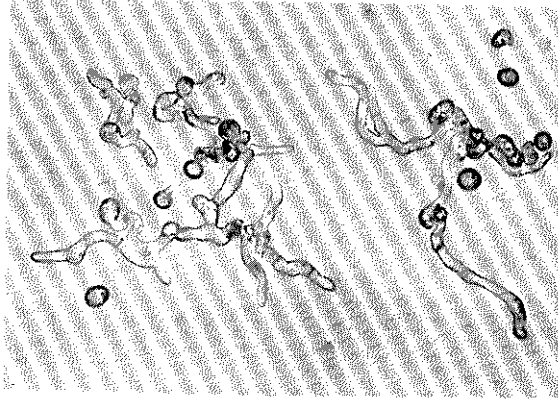


Abb. 5: Konidienkeimung des Stammes f/1 von *Colletotrichum lindemuthianum* nach 24 Stunden bei 0,5 mg MBC/l in PDA

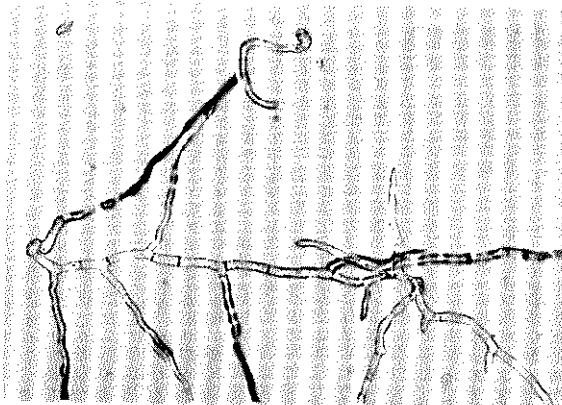


Abb. 6: Konidienkeimung des Stammes f/1 von *Colletotrichum lindemuthianum* nach 24 Stunden auf PDA ohne Fungizidzusatz

### 3.2.2. Untersuchungen zur Bestimmung des Wachstumsverlaufes und der ED<sub>50</sub>-Werte

Zur Erfassung der wirksamen Konzentrationen wurde eine Auswahl von Erregerherkünften auf Wirkstoffkonzentrationen von 0,5; 1,0; 10 und 100 mg Wirkstoff/l der Fungizide angeimpft und das Kolonienwachstum nach 10 Tagen gemessen.

Zunächst dienten diese stichprobenartigen Messungen bei einzelnen, über einen weiten Konzentrationsbereich verteilten Wirkstoffanwendungen nur zur Orientierung über die vorliegenden Verhältnisse.

Alle Benzimidazolfungizide konnten bereits im niedrigen Konzentrationsbereich das Wachstum stark reduzieren. Die ED<sub>50</sub>-Werte lagen in jedem Falle unter 0,5 mg Wirkstoff/l. Bei dem zum Vergleich herangezogenen Wirkstoff Tridemorph sind zwischen den Erregerherkünften deutlich unterschiedliche Reaktionen vorhanden, die zunächst keine eindeutige Aussage erlauben. Bei den Vergleichsfungiziden Dichlofluanid und Captan liegen die geschätzten ED<sub>50</sub>-Werte über 1 mg bzw. 10 mg Wirkstoff/l. Nach diesen Ergebnissen konnte bezüglich der abgeschätzten ED<sub>50</sub>-Werte eine Gruppenbildung der Fungizide nach ihrer Wirksamkeit gegen *Colletotrichum lindemuthianum* vorgenommen werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Fungitoxizität einiger Fungizide gegen verschiedene Herkünfte von *Colletotrichum lindemuthianum* in vitro

ED<sub>50</sub>-Werte (mg/l):

kleiner als 0,5: Carbendazim (MBC), Benomyl, Folcidin,  
Thiophanate M, Thiabendazol, Tridemorph;  
1,0 bis 10,0: Tridemorph, Dichlofluanid;  
10 bis 100: Captan;

Im Anschluß an diese Voruntersuchungen wurden weitere Versuche zur Ermittlung exakter ED<sub>50</sub>-Werte bei engeren Konzentrationsabstufungen bei den Fungiziden MBC, Benomyl, Thiabendazol, Tridemorph, Dichlofluanid und Captan vorgenommen.

Aus diesen Dosis-Effekt-Untersuchungen im Bereich der wirksamen Konzentrationen konnten auch charakteristische Eigenschaften einzelner Stämme erkannt werden.

Die Ergebnisse einiger, besonders in ihrer Reaktion abweichender Stämme gegen den Wirkstoff MBC sind nach Transformation der Konzentration in logarithmische Einteilung in Abb. 7 und zusätzlicher Transformation des relativen Wachstums in Probits in Abb. 8 wiedergegeben.

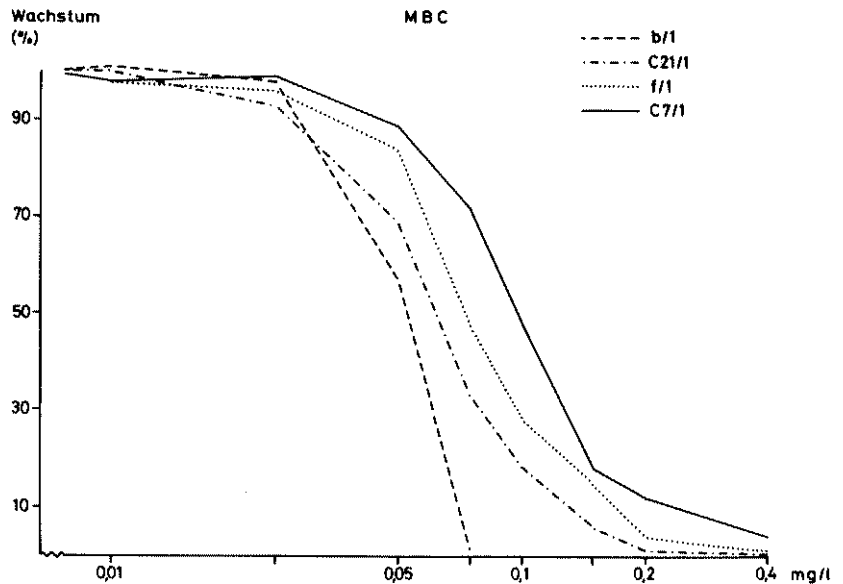
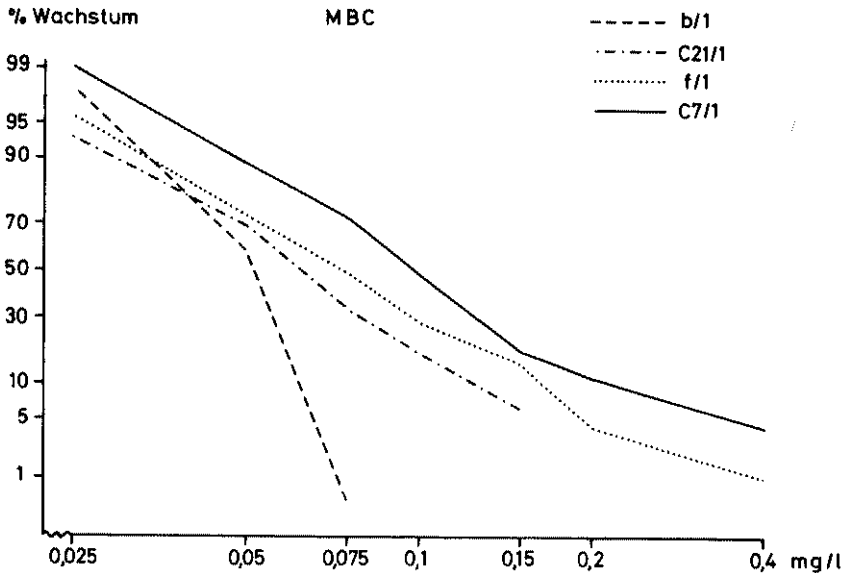


Abb. 7: Wachstumsraten (linear) verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* auf steigenden MBC-Konzentrationen (logarithmisch) in PDA

Aus beiden Darstellungsweisen wurden durch Interpolation  $ED_{50}$ -Werte gegen MBC im Bereich von 0,05 bis 0,10 mg Wirkstoff/l ermittelt. Aus entsprechenden, im Kurvenverlauf ähnlichen Darstellungen wurden gegen Benomyl Werte von 0,05 bis 0,15 mg und gegen Thiabendazol von 0,1 bis 0,6 mg Wirkstoff/l bestimmt.



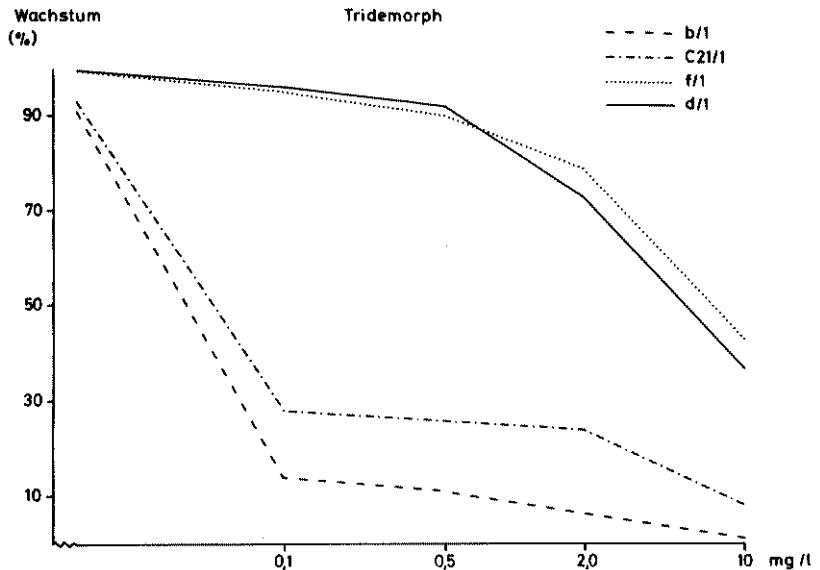


**Abb. 8:** Wachstumsraten (Probit) verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* auf steigenden MBC-Konzentrationen (logarithmisch) in PDA

In diesen Untersuchungen zeigte sich über die unterschiedlichen  $ED_{50}$ -Werte hinaus eine grundsätzlich verschiedene Reaktion zwischen den Erregerherkünften. Bei den Stämmen b/1, C1/1, C5/1, C6/1 und C17/1 führten steigende Fungizidkonzentrationen in den Nährböden zu einer kompletten Wachstumshemmung, während bei allen weiteren Ausgangsstämmen auch bei extrem hohen Wirkstoffkonzentrationen zwar eine sehr starke, jedoch keine völlige Wachstumsdepression auftrat. Die Wachstumshemmung bei den oben genannten Stämmen bei Konzentrationen über 0,1 mg MBC/l ist bei Übertragung der aufgeimpften Mycelteile auf fungizidfreie Nährböden nicht irreversibel.

Gegen den systemischen Wirkstoff Tridemorph verhielten sich die Stämme von *Colletotrichum lindemuthianum* extrem unterschiedlich. Dosis-Effekt-Kurven sind über den Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 mg Wirkstoff/l bei einigen Herkünften

in Abb. 9 dargestellt.



**Abb. 9:** Wachstumsraten (linear) verschiedener Herkunft von *C. lindemuthianum* auf steigenden Tridemorph-Konzentrationen (logarithmisch) in PDA

Bei den Stämmen b/1 und C21/1 wird bereits bei 0,1 mg/l ein sehr hoher Hemmungsgrad erreicht, der sich mit steigender Konzentration zunächst kaum ändert. Bei den Stämmen f/1 und d/1 findet über den genannten Konzentrationsbereich nur eine geringe, kontinuierlich verlaufende Wachstumsreduzierung statt. Sie setzte sich jenseits des in der Abbildung dargestellten Bereiches fort und erreichte ihr Maximum (Zuwachsrate 0) bei 100 mg/l. Die  $ED_{50}$ -Werte liegen bei den Stämmen b/1 und C21/1 im Bereich um 0,1 mg Wirkstoff/l und bei den Stämmen d/1 und f/1 bei etwa 10 mg Wirkstoff/l. Sie unterscheiden sich also um den Faktor 100.

Gegen die nicht systemischen Wirkstoffe Dichlofluanid und Captan ergaben sich bei den einzelnen Erregerstämmen etwa gleichartig verlaufende Dosis-Effekt-Kurven. In den Abbil-

dungen 10 und 11 sind einige Stämme in ihrer Reaktion dargestellt.

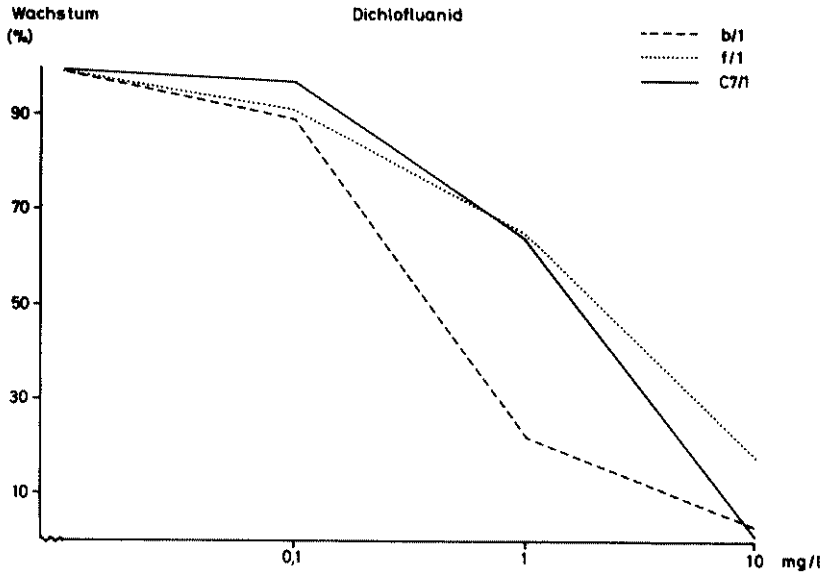
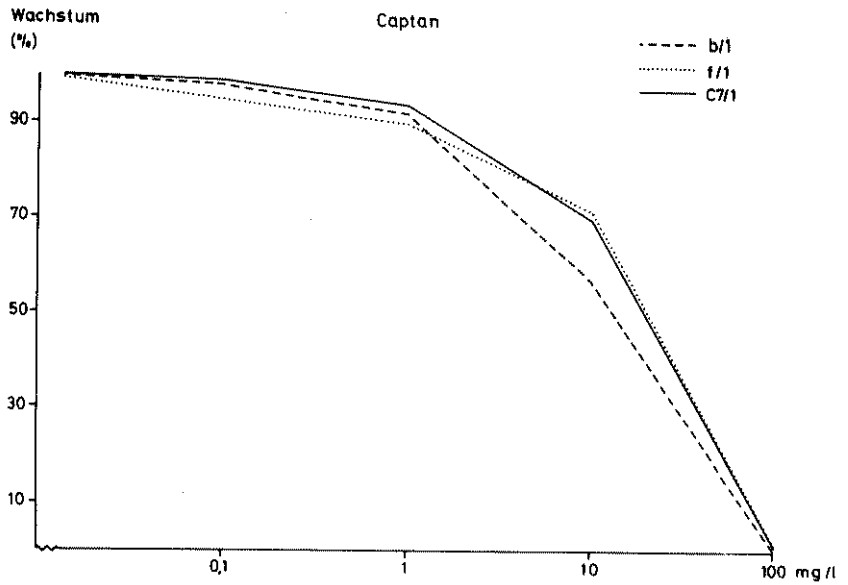


Abb. 10: Wachstumsraten (linear) verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* auf steigenden Dichlofluanid-Konzentrationen (logarithmisch) in PDA

Lediglich gegen Dichlofluanid zeigte der Stamm b/1 merklich höhere Sensibilität als alle übrigen Stämme. Bei über 100 mg Wirkstoff/l trat bei allen Stämmen gegen beide Fungizide eine vollständige, nicht reversible Wachstumshemmung auf.



**Abb. 11:** Wachstumsraten (linear) verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* auf steigenden Captan-Konzentrationen (logarithmisch) in PDA

### 3.2.3. Sensibilität verschiedener Erregerherkünfte gegen Fungizide

Aus den Dosis-Effekt-Kurven ergaben sich die größten Unterschiede bezüglich der Sensibilität zwischen den Herkünften im Bereich der  $ED_{50}$ -Werte. Es erschien daher notwendig, vergleichende Untersuchungen zwischen verschiedenen Fungiziden bei einer größeren Anzahl von Erregerherkünften durchzuführen.

Zusätzlich wurden für die Prüfung der Variabilität zwischen Einzelkonidialnackkommenschaften hinsichtlich der Sensibilität als Beispiel 5 Nachkommenschaften des Stammes d/1 auf ihre Wachstumshemmung bei 0,1 mg Benomyl/l untersucht. Dabei ergaben sich Abweichungen in der Wachstumsreaktion zwischen den Stämmen von bis zu 5 % der Kontrolle, welche offensichtlich den bei dieser Untersuchungsmethode auftretenden Versuchsfehler darstellen. Wegen der genetischen Einheitlichkeit der vorwiegend einkernigen Konidien von *Colletotrichum lindemuthianum* waren Unterschiede ohnehin nicht zu erwarten.

Für die vergleichenden Untersuchungen wurden einerseits die differenzierten Rassen a/1, b/1, c/1, d/1, a-M/1 und f/1 sowie die aus den Wildherkünften gewonnenen Stämme C1/1 bis C21/1 in dreifacher Wiederholung auf Nährböden mit jeweils folgenden Wirkstoffkonzentrationen angeimpft:

- 0,1 mg/l MBC
- 0,1 mg/l Benomyl
- 0,1 mg/l Folcidin
- 0,4 mg/l Thiophanate M
- 0,5 mg/l Thiabendazol
- 0,5 und 2,0 mg/l Tridemorph
- 1,0 mg/l Dichlofluanid
- 10,0 mg/l Captan

Die mittleren relativen Kolonienzuwachsrate nach 10 Tagen wurde in den folgenden Abbildungen 12 bis 15 und 17 bis 20 als Säulendiagramme dargestellt. Die absoluten Wachstumsraten der Stämme auf wirkstofffreien Nährböden und die für die Darstellungen verwendeten Zahlenwerte sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4 a: Relatives Wachstum von *C. lindemuthianum*-Herkünften auf PDA nach Fungizideinmischung (siehe auch Abb. 12 ~ 15 und 17 ~ 20)

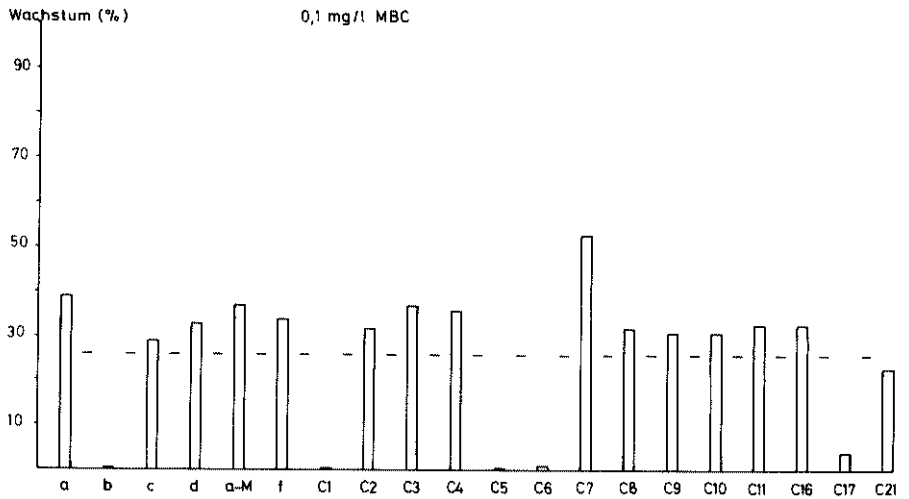
	mg/l	a/1	b/1	c/1	d/1	a-M/1	f/1	C1/1	C2/1	C3/1	C4/1
Kontrolle	0	48	55	49	46	39	39	44	42	43	41
MBC	0,1	39	0	29	33	37	34	0	32	37	36
Benomyl	0,1	56	0	61	58	64	65	9	61	62	58
Folcidin	0,1	65	5	69	63	70	69	19	69	71	69
Thiophanate M	0,4	51	14	43	34	35	35	5	41	43	42
Thiabendazol	0,5	14	16	46	47	36	47	25	47	54	54
Tridemorph	0,5	38	11	17	94	101	96	20	97	98	98
Tridemorph	2,0	25	6	9	76	83	82	13	81	82	84
Dichlofluanid	1,0	68	34	72	62	77	63	63	55	56	53
Captan	10	80	70	81	67	80	68	76	69	63	69

Wachstum in % der Kontrolle

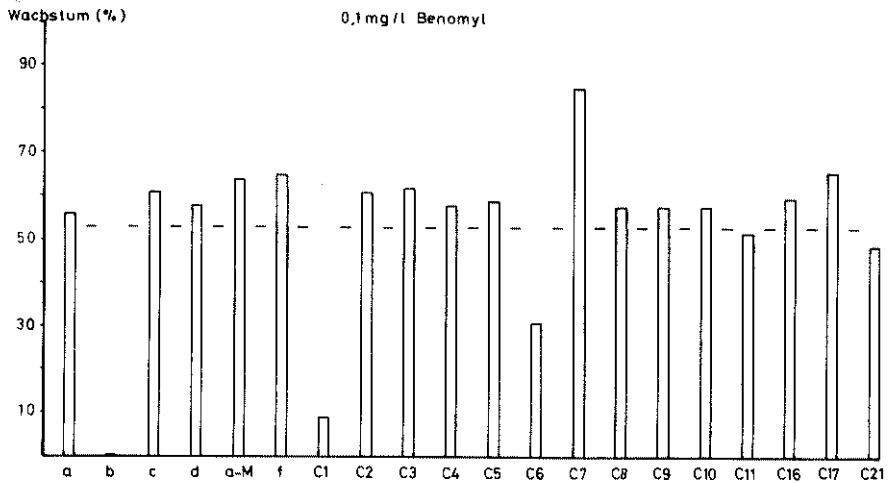
Tabelle 4 b: Relatives Wachstum von *C. lindemuthianum*-Herkünften auf PDA nach Fungizideinmischung (siehe auch Abb. 12 - 15 und 17 - 20)

	mg/l	C5/1	C6/1	C7/1	C8/1	C9/1	C10/1	C11/1	C16/1	C17/1	C21/1
		46	49	45	41	42	41	42	42	42	42
Kontrolle	0										
MBC	0,1	0	1	53	32	31	31	33	33	4	23
Benomyl	0,1	59	31	85	58	58	58	52	60	66	49
Folcidin	0,1	69	36	92	64	64	67	64	65	73	56
Thiophanate M	0,4	27	20	75	34	32	34	33	35	32	28
Thiabendazol	0,5	30	43	45	47	46	42	33	40	35	40
Tridemorph	0,5	15	15	93	97	94	94	95	96	15	28
Tridemorph	2,0	10	14	77	79	77	78	78	78	9	24
Dichlofluanid	1,0	73	69	68	60	62	62	67	61	67	67
Captan	10	83	78	74	76	72	71	72	74	73	69

Wachstum in %  
der Kontrolle

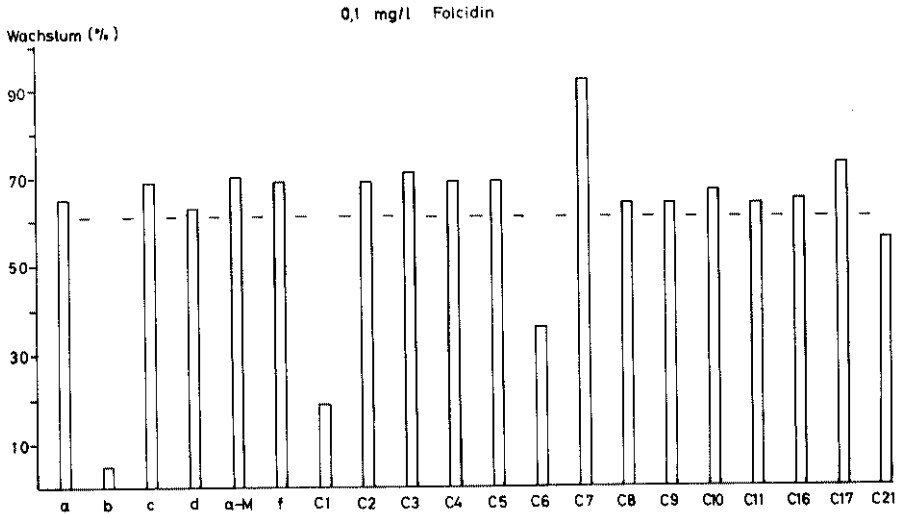


**Abb. 12:** Relative Wachstumsraten verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* bei 0,1 mg MBC/l in PDA (---- durchschnittliche Wachstumsrate)

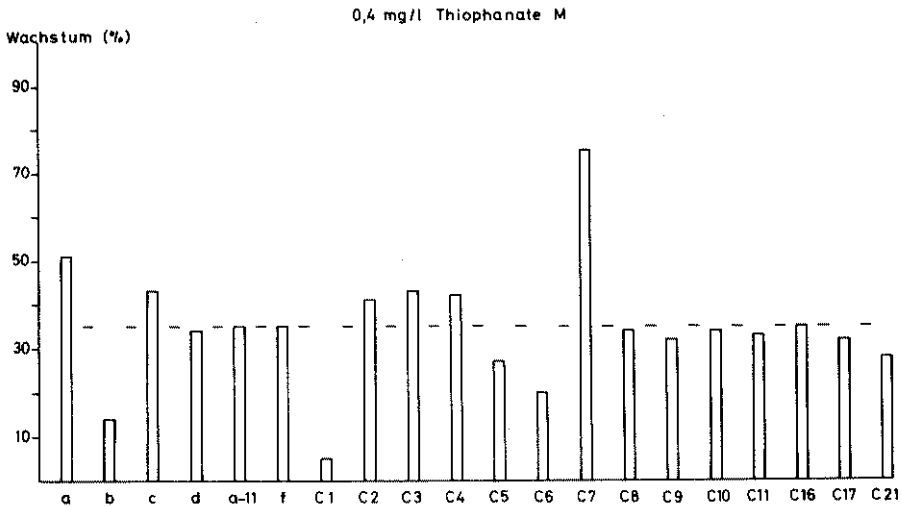


**Abb. 13:** Relative Wachstumsraten verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* bei 0,1 mg Benomyl in PDA (---- durchschnittliche Wachstumsrate)





**Abb. 14:** Relative Wachstumsraten verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* bei 0,1 mg Folcidin/l in PDA (---- durchschnittliche Wachstumsrate)

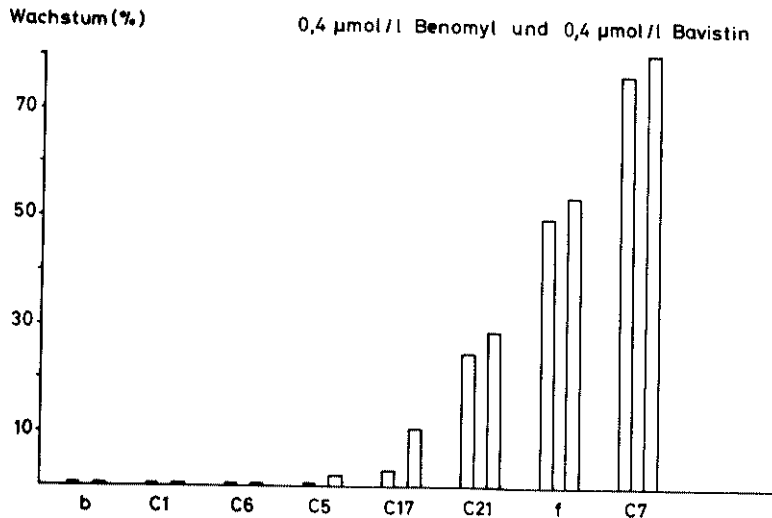


**Abb. 15:** Relative Wachstumsraten verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* bei 0,4 mg Thiophanate M/l in PDA (---- durchschnittliche Wachstumsrate)

Aus diesen vergleichenden Untersuchungen geht hervor, daß gegen Fungizide auf der Basis von MBC (Benomyl, Folcidin, Thiophanate M) eine deutlich unterschiedliche Sensibilität im Bereich der  $ED_{50}$ -Werte gegeben ist. Die Stämme b/1, C1/1, C6/1 und C21/1 erweisen sich als überdurchschnittlich sensibel, der Stamm C7/1 als fungizidverträglicher als alle übrigen Stämme. Unterschiedliche Reaktionen gegen MBC und Benomyl scheinen zunächst bei den Stämmen C5/1 und C17/1 vorzuliegen.

Die Unterschiede in den mittleren Hemmungsgraden (gestrichelte Linie) bei Benomyl und Folcidin einerseits zu MBC andererseits sind bei gleichen Wirkstoffkonzentrationen bezogen auf Gewichtsbasis im wesentlichen Auswirkungen der unterschiedlichen Molekulargewichte der Wirkstoffe.

In einem speziellen Versuch, dessen Ergebnisse in Abb. 16 dargestellt sind, werden diese Verhältnisse nochmals deutlich gemacht.



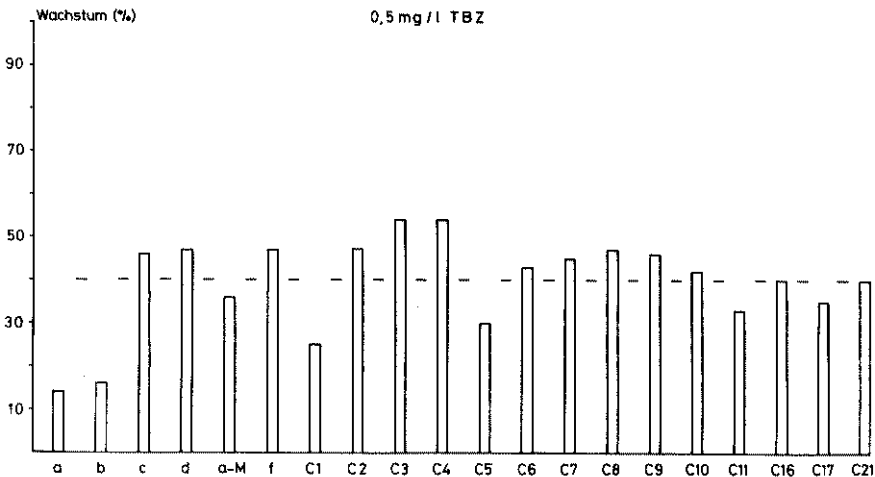
**Abb. 16:** Relative Wachstumsraten verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* bei 0,4  $\mu$ mol Benomyl/l (linke Säule) und 0,4  $\mu$ mol MBC/l (rechte Säule)

Das Wachstum dieser Auswahl von Stämmen auf gleichen molaren

Mengen von MBC und Benomyl erbringt nur sehr geringe Hemmungsunterschiede, die im Bereich der Versuchsfehlerstreuungen von  $\pm 5\%$  liegen. Hier zeigt sich auch, daß die zunächst unterschiedlich erscheinende Reaktion von C5/1 und C17/1 nur auf einen Effekt der auf Gewichtsbasis bezogenen verschiedenen molaren Konzentrationen beruht.

In späteren Untersuchungen zur Rassendifferenzierung der Wildherkünfte (siehe Kap. 6.2.1.) konnte ein bedeutungsvoller Zusammenhang zwischen Sensibilität gegen Benzimidazolfungizide auf der Basis von MBC und der Rassenzugehörigkeit erkannt werden. Danach gehören die hier genannten besonders sensibel reagierenden Stämme C1/1, C5/1, C6/1, C17/1 und C21/1 ebenso wie b/1 der Rasse Beta an.

Ein geringfügig abweichendes Wirkungsspektrum liegt beim Thiabendazol bei 0,5 mg Wirkstoff/l vor.

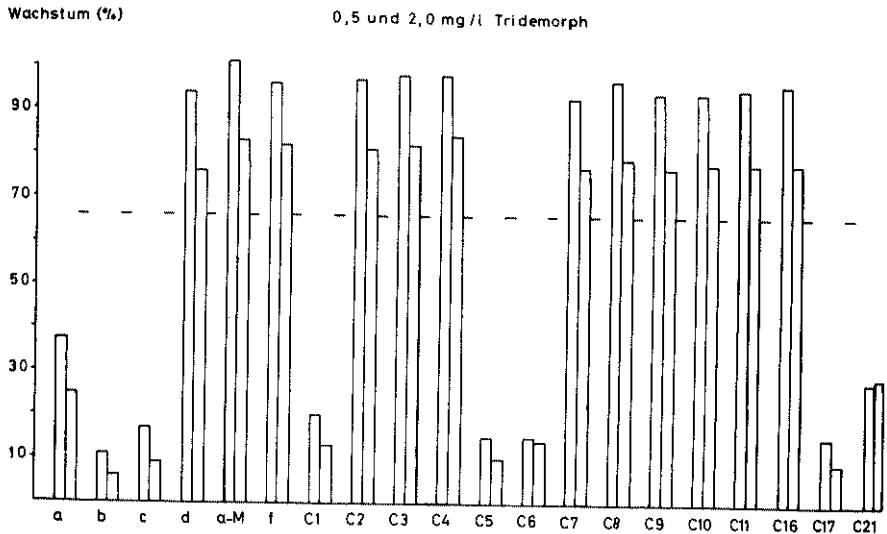


**Abb. 17:** Relative Wachstumsraten verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* bei 0,5 mg Thiabendazol/l in PDA (---- durchschnittliche Wachstumsrate)

Wegen des relativ geringen Differenzierungseffektes wurde Thiabendazol auch in höheren Konzentrationen eingesetzt

(nicht dargestellt). Dabei erwiesen sich auch die Stämme C6/1, C17/1 und C21/1 als überdurchschnittlich sensibel, so daß mit Ausnahme von a/1 kein grundsätzlich abweichendes Wirkungsspektrum vorliegt.

Gegen den Wirkstoff Tridemorph setzte sich die stark differenzierte Reaktion zwischen den Stämmen, wie sie bereits aus den Dosis-Effekt-Kurven (Abb. 9) ersichtlich wurde, über einen relativ weiten Konzentrationsbereich fort.

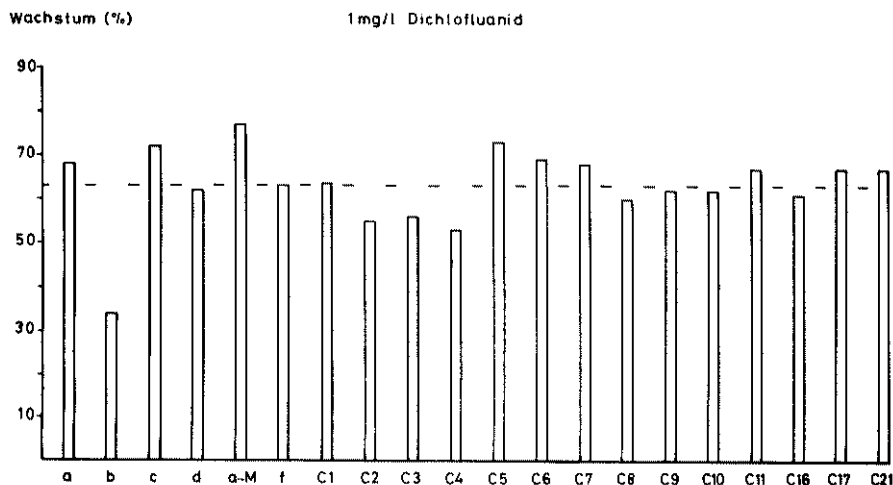


**Abb. 18:** Relative Wachstumsraten verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* bei 0,5 (linke Säule) und 2,0 (rechte Säule) mg Tridemorph/l in PDA  
(---- durchschnittliche Wachstumsrate bei 0,5 mg/l)

Trotz der völlig andersartigen Molekülstruktur dieses systemischen Wirkstoffs ergab sich eine deutliche Parallelität in den Sensibilitätsunterschieden zu den gegen Benzimidazolfungizide gefundenen Werten. Im Vergleich zum MBC reagieren hier zusätzlich die Stämme a/1 und c/1 besonders empfindlich.

Aus Vergleichsgründen wurden neben dem systemischen Tridemorph auch die nicht systemischen Wirkstoffe Dichlofluanid und

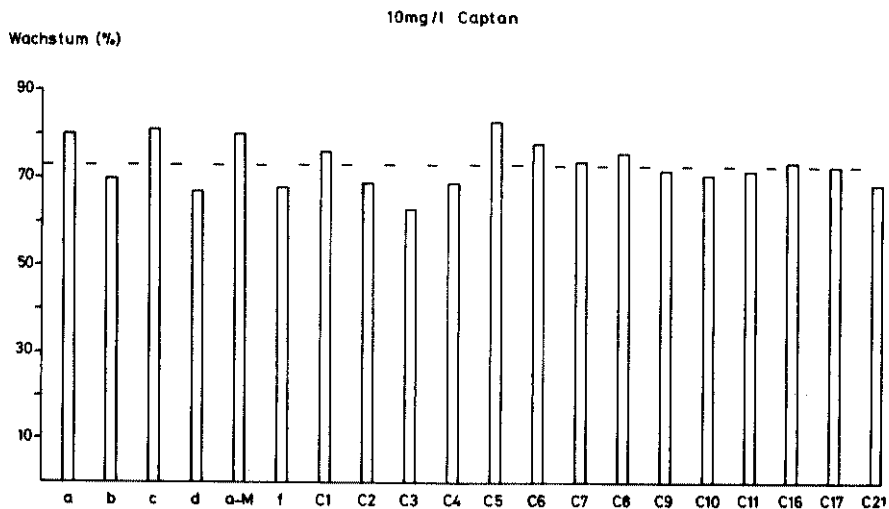
Captan in diese Versuche einbezogen (Abb. 19 und 20).



**Abb. 19:** Relative Wachstumsraten verschiedener Herkunftse von *C. lindemuthianum* bei 1 mg Dichlofluanid/l in PDA (---- durchschnittliche Wachstumsrate)

Hier ergab sich bei 1 mg Dichlofluanid/l ein durchschnittliches Wachstum von über 60 % gegenüber der Kontrolle, wobei nur der Stamm b/1 überdurchschnittlich fungizidempfindlich reagierte.

Gegen den Wirkstoff Captan zeigten die geprüften Stämme bei einer Konzentration von 10 mg Wirkstoff/l relativ gleichartige Empfindlichkeit. Die Abweichungen vom mittleren Wachstum (etwa 70 % der Kontrolle) betragen weniger als 10 %. Im Vergleich zu den systemischen Wirkstoffen wird deutlich, daß hier nur geringe Sensibilitätsunterschiede im Bereich der ED<sub>50</sub>-Werte vorhanden sind, die kaum über die Versuchsfehler-schwankungen hinausgehen. Auch bei anderen Wirkstoffkonzentrationen ergaben sich keine größeren Sensibilitätsunterschiede.



**Abb. 20:** Relative Wachstumsraten verschiedener Herkünfte von *C. lindemuthianum* bei 10 mg Captan/l in PDA (---- durchschnittliche Wachstumsrate)

#### 3.2.4. Nebenwirkungen von Formulierungsbestandteilen

Da bei allen Versuchen zur Sensibilität und zur Resistenzbildung von formulierten Präparaten der Wirkstoffe ausgegangen wurde, sollte in einer weiteren Versuchsreihe die Einwirkung von Formulierungsbestandteilen (Füllstoffe, oberflächenaktive Substanzen) einiger Fungizide geprüft werden, um auf diesem Wege Fehlinterpretationen der Ergebnisse auszuschließen.

Im allgemeinen kann davon ausgegangen werden, daß toxische Wirkungen der Formulierungsbeistoffe im Vergleich zur Wirksamkeit der Wirkstoffe, insbesondere bei Spritzpulvern eine völlig untergeordnete Rolle spielen und erst bei hohen Dosierungen ein Einfluß auf das Pilzwachstum möglich wird. Bei Emulsionspräparaten des Wirkstoffs Triforine konnten FUCHS et al. (1971) jedoch bei relativ niedrigen Konzentrationen bereits toxische Wirkungen der Beistoffe auf die getesteten Pilze feststellen.

Bei den Fungiziden Bavistin (50 % WP und Calixin (750  $\mu$ /l EC) wurden die Wirkungen der Beistoffe mit Hilfe von wirkstofffreien Fungizidformulierungen, sogenannten Blind- oder Leerformulierungen erfaßt.

Den Einfluß von Blindformulierungsmengen, welche Bavistin-Anwendungen von 1, 10, 100 und 1000 mg MBC/l entsprechen, auf einige Stämme von Colletotrichum zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Wachstum von 6 Stämmen von *C. lindemuthianum* auf Nährböden mit Leerformulierungsmengen von Bavistin

		Konzentration (mg/l)				
		0	1	10	100	1000
b/1	Wachstum (%)	100	100	99	99	75
f/1		100	101	100	98	83
C1/1		100	101	101	96	79
C3/1		100	100	101	99	84
C6/1		100	98	99	97	72
C7/1		100	101	101	98	83

Danach ist ein merklicher Einfluß der Formulierungsbestandteile erst bei Konzentrationen von über 100 mg/l gegeben, so daß die Ergebnisse zur Sensibilität der Erregerherkünfte davon nicht berührt werden. Bei Bavistinkonzentrationen von 100 mg MBC/l, wie sie bei den Überprüfungen resistenter Stämme benutzt wurden, muß nach diesen und weiteren, nicht angeführten Versuchen mit einer Wachstumsreduktion von bis zu 10 % durch die Beistoffe gerechnet werden.

Mit einer Leerformulierung des Emulsionskonzentrates Calixin konnte erst oberhalb einer Menge, die einem Calixin-Anteil von 10 mg Wirkstoff/l entspricht, eine meßbare Wachstumsreduktion erzielt werden (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Wachstum von 6 Stämmen von *C. lindemuthianum* auf Nährböden mit Leerformulierungsmengen von Calixin

		Konzentration (mg/l)					
		0	0,1	0,5	2,0	10	1000
b/1	Wachstum (%)	100	103	100	99	100	8
G21/1		100	102	102	103	101	38
a/1		100	98	99	98	96	2
f/1		100	98	98	98	100	23

Damit ist auch hier der Nachweis erbracht, daß in dem angewandten Konzentrationsbereich des Fungizids Calixin Einwirkungen durch Formulierungsbestandteile nicht gegeben sind.

#### 4. Zur Resistenzbildung gegen Benzimidazolfungizide

Die Untersuchungen zur Sensibilität stellten eine Grundlage für die experimentellen Arbeiten zur Resistenzbildung dar. Die dort festgestellte höhere Wirkstoffverträglichkeit einiger Stämme gegen Benzimidazolfungizide dürfte kaum als eine vorliegende Resistenz anzusprechen sein, da sich wesentliche Unterschiede nur im niedrigen Konzentrationsbereich (bis 1 mg Wirkstoff/l) abzeichnen. Als Kriterium für eine erhöhte Wirkstoffverträglichkeit (Resistenz) wurde in den vorliegenden Untersuchungen das Auftreten eines stärkeren vegetativen Wachstums auf höheren Konzentrationen im Vergleich zur normalen Sensibilität der Ausgangsstämme herangezogen.

Dabei wird in diesen Untersuchungen in Anlehnung an andere Autoren (EHRENHARDT et al. 1973; GROSSMANN 1974) für eine erhöhte Wirkstoffverträglichkeit ausschließlich der Begriff 'Resistenz' verwandt, ohne damit die im allgemeinen Sprachgebrauch gemachten Unterschiede zwischen Resistenz (aktiv, Widerstand) und Toleranz (passiv, Duldung) hinsichtlich der Form der erhöhten Wirkstoffverträglichkeit zu berücksichtigen. Die Untersuchungen zielten auf die Frage ab, ob bei



Colletotrichum lindemuthianum Resistenz gegenüber Benzimidazolfungiziden entstehen kann, und auf welche Weise und mit welcher Häufigkeit in vitro resistente Stämme auftreten.

#### 4.1. Verfahren zur Erzielung von Resistenz

Um die auf Grund theoretischer Vorstellungen mögliche Resistenzbildung des Pilzes in ausreichender Breite zu erfassen, wurden mehrere Verfahren angewandt.

Zunächst wurde versucht, durch Anpassungsprozesse eine höhere Wirkstoffverträglichkeit des Pilzes zu erzielen. In weiteren Versuchen wurde eine Massenauslese aus Mycel- und Konidienmaterial bei hohem Selektionsdruck betrieben. Darüber hinaus wurde durch Einwirkungen mutagener UV-Bestrahlungen die natürliche Mutationsrate erhöht.

##### 4.1.1. Wirkstoffsteigerungsverfahren

Die physiologische Anpassung eines Pilzes an Toxika bedarf eines längeren Kontaktes bei niedrigen Konzentrationen, die entsprechend der Adaptation gesteigert werden können. Dazu wurden Mycelteile nach der bereits angesprochenen Methodik zur Prüfung der Sensibilität auf Konzentrationen im Bereich der ED<sub>50</sub>-Werte übertragen und das Wachstum während mehrerer Passagen beobachtet. Ergab sich an Hand der Kolonienmessungen im Laufe der Passagen eine Verringerung der Wachstumshemmung, so wurde die Wirkstoffkonzentration erhöht. In den nach diesem Verfahren durchgeführten Versuchen wurden die Mycelübertragungen anfänglich in Abständen von 14 Tagen, später von 28 Tagen durchgeführt. Die Übertragung von Mycel aus der vorangegangenen Passage erfolgte auf jeweils 2 Konzentrationen in 3 Wiederholungen, wobei sich die Konzentrationsstufen um den Faktor 2 unterschieden. Soweit Konzentrationserhöhungen in Betracht kamen, wurde meist eine Verdoppelung vorgenommen. Der notwendige Vergleich zur ursprünglichen Sensibilität der Ausgangsstämme konnte durch parallele Versuchsreihen hergestellt werden.

Das dargestellte Wirkstoffsteigerungsverfahren gibt dem Pilz nicht nur die Möglichkeit, sich zu adaptieren, sondern

stellt auch eine Selektion unter geringem Selektionsdruck dar.

#### 4.1.2. Massenauslese unter hohem Selektionsdruck

Soweit im angeimpften Inokulum bereits Unterschiede in der Reaktion gegen Fungizide vorliegen oder sich kurzfristig bilden, können sie durch Massenselektion auf Nährböden mit höherer Fungizidkonzentration entdeckt werden. Durch derartige Wirkstoffkonzentrationen, die für sensible Mycelteile zu einer vollständigen Wachstumshemmung führen, bestehen kaum Chancen für eine Adaptation.

Für diese Versuche wurden Mycel-bewachsene Agarscheiben in größerer Zahl auf Wirkstoffkonzentrationen von 1 bis 500 mg/l übertragen. Beim Auftreten von Sektoren oder überdurchschnittlichem allgemeinen Wachstum wurden wegen des Verdachtes auf Resistenz Abimpfungen vorgenommen. Diese wurden im Vergleich mit den normal-sensiblen Ausgangsstämmen auf ihre Fungizidresistenz oberhalb der  $ED_{50}$ -Werte getestet.

Neben einer möglichen Heterogenität im Mycel kann auch eine solche in der Konidienpopulation eines Pilzstammes vorliegen, insbesondere durch auftretende Mutationen. Das Vorliegen solcher Unterschiede in der Fungizidverträglichkeit wurde dadurch erfaßt, daß höher konzentrierte Konidiensuspensionen auf fungizidhaltige Nährböden aufgetragen wurden. Die innerhalb von 20 Tagen auf solchen wachstumshemmenden Fungizidkonzentrationen heranwachsenden Kolonien wurden wegen des Verdachtes auf Resistenz abgeimpft und in besonderen Tests auf ihre Fungizidverträglichkeit überprüft.

Die Gewinnung dichter Konidiensuspensionen (etwa 1-5 Millionen Konidien/ml) geschah durch Abschwemmen der auf GPA-Nährböden gebildeten Konidien. Auf eine Konidienwaschung wurde verzichtet, da eine keimhemmende Wirkung durch Ausscheidungsprodukte trotz hoher Konidiendichte nicht festgestellt wurde.

Das Verfahren zur Selektion resistenter Typen wurde im Laufe der Versuche in mehrfacher Weise abgewandelt. Neben einer Variation der Wirkstoffkonzentrationen (1 - 100 mg Wirkstoff/l) im Nährboden, wurden die auf der Nährbodenoberfläche haftenden Konidien auch mit wirkstoffhaltigen Nährböden über-

schichtet. Dazu mußten die verflüssigten Nährböden bis an die Grenze ihrer Flüssig-Phase (38-40°C) abgekühlt werden, um dadurch Temperaturschädigungen der Konidien weitgehend auszuschalten. Bei dieser Übersichtungsmethode wuchsen resistente Kolonien bis zur Nährbodenoberfläche durch und konnten dadurch leichter isoliert werden. Auf Kontrollplatten mit wirkstofffreien Nährböden wurden die Konidienkeimraten der verwendeten Herkünfte überprüft.

#### 4.1.3. Mutagene UV-Behandlung

Soweit Mutationen als Ursache der Resistenzbildung möglich sind, müßte eine mutagene Behandlung, insbesondere der weitgehend einkernigen Konidien zur Erhöhung der Resistenzbildung beitragen. Die natürliche Mutationsrate kann durch Einwirkung energiereicher, kurzweiliger Strahlen oder durch chemische Agenzien erhöht werden. In den vorliegenden Untersuchungen wurde zur Auslösung von Mutationen eine 40 Watt-Quecksilberdampflampe (Sterisol NN 30/82, Hanau Quarzlampen GmbH) benutzt, die vorwiegend die Wellenlänge 254 nm abstrahlt.

Bei UV-Bestrahlungen von Konidiensuspensionen zeigen Dosis-Effekt-Kurven, daß die höchste Mutationsausbeute in einem Bereich erfolgt, bei dem durch Bestrahlung 90 bis 99,9 % der Konidien abgetötet sind (MARKERT 1953). Wegen der stark zunehmenden Adsorption der UV-Strahlung in Wasser mit steigender Eindringungstiefe und der dadurch verursachten ungleichmäßigen Dosis auf die einzelnen in der Suspension schwebenden Konidien wurde die Bestrahlung nach deren gleichmäßiger Verteilung auf Nährbodenoberflächen vorgenommen, da unter diesen Bedingungen die Konidien jeweils gleichartig mit einem nur dünnen Wasserfilm bedeckt sind.

Die Petrischalen wurden zur Bestrahlung nach Vorversuchen in 35 cm Abstand unter die UV-Lampe gebracht und die Strahlendosis durch die Bestrahlungszeiten variiert. Nach Erstellung einer Dosis-Effekt-Kurve wurde für die Bestrahlung der Konidien eine Zeit von 70 Sekunden gewählt. Bei dieser

Dosis ergab sich bei geringen Unterschieden zwischen den Stämmen auf wirkstofffreien Nährböden eine über 90 %ige Abtötung. Unter dem Einfluß der Benzimidazolfungizide führte diese Dosis nur zu einer etwa 50 %igen Abtötung, so daß unter diesen Bedingungen eine erhöhte UV-Resistenz angenommen werden muß.

Die UV-Behandlungen wurden jeweils direkt oder wenige Stunden nach der Konidienaussaat durchgeführt. Zur Verhinderung der Photoreaktivierung (DERTINGER und JUNG 1969) wurden die Schalen unmittelbar nach der Bestrahlung dunkel aufgestellt. Verringertes Hyphenwachstum oder reduzierte Konidienkeimraten traten als negative Auswirkungen der Nährbodenbestrahlungen infolge von Substanzveränderungen bei den hier verwendeten mutagenen und auch bei wesentlich höheren Dosen nicht auf.

#### 4.2. Ergebnisse

##### 4.2.1. Resistenzbildung durch Wirkstoffsteigerung

Nach der eingangs dargestellten Methode wurden mit den unterschiedlich sensiblen Stämmen b/1, c/1, d/1, f/1, C6/1 insgesamt 8 Benomyl-Nährboden-Passagen im Abstand von 14 bis 28 Tagen durchgeführt. Die Versuche wurden mit den Konzentrationsstufen 0,1, 0,2 und 0,4 mg Benomyl/l begonnen.

Bei den Mycelüberimpfungen zur nächsten Passage wurde das Randmycel aus einer der 3 Kolonien des jeweiligen Versuchsgliedes verwandt. Dabei wurde eine Selektion auch dadurch ausgeübt, daß bei ungleichmäßigem Wachstum innerhalb der 3 Wiederholungen die am stärksten gewachsene Kolonie benutzt wurde oder dadurch, daß vereinzelt auftretende, deutlich sichtbare, schnellwüchsige Sektoren übertragen wurden. Die Verwendung schnellwüchsiger Sektoren ist in den Darstellungen der Versuchsabläufe bei den Stämmen b/1 in Abb. 21 und f/1 in Abb. 22 besonders gekennzeichnet.



In diesen beiden Darstellungen, an denen die Ergebnisse erläutert werden sollen, gibt die obere der jeweils direkt übereinander stehenden Zahlen die Benomylkonzentration in mg/l in den Nährböden an und die darunter stehende Zahl den nach 10 Tagen erreichten Kolonienzuwachs in (%) der parallel dazu auf wirkstofffreie Nährböden angeimpften Ausgangsstämme.

Die Ergebnisse zeigen, daß ein deutlich höheres Wachstum auf 0,1 bzw. 0,2 mg Benomyl/l bei allen Stämmen mit Sicherheit in der 3. Passage 38 Tage nach der 1. Animpfung festzustellen war. Der stark sensible Stamm b/1 (Abb. 21) erreichte in der 1. Passage ein Wachstum von 0,3 % der Kontrolle auf 0,1 mg Benomyl/l und steigerte dieses auf 42 % in der 3. Passage. Damit war innerhalb von 3 Passagen eine deutliche Steigerung der vegetativen Entwicklung erfolgt. In weiteren Überimpfungen konnte nur bei einer Linie in der 5. Passage Wachstum auf 0,2 mg Benomyl/l erzielt werden. Der Versuch zur Erzielung einer noch höheren Wirkstoffverträglichkeit wurde nach der 8. Passage bei einem geringen Wachstum der bis dorthin geführten Linien auf 0,8 mg Benomyl/l abgebrochen. Insgesamt wurde damit eine Erhöhung der Wirkstoffverträglichkeit von 0,1 auf 0,8 mg Benomyl/l erreicht, wobei jedoch das Wachstum relativ begrenzt blieb. In der 5. Passage der Kontrolle trat auf 0,2 mg Benomyl/l geringfügiges Wachstum einer Animpfung auf. Eine entsprechende Übertragung dieses Mycels auf höher konzentrierte Nährböden der folgenden Passagen ergab eine Steigerung der Verträglichkeit, die ebenfalls 0,8 mg Benomyl/l erreichte. Dieser spontan aufgetretene Sektor verhielt sich damit genauso wie die in den 5 vorhergehenden Passagen ständig auf Benomyl gewachsene Linie.

Der gleichzeitig in die Untersuchungen einbezogene Stamm C6/1 verhielt sich grundsätzlich ebenso wie b/1 und wurde deshalb nicht im einzelnen dargestellt. Die Erhöhung seiner Verträglichkeit war ebenfalls auf 0,8 mg Benomyl/l begrenzt.

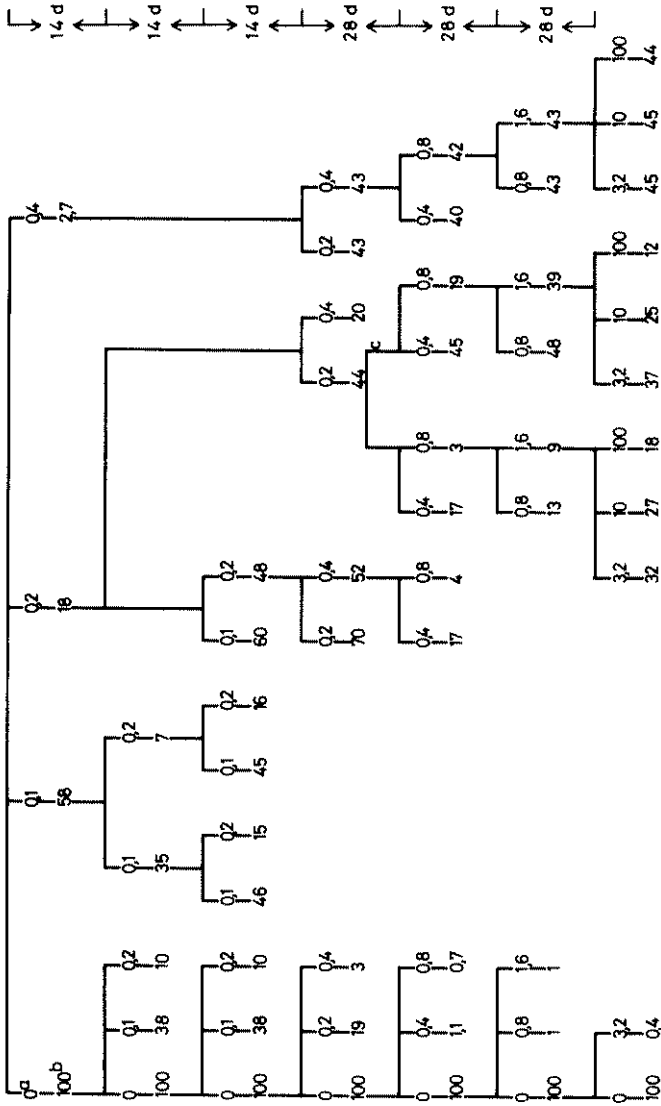


Abb. 22: Steigerung der Fungizidverträglichkeit der Herkunft f/1 von *C. lindemuthianum* bei stufenweise gesteigerten Benomylkonzentrationen in PDA durch Mycelübertragungen  
 a mg Benomyl/l      b relative Wachstumsraten      c schnellwüchsiger Sektor

Der weniger sensible Stamm f/1 (Abb. 22) zeigte in der 1. Passage bereits auf 0,2 mg Benomyl/l ein Wachstum von 18 % der Kontrolle und steigerte dieses im Verlaufe der nächsten beiden Passagen auf 48 %. In diesem Falle liegt eine Erhöhung der Wachstumsrate auf mehr als das Doppelte vor.

Bei einzelnen Linien waren weitere Konzentrationserhöhungen bis auf 100 mg Benomyl/l möglich (7. Passage). Auf dieser sehr hohen Konzentration des Wirkstoffs konnte in einem Falle noch etwa 44 % des Wachstums der Kontrolle ermittelt werden. Diese Linie zeigte eine besondere Verträglichkeit, da sie über den getesteten Konzentrationsbereich von 3,2 bis 100 mg/l etwa die gleiche Wachstumsleistung aufwies. Bei den gleichzeitig untersuchten Stämmen c/1 und d/1 konnten in ähnlicher Weise ein Wachstum auf 100 mg Benomyl/l erreicht werden.

Bei allen Versuchen mit verschiedenen Stämmen traten relativ selten Sektoren mit deutlich schnellerem Wachstum auf. Bei ihrer Überprüfung auf höheren Konzentrationen wurde festgestellt, daß zunächst ein deutlicher Wachstumsvorteil gegeben war. Dieser ging allerdings durch die Weiterentwicklung der Ursprungslinie im Laufe der nächsten Passagen verloren (siehe Abb. 22).

Die nach diesem Verfahren gewonnenen Kolonien mit erhöhter Benomylverträglichkeit wurden abgeimpft und auf die Beibehaltung ihrer Resistenz überprüft (siehe Kap. 5.3.).



#### 4.2.2. Resistenzbildung durch Massenselektion aus der Mycelphase

Eine Resistenzbildung durch Selektion erfordert neben einem hohen Selektionsdruck eine dem Resistenzpotential entsprechende Mycelmasse oder Konidienzahl. Durch Überimpfung einer größeren Zahl von mycelbewachsenen Agarscheiben auf Nährböden mit wachstumshemmenden Benomylkonzentrationen wurden die erforderlichen Bedingungen für eine Selektion aus der Mycelphase geschaffen.

Parallel zur oben dargestellten Wirkstoffsteigerung, bei der neben der Möglichkeit zur physiologischen Adaptation ein geringer Selektionsdruck über eine lange Zeit vorhanden war, wurden bei diesen Versuchen dieselben Stämme über kurze Zeit einem hohen Selektionsdruck unterworfen. Von den Stämmen b/1, c/1, d/1, f/1 und C6/1 wurden auf PDA mit den Benomylkonzentrationen 1, 5, 10, 50, 100 und 500 mg/l je Konzentrationsstufe 45 5 mm-große, mycelbewachsene Agarscheiben angeimpft. Bei überdurchschnittlichem Wachstum wurden Abimpfungen und weitere Überprüfungen vorgenommen.

Wie aus den Sensibilitätsuntersuchungen zu erwarten war, ergab sich bei den weniger sensiblen Stämmen c/1, d/1 und f/1 auf allen Konzentrationen durchschnittlich ein nach 10 Tagen kaum meßbarer Mycelauswuchs. Auch nach 20 Tagen zeigten die mittleren Wuchsraten keine deutliche Abhängigkeit zur Fungizidkonzentration. Auf Grund der größeren Sensibilität trat bei den Stämmen b/1 und C6/1 auf den genannten Konzentrationen kein Wachstum ein.

Einzelne Kolonien der Stämme c/1, d/1 und f/1 waren nach 20 Tagen überdurchschnittlich ausgewachsen, wobei der Auswuchs spontan und teilweise sektoral erfolgte. Dieses überdurchschnittliche Wachstum war zum Teil bereits nach etwa 5 Tagen sichtbar. In anderen Fällen spalteten sich raschwüchsige Sektoren erst im späteren Verlaufe ab. In Einzelfällen war eine eindeutige Zuordnung zur Kategorie „überdurchschnittlicher Auswuchs“ nicht möglich. Die Tabelle 7 zeigt eine Zusammenstellung der Ergebnisse.

Tabelle 7: Anzahl der Agarscheiben mit überdurchschnittlicher Mycelbildung nach 20 Tagen (45 Agarscheiben je Versuchsglied)

Stämme	Benomyl-Konzentrationen (mg/l)						Sa.
	1	5	10	50	100	500	
b/1	0	0	0	0	0	0	0
C6/1	0	0	0	0	0	0	0
c/1	9	5	4	0	1	0	19
d/1	6	2	4	3	3	1	19
f/1	5	4	4	3	4	3	23

Keine Sektoren traten bei den Stämmen b/1 und C6/1 auf. Agar-scheiben mit starkem Mycelwachstum war bei den übrigen 3 Stäm-men bei allen Konzentrationen nachzuweisen, jedoch zahlenmäßig deutlich vermindert bei 500 mg Wirkstoff/l. Unterschiede zwi-schen diesen 3 Stämmen konnten nicht gefunden werden. Da der Zeitpunkt der Entstehung solcher resistenter Ausgangspunkte bzw. Sektoren nicht zu erfassen ist, kann über den zeitlichen Zusammenhang zur Resistenzbildung keine Aussage erfolgen.

#### 4.2.3. Resistenzbildung durch Massenselektion aus der Koni-dialphase mit und ohne Anwendung mutagener UV-Dosen

In Vorversuchen wurde bei den Stämmen C6/1 und f/1 eine Koni-dienaussaat auf Nährboden mit 0,1 mg Benomyl/l und eine Über-schichtung mit 0,3 bzw. 1 mg Benomyl/l vorgenommen. In an-schließenden Versuchen wurde zunächst der Einfluß steigender Überschichtungskonzentrationen (1 bis 300 mg Benomyl/l) und die Wirksamkeit der UV-Behandlung auf die Ausbeute an resi-stenten Kolonien untersucht. Weitere Versuche dienten der Gewinnung zahlreicher resistenter Kolonien von verschiedenen Ausgangsstämmen (b/1, f/1, C1/1, C3/1, C6/1, C7/1, C21/1) sowie der Feststellung ihrer Entstehungsraten.

In den Vorversuchen, die vor allem klären sollten, ob eine Resistenzbildung durch Massenselektion aus der Konidialphase erzielt werden kann, konnten folgende Beobachtungen gemacht werden. Nach etwa 2 Tagen waren die Konidien in den Benomylhaltigen Nährböden zu den in Kap. 3.2.1. beschriebenen Formen herangewachsen. In den UV-bestrahlten Versuchsgliedern konnten die abgetöteten Konidien an ihrem granulär erscheinenden Zellumen bei unveränderter Konidienform erkannt werden. Einzelne Konidien waren in der Lage, ungehindert auszukeimen und innerhalb weniger Tage zu makroskopisch sichtbaren Kolonien heranzuwachsen. Einige andere Konidien wuchsen erst nach einer Verzögerungsphase aus, so daß Kolonien auch noch zu einem späteren Zeitpunkt erschienen. Das Mycel der resistenten Kolonien wuchs durch den überschichteten Nährboden zur Oberfläche durch und konnte leicht isoliert werden. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen einige der entstandenen resistenten Kolonien bei C6/1 und f/1.

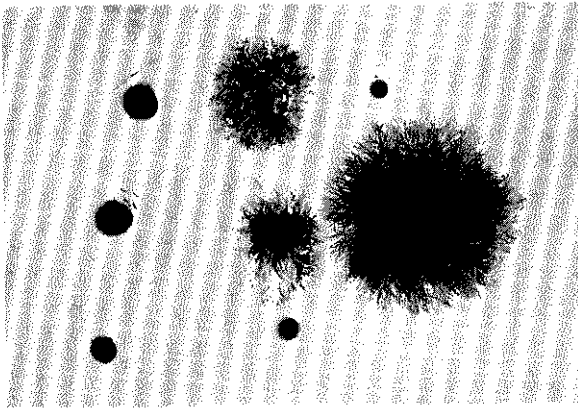


Abb. 23: Auftreten resistenter Kolonien nach Konidienaussaat der Herkunft C6/1 auf Benomylhaltigen Nährboden

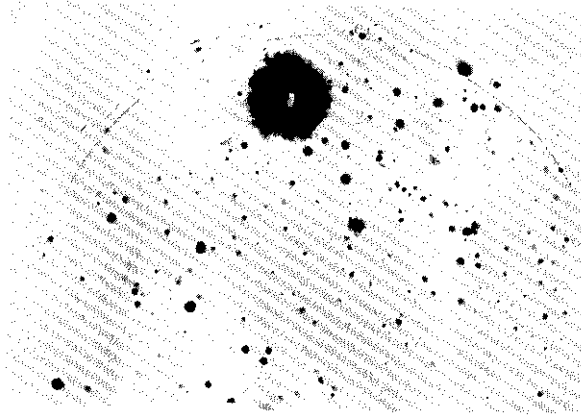


Abb. 24: Auftreten einer resistenten Kolonie nach Konidien-  
aussaat der Herkunft f/1 auf Benomyl-haltigen Nähr-  
böden

Die in Abb. 24 sichtbaren Mikrokolonien entstanden innerhalb von 20 Tagen durch ein sehr langsam verlaufendes Wachstum ausgekeimter Konidien. Dieses Verhalten entspricht der normalen Sensibilitätsreaktion dieses zur Gruppe der weniger sensiblen Herkünfte gehörenden Stammes f/1.

In die Versuche zum Einfluß steigender Benomylkonzentrationen auf die Mutantenausbeute wurden die Stämme f/1, C3/1 und C6/1 einbezogen. Die Konidienaussaat erfolgte auf PDA mit 0,1 mg Benomyl/l. Die Überschichtung mit 1, 10, 100 und 300 mg Benomyl/l in PDA wurde nach 48 Stunden vorgenommen. Die Anzahl der entstandenen resistenten Kolonien bei einer Gesamtzahl keimfähiger Konidien von  $26 \cdot 10^6$  bei f/1,  $3 \cdot 10^6$  bei C3/1 und  $22 \cdot 10^6$  bei C6/1 30 Tage nach der Aussaat ist in Tab. 8 dargestellt.

Tabelle 8: Anzahl gebildeter Kolonien der Stämme f/1, C3/1 und C6/1 bei veränderten Benomylkonzentrationen in der Überschichtung; mit und ohne UV-Bestrahlung (gleiche Konidienmengen innerhalb der Versuchsglieder eines Stammes)

Konzentration (mg/l)	S t a m m					
	f/1		C3/1		C6/1	
	-UV	+UV	-UV	+UV	-UV	+UV
1	1	18	0	5	0	0
10	5	25	1	13	0	1
100	3	23	0	13	0	0
300	2	26	4	14	0	1
Summe	11	92	5	45	0	2

Aus diesen Ergebnissen kann entnommen werden, daß die Anzahl resistenter Kolonien auch bei steigenden Fungizidkonzentrationen im Bereich von 1 bis 300 mg Benomyl/l unverändert bleibt und damit die Wirkstoffkonzentration in diesem Bereich ohne Einfluß auf die Entstehungsrate ist.

Der Einfluß der mutagenen UV-Behandlung auf die Ausbeute an resistenten Kolonien wird in der Gegenüberstellung der entsprechenden Versuchsglieder deutlich. Bei den Stämmen f/1 und C3/1 ergab sich eine mittlere Erhöhung der Ausbeute um den Faktor 9. Ähnliche Werte können auch aus der Tabelle 9 entnommen werden. Die Wirksamkeit der UV-Behandlung kann bereits als Indiz für das Vorliegen resistenter Mutanten gewertet werden.

Bei entsprechenden Versuchen mit dem Wirkstoff MBC wurden hinsichtlich der Entstehungsrate resistenter Stämme wie auch der Erhöhung der Ausbeute durch die UV-Bestrahlung keine abweichenden Ergebnisse erzielt, so daß angenommen werden kann, daß sich die Resistenz auf das beiden Fungiziden im Wirkungsmechanismus zugrunde liegende MBC bezieht.

In die weiteren Versuche zur Gewinnung resistenter Kolonien durch Massenselektion aus der Konidialphase wurden zusätzlich die Stämme b/1, C1/1, C7/1 und C21/1 einbezogen.

In Tabelle 9 sind die Entstehungsraten MBC-resistenter Kolonien bezogen auf den keimfähigen Anteil der ausgesäten Konidien zusammengestellt.

**Tabelle 9:** Entstehungsraten (Extremwerte mehrerer Versuche) von MBC-resistenten Kolonien nach Konidienausaat und Nährbodenüberschichtung mit mehr als 1 mg MBC/l (jeweils zur Hälfte UV-bestrahlt)

Stamm	Entstehungsraten		Gesamtzahl der Konidien
	ohne UV	mit UV	
C7/1	$1 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^6$
C3/1	$5 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	$4 \cdot 10^{-6} - 2 \cdot 10^{-5}$	$15 \cdot 10^6$
f/1	$1 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-7}$	$2 \cdot 10^{-6} - 7 \cdot 10^{-6}$	$51 \cdot 10^6$
C21/1	$2 \cdot 10^{-7} - 8 \cdot 10^{-7}$	$1 \cdot 10^{-6} - 8 \cdot 10^{-6}$	$19 \cdot 10^6$
C6/1	$< 1 \cdot 10^{-8*}$	$2 \cdot 10^{-8} - 2 \cdot 10^{-7}$	$208 \cdot 10^6$
C1/1	$< 3 \cdot 10^{-8*}$	$< 3 \cdot 10^{-8*}$	$34 \cdot 10^6$
b/1	$< 2 \cdot 10^{-8*}$	$< 2 \cdot 10^{-8*}$	$56 \cdot 10^6$

\* keine resistenten Kolonien erzielt

Die Entstehungsraten liegen ohne UV-Bestrahlung bei 1-10 und mit Behandlung bei 10-100 resistente Kolonien aus 10 Millionen Konidien. Diese Raten entsprechen größenordnungsmäßig den Mutationsraten für 1-Gen-Mutationen.

Von den Stämmen b/1 und C1/1 konnten bei den hier verwendeten Konzentrationen von mehr als 1 mg MBC/l keine resistenten Kolonien gewonnen werden. Bei C6/1 wurden lediglich mit

Hilfe der UV-Bestrahlung in geringer Rate derartige Kolonien selektiert. Zur Klärung der vorliegenden Verhältnisse wurde das Verhalten dieser genannten 3 Herkünfte mit besonderer Sensibilität bei verminderten Wirkstoffkonzentrationen überprüft. Bei Überschichtungen mit 0,2 mg MBC/l entstanden bei diesen Stämmen Kolonien mit den in Tabelle 10 angegebenen Raten.

Tabelle 10: Entstehungsraten von Kolonien mit erhöhter Wirkstoffverträglichkeit nach Konidienaussaat und anschließender Nährbodenüberschichtung mit 0,2 mg MBC/l in PDA (unter Anwendung von UV-Bestrahlung)

Stamm	Kolonien mit erhöhter MBC-Verträglichkeit	
	Entstehungsraten	Anzahl
C6/1	$4 \cdot 10^{-6}$	66
C1/1	$3 \cdot 10^{-6}$	52
b/1	$2 \cdot 10^{-6}$	60

Das Auftreten solcher Kolonien mit erhöhter Wirkstoffverträglichkeit bei verminderter Fungizidkonzentration und Ausbleiben derartiger Kolonien bei Konzentrationserhöhung ließ unterschiedliche Resistenzabstufungen erwarten. Näheres dazu wird in Kapitel 5.1. dargestellt.

Die Versuchsmethodik zur Selektion resistenter Stämme aus der Konidialphase mit zusätzlicher mutagener UV-Bestrahlung wurde, um vergleichende Betrachtungen zu ermöglichen, auch auf zwei nicht zu den Benzimidazolwirkstoffen zu stellende Fungizide angewandt.

Das systemische Fungizid Calixin (Tridemorph) und das nicht systemische Fungizid Euparen (Dichlofluanid), die bereits bei den Sensibilitätsuntersuchungen Berücksichtigung fanden, wurden in Konzentrationen von 1 mg Wirkstoff/l in PDA eingemischt und Konidien der Stämme f/1 und C6/1 auf der

Nährbodenoberfläche ausgesät. Nach der UV-Bestrahlung wurde eine Überschichtung mit 100 mg Wirkstoff/l in PDA vorgenommen. Bei der Aussaat von  $8 \cdot 10^6$  bzw.  $66 \cdot 10^6$  keimfähiger Konidien von f/1 bzw. C6/1 je Fungizid konnten keine resistenten Kolonien gefunden werden.

Soweit eine Resistenzbildung gegen diese Wirkstoffe bei der genannten Konzentration überhaupt möglich ist, dürften die Entstehungsraten unter den bei Benzimidazolfungiziden gefundenen Werten liegen.

## 5. Charakterisierung der Fungizidresistenz

Nach der Gewinnung fungizidresistenter Formen auf verschiedenen Wegen war es das Ziel, eine Analyse des Resistenzcharakters durchzuführen. Zunächst galt es, die Resistenzhöhe und das Wachstum auf wirkstoffhaltigen wie auch wirkstofffreien Nährböden zu untersuchen, und dabei u.a. Zusammenhänge zwischen Wuchsbild und der Resistenz zu erfassen. Darüber hinaus war von besonderem Interesse, ob die Resistenz in wirkstofffreien Nährbodenpassagen erhalten bleibt, das heißt, eine weitgehende genetische Verankerung vorliegt. Schließlich war die Frage nach der Spezifität der Resistenz zu klären, wobei Untersuchungen über das Auftreten von Gruppen- oder Kreuzresistenz im Vordergrund standen.

### 5.1. Zur Einstufung der Resistenz

Zur Einstufung der Fungizidresistenz wird in vitro in der Regel die Grenzkonzentration benutzt, die ein Wachstum nicht mehr zuläßt. Sofern dieses Kriterium nicht gegeben ist, müssen andere Unterscheidungsmerkmale herangezogen werden, an denen die Höhe der Resistenz erkannt werden kann. Die von den Ausgangsstämmen b/1 und C6/1 im Zuge der Wirkstoffsteigerungsversuche erzielten Kolonien mit erhöhter Wirkstoffverträglichkeit waren dadurch charakterisiert, daß ihr Wachstum bereits bei Benomylkonzentrationen von mehr als 1 mg Wirkstoff/l unterblieb. Die durch Konidienaussaat und Selektion bei 0,2 mg MBC/l erzielten Kolonien von b/1, C1/1 und C6/1 wurden auf Nährböden mit 0,2, 0,4, 0,8 und



100 mg MBC/l angeimpft. Die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Wachstumsreaktion sind in Tabelle 11 wiedergegeben.

Tabelle 11: Wirkstoffverträglichkeit von jeweils 10 verschiedenen Kolonien (Selektion bei 0,2 mg MBC/l) der Stämme C6/1, C1/1 und b/1

Ausgangsstämme	Anzahl der Kolonien mit Wachstum auf MBC-Konzentrationen (mg/l) bis			
	0,2	0,4	0,8	100
C6/1	3	4	2	1
C1/1	8	-	-	2
b/1	7	2	-	1

Danach vermag die überwiegende Zahl der selektierten Kolonien lediglich bis zu 0,2 mg MBC/l zu wachsen. Jedoch etwa 10 Prozent der Isolate wuchsen auch auf MBC-Konzentrationen von 100 mg MBC/l und erwiesen sich somit als resistent.

Bei allen Isolaten mit erhöhter Wirkstoffverträglichkeit, die von den Ausgangsstämmen f/1, C3/1, C7/1 und C21/1 erzielt wurden, ergab sich bereits aus den Selektionsversuchen, daß sie bei MBC-Konzentrationen von 1 bzw. 100 mg/l wachsen konnten. Die Ausgangsstämme dagegen wurden bei 1 mg Wirkstoff/l annähernd vollständig gehemmt.

Alle diese resistenten Isolate wurden auf 100 mg MBC/l übertragen und zeigten bei dieser Konzentration deutlich sichtbares Wachstum. Die Ergebnisse einer Auswahl resistenter Stämme, die auch in die Untersuchungen zur Fungizidresistenz in vivo einbezogen wurden (Kapitel 7.3.), sind in Abb. 25 dargestellt.

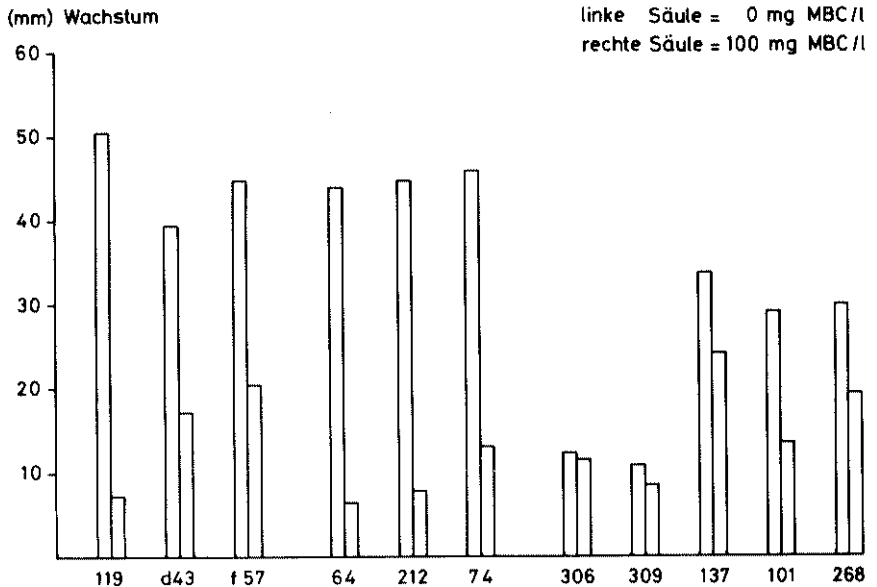
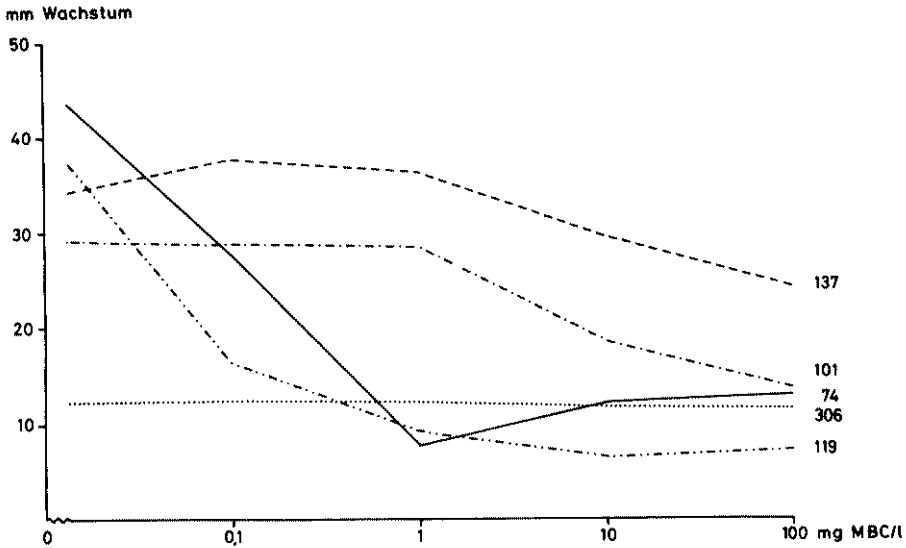


Abb. 25: Wachstumsraten verschiedener MBC-resistenter  
Stämme von *C. lindemuthianum* auf 0 und 100 mg  
MBC/l in PDA

Die Zuwachsraten in den Koloniedurchmessern liegen unter wirkstofffreien Verhältnissen im Bereich von 12 bis 51 mm und bei 100 mg MBC/l in PDA im Bereich von 7 bis 24 mm bei einer Wachstumsdauer von 10 Tagen.

Die geprüften Stämme lassen sich zunächst anhand ihrer Wüchsigkeit in eine Gruppe mit vergleichsweise hohen Wachstumsraten (119, d43, f57, 64, 212, 74), die etwa den Wachstumsraten der Ausgangsstämme entsprechen, und eine Gruppe mit geringerem Wachstum einteilen.

Diese resistenten Stämme wurden im weiteren auf ihre Wachstumsreaktionen auf abgestuften MBC-Konzentrationen überprüft. Die Ergebnisse einiger charakteristisch reagierender Stämme sind in Abb. 26 dargestellt.



**Abb. 26:** Wachstum verschiedener MBC-resistenter Stämme von *C. lindemuthianum* auf steigenden MBC-Konzentrationen (logarithmisch)

Daraus ist zu entnehmen, daß der Stamm 306 seine geringe Wachstumsrate über alle Konzentrationsstufen beibehält und die Stämme 101 und 137 bei mehr als 1 mg MBC/l geringfügig im Wachstum reduziert werden. Auffällig ist die starke Wachstumsdepression der Stämme 74 und 119 schon bei Fungizidkonzentrationen von unter 1 mg MBC/l.

Zur Klärung möglicher Zusammenhänge zwischen der Wachstumsrate auf fungizidfreien Nährböden und der Höhe der relativen Wachstumsreduktion bei hohen MBC-Konzentrationen (100 mg MBC/l) wurden bei 27 resistenten Stämmen entsprechende Untersuchungen vorgenommen und die Ergebnisse in Abb. 27 dargestellt.

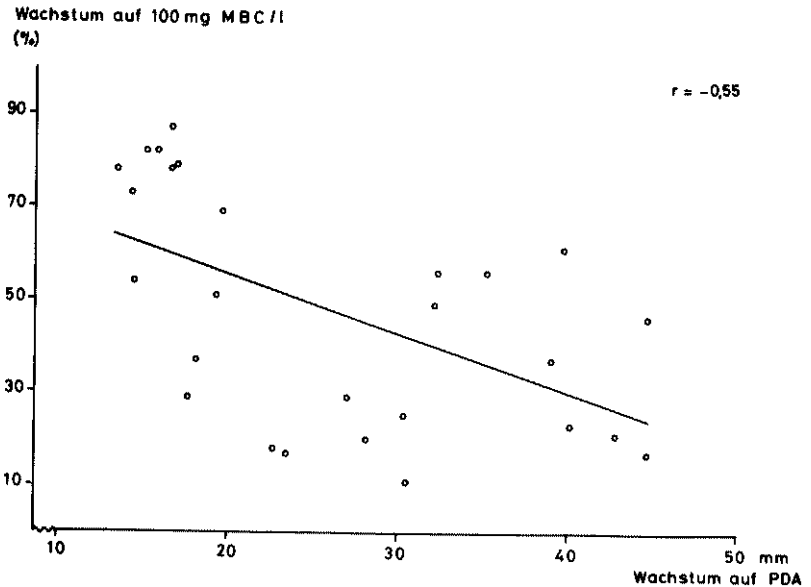


Abb. 27: Zusammenhang zwischen den Wachstumsraten von 27 MBC-resistenten Stämmen auf PDA und ihren relativen Wachstumsraten auf 100 mg MBC/l in PDA (Korrelationskoeffizient  $r = -0,55$ )

Daraus ergibt sich, daß resistente Stämme mit hoher Wachstumsrate im Regelfall einem stärkeren Stoffeinfluß durch eine Verminderung der Wachstumsrate unterliegen als schwachwüchsige Stämme. Resistente Stämme mit starkem Wachstum und nur geringer Wachstumsdepression unter Fungizidwirkung wurden nicht gefunden. Der wachstumsreduzierende Stoffeinfluß kann sich offensichtlich um so stärker auswirken, je größer die Zuwachsrate ist.

Die relative Wachstumshemmung bei einer bestimmten Wirkstoffkonzentration bezogen auf das Wachstum auf wirkstofffreien Medien kann als Maß für eine Abstufung in Resistenzgrade nicht benutzt werden, denn dadurch würde nur eine Rangfolge entsprechend der Wüchsigkeit der resistenten Stämme erzielt werden. Das bedeutet, daß eine Unterteilung der resistenten Stämme mit Wachstum auf Wirkstoffkonzentrationen über

1 mg MBC/l in Gruppen unterschiedlicher Resistenzhöhe nicht möglich ist.

Grundsätzliche Unterschiede oder unterschiedliche Verhaltensweisen zwischen den durch sukzessive Wirkstoffsteigerung aus der Mycelphase gewonnenen und den durch Massenselektion erzielten, resistenten Stämmen konnten nicht gefunden werden. Ebenso waren keine grundsätzlich unterschiedlichen Verhaltensweisen zwischen den unter Benomyl- und den unter Bavistin-Einfluß selektierten Stämmen zu erkennen.

## 5.2. Wuchseigenschaften resistenter Stämme

### 5.2.1. Mycelwachstum

Wie bereits aus den oben dargestellten Abb. 25 - 27 zur Einstufung der Resistenz hervorgeht, divergieren die Wachstumsraten der MBC-resistenten Stämme auf wirkstofffreien Nährböden sehr stark.

Nur einige Stämme erreichten auf PDA die Wachstumsraten der Ausgangsstämme oder übertreffen diese geringfügig. Der weitest- aus größte Teil zeigte eine deutlich geringere Wachsrates; nur einzelne Stämme sind besonders stark in ihrem Wachstum behindert. Diese Stämme zeigen im Randmycel deutlich verkrümmt, nicht gradlinig verlaufendes Hyphenwachstum. Hier scheinen die physiologischen Veränderungen infolge der Resistenzbildung einen erheblichen Einfluß auf deren Befähigung zum gerichteten Wachstum auf Nährböden zu haben.

Neben den unterschiedlichen Wachsrates ergab sich auch eine große Variationsbreite in den morphologischen Kolonienmerkmalen. Da die Ausgangsstämme von Colletotrichum auch bei vielen Passagen auf PDA in ihren morphologischen Merkmalen wie Pigmentierung, Luftmycelbildung und Formen des Kolonienrandes sehr beständig sind, können diese Merkmale auch zu einer Charakterisierung der resistenten Stämme herangezogen werden.

Die Beurteilung morphologischer Merkmale von 100 MBC-resistenten Stämmen des Ausgangsstammes f/1 nach 20tägiger Kultur auf PDA erlaubte folgende Gruppeneinteilung:

- Gruppe I Nur geringfügige Abweichungen vom Ausgangsstamm, starker Wuchs, schwarzes Substratmycel, mittelmäßig entwickeltes graues Luftmycel;  
(Anzahl der Stämme n = 15)
- II mittleres Wachstum, braun bis schwarzes Substratmycel, dichtes, hellgraues Luftmycel, Kolonienrand unregelmäßig;  
(n = 3)
- III mittleres Wachstum, hellgelbes bis dunkelbraunes Substratmycel, sehr geringe Luftmycelbildung, Kolonienrand unregelmäßig;  
(n = 21)
- IV geringes Wachstum, braun bis schwarzes Substratmycel, gering entwickeltes, dunkles Luftmycel, Kolonienrand gleichmäßig;  
(n = 15)
- V geringes Wachstum, braun bis schwarzes Substratmycel, mittelmäßig entwickeltes, hellgraues Luftmycel, Kolonienrand unregelmäßig;  
(n = 36)
- VI geringes Wachstum, hellbraunes Substratmycel, stark entwickeltes, weißes Luftmycel, Kolonienrand unregelmäßig;  
(n = 5)
- VII geringes Wachstum, hellbraunes Substratmycel, sehr geringe Luftmycelbildung, Kolonienrand gleichmäßig;  
(n = 5)

Einige der für die jeweiligen Gruppen typischen Kolonien sind als 20tägige Kulturen auf PDA in den Abb. 29 - 35 wiedergegeben. Abb. 28 stellt zum Vergleich den Ausgangsstamm f/1 dar.

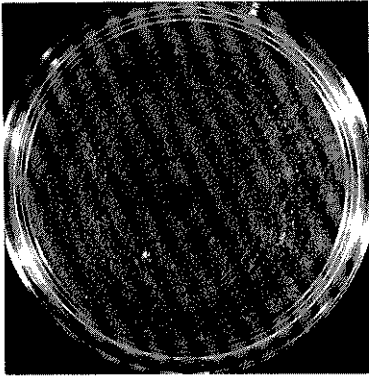


Abb. 28: Ausgangsstamm f/1

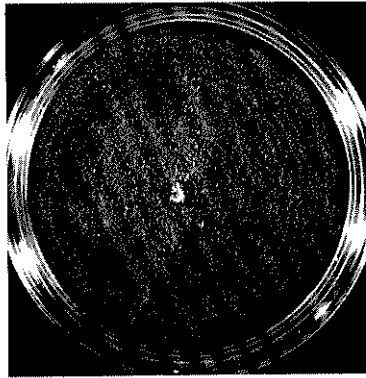


Abb. 29: Gruppe I, Stamm 31

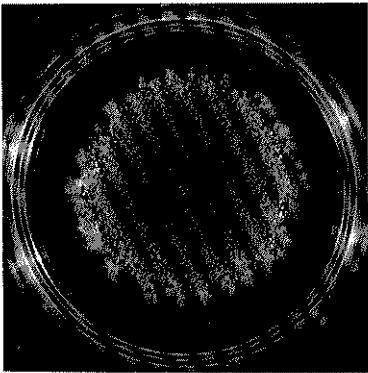


Abb. 30: Gruppe II  
Stamm 144

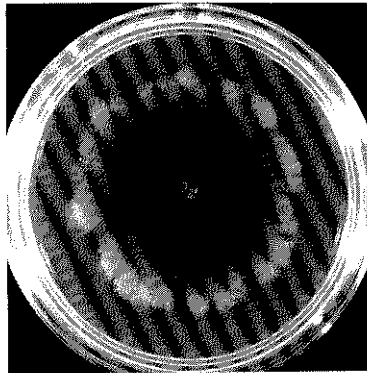


Abb. 31: Gruppe III  
Stamm 208

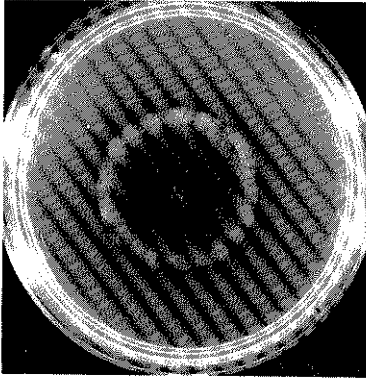


Abb. 32: Gruppe IV  
Stamm 178

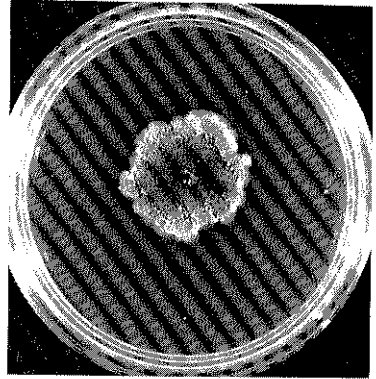


Abb. 33: Gruppe V  
Stamm 228

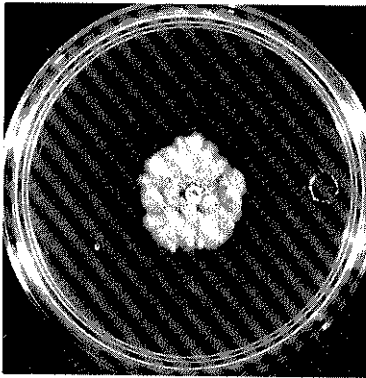


Abb. 34: Gruppe VI  
Stamm 219

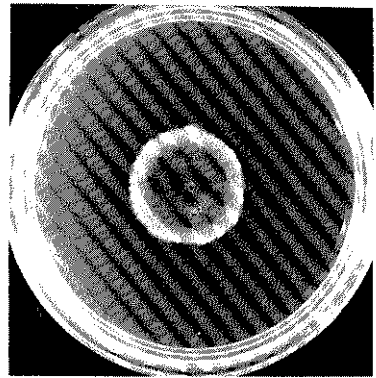


Abb. 35: Gruppe VII  
Stamm 143



In überwiegender Zahl sind unter den 100 überprüften Stämmen solche mit mittlerem bis geringem Wachstum (Gruppen II bis VII) vertreten. Auch bei den von anderen Ausgangsstämmen erzielten resistenten Stämmen überwiegen morphologisch sehr ähnliche, jedoch in der Wachstumsrate reduzierte Formen. Dies gilt insbesondere auch für die im Wirkstoffsteigungsverfahren gewonnenen Stämme.

#### 5.2.2. Konidienbildung und -keimung

Als weitere Merkmale zur Charakterisierung der resistenten Stämme können die Fähigkeit zur Konidienbildung und das Konidienkeimverhalten herangezogen werden.

Sowohl die Konidienbildung als auch die Vitalität der gebildeten Konidien sind von besonderer Bedeutung für die Potenz des Pilzes, eine Wirtspflanze befallen zu können.

Die in Kapitel 2.1.4. durchgeführten Untersuchungen zu den Kulturbedingungen und Wuchseigenschaften auf Nährböden haben gezeigt, daß die getesteten, normal-empfindlichen Stämme auf Glucose-Pepton-Agar (GPA) eine besonders starke Konidienbildung erreichen. Auf PDA, dem Standardnährboden zur Testung der Wachstumsraten, ist die Konidienbildung deutlich reduziert und tritt zum Teil erst nach weitgehender Erschöpfung des Substrates auf.

Zur visuellen Bonitierung der Bildung von Konidienschleim wurde eine Vielzahl von resistenten Stämmen als Mycelbewachsene Agarstücke auf GPA-Nährböden übertragen. Bei den durch das Wirkstoffsteigerungsverfahren selektierten Stämmen lag zum Teil eine verminderte Konidienbildung vor. Dies war jedoch keine spezifisch mit der Resistenzbildung verbundene Eigenschaft, denn derartige Vitalitätseinbußen traten allgemein nach längerem Wachstum auf Nährböden verbunden mit permanenten Mycelüberimpfungen auf. Nach Konidienüberimpfungen auf GPA trat nach kurzer Zeit wieder eine normale Konidienbildungsrate auf.

Bei den in morphologischen Gruppen eingeteilten 100 resistenten Stämmen des Ausgangsstammes f/1 ergab sich folgendes Bild:

Die Stämme der Gruppen I und II zeichneten sich durch eine dem Ausgangsstamm entsprechende normale Konidienbildung aus. Bei den 5 resistenten Stämmen der Gruppe VII fehlte eine Konidienbildung unter den genannten Bedingungen. Die Konidienbildung der Stämme in den übrigen Gruppen variierte sehr stark und ist zum überwiegenden Teil im Vergleich zur jeweiligen Wachstumsrate der Stämme überproportional reduziert.

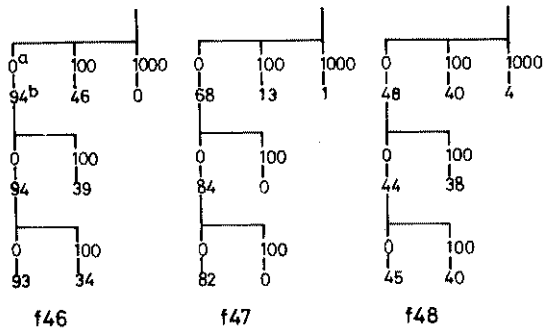
Die Untersuchung der Keimraten von Konidien resistenter Stämme wurde auf PDA- und GPA-Nährboden vorgenommen. Die Konidien keimten mit einer hohen, den Ausgangsstämmen vergleichbaren Keimrate. Dabei bildete ein hoher Anteil Keimschläuche aus, die ein normales weiteres Längenwachstum entwickelten. Eine geringe Konidienzahl erreichte lediglich eine übermäßige Volumenzunahme. Konidien, die auf wirkstoffhaltigen Nährböden gebildet wurden, zeigten ein ähnliches Keimungsverhalten.

### 5.3. Stabilität der Resistenz

Von besonderem Interesse für die Beurteilung der Resistenz und deren Entstehungsmechanismus war die Frage, ob die auf verschiedenen Wegen erzielten Stämme bei mehreren Wachstumspassagen auf wirkstofffreien Substraten in ihren Eigenschaften stabil sind.

Soweit adaptive Enzymsysteme an der Resistenzbildung beteiligt sind, muß mit einer allmählichen Rückbildung der Resistenz innerhalb weniger Wachstumspassagen gerechnet werden (GEORGOPOULOS und ZARACOVITIS 1967). Insbesondere bei den Benomyl-Steigerungsversuchen könnten Stämme mit adaptiver Resistenz entstanden sein.

Die nach dem Wirkstoffsteigerungsverfahren erzielten, resistenten Linien wurden auf ihre Resistenzveränderung im Anschluß an wirkstofffreie Nährbodenpassagen überprüft. Dabei erfolgten 2 Passagen von je 28 Tagen unmittelbar nach der Isolierung der Stämme. Für die Mycelübertragungen wurden bewachsene Agarscheiben aus den Kolonienrändern benutzt. In Abb. 36 sind zunächst die Ergebnisse der vom Ausgangsstamm f/1 erzielten, resistenten Kolonien dargestellt.



**Abb. 36:** Relative Wachstumsraten von 3 Benomyl-resistenten Linien f 46, f 47, f 48 der Herkunft f/1 vor und nach 2 wirkstofffreien Passagen auf PDA

<sup>a</sup> mg Benomyl/l

<sup>b</sup> relative Wachstumsraten

Während die Resistenz bei den Entwicklungslinien f 46 und f 48 unverändert beibehalten wurde, ging sie bei der Linie f 47 nach einer Passage vollständig verloren. Dabei fand eine spontane Veränderung im Wuchsbild und in der Wachstumsrate statt, wodurch angezeigt wurde, daß es sich hierbei wahrscheinlich um eine Rückmutation handelt.

In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der resistenten Linien von f/1 und diejenigen der Ausgangsstämme c/1 und d/1 zusammengestellt.

Von den insgesamt 9 überprüften Stämmen behielten 6 ihre Resistenz bei, während 3 Stämme auf das Niveau der Sensibilität der Ausgangsstämme zurückfielen.

Die von den Ausgangsstämmen b/1 und C6/1 im Wirkstoffsteigerungsverfahren erzielten 3 Stämme mit geringfügig erhöhter Wirkstoffverträglichkeit blieben in ihrer Reaktion und ihrem Wuchsbild bei 2 wirkstofffreien Passagen stabil.

Tabelle 12: Wachstum resistenter Linien im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen (c/1, d/1 und f/1) vor und nach Passagen auf wirkstofffreien Nährböden. (Messung der Koloniedurchmesser nach 10 Tagen; Angaben in % bezogen auf die Ausgangsstämme vor der 1. Passage auf wirkstofffreien Nährböden).

Stamm	vor der 1. Passage		nach der 1. Passage		nach der 2. Passage	
	0	100	mg Benomyl/l		0	100
	0	100	0	100	0	100
c/1	100	6	105	6	104	6
c 40	37	11	84	4	96	4
c 41	35	12	91	6	97	5
c 42	68	32	80	33	77	31
d/1	100	3	104	2	100	7
d 43	76	37	105	34	101	29
d 44	33	22	32	23	35	24
d 45	53	52	53	50	49	45
f/1	100	3	99	1	96	1
f 46	96	46	94	39	93	34
f 47	68	13	84	0	82	0
f 48	48	45	44	38	45	40

Als Beispiel für das Stabilitätsverhalten der aus der Konidialphase gewonnenen resistenten Kolonien sind in Tab. 13 die Wachstumsraten von 19 Benomyl-resistenten Kolonien nach der 1. bis 3. wirkstofffreien Nährbodenpassage zusammengestellt.

Tabelle 13: Stabilität der Resistenz gegen Benomyl bei 19 Stämmen im Verlaufe von 3 wirkstofffreien Nährbodenpassagen

<sup>a</sup> Wachstum in Relation zum Wachstum auf FDA in Prozent der 1. wirkstofffreien Nährbodenkultur

<sup>b</sup> mittlerer Koloniedurchmesser in mm nach 10 Tagen

<sup>c</sup> eine Passage umfaßt eine Wachstumszeit von 28 Tagen

Stamm Nr.	W a c h s t u m						
	vor den Passagen	nach wirkstofffreien Passagen <sup>c</sup>					
		I.		II.		III.	
	mg Benomyl/l in FDA						
100	0	100	0	100	0	100	
62	89 <sup>a</sup>	15,0 <sup>b</sup>	80 <sup>a</sup>	110 <sup>a</sup>	89 <sup>a</sup>	111 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>
24	88	14,5	75	88	87	105	86
44	85	14,8	80	128	96	107	88
36	82	18,0	67	108	69	109	75
49	81	13,5	77	107	85	106	78
31	69	31,8	54	102	51	101	49
59	62	17,5	58	116	53	104	38
42	55	32,3	52	105	58	100	56
74	45	38,0	44	107	32	103	38
58	39	16,0	36	95	32	110	32
61	37	26,0	25	101	26	104	30
53	33	36,0	1	110	1	105	2
52	27	35,3	1	113	1	105	1
47	23	29,0	10	102	10	97	19
64	23	39,5	19	107	20	102	23
57	22	42,0	12	105	18	102	21
70	22	24,3	14	107	16	97	16
19	19	30,5	19	91	19	166	0
54	17	21,8	15	103	15	104	19
f/1		37,0	1	112	2	105	1

In dieser Überprüfung zeigte sich ein spontaner, vollständiger Verlust der Resistenz bei den Stämmen Nr. 52 und 53 nach der 1. Passage und dem Stamm Nr. 19 nach der 3. Passage, wobei wiederum deutliche morphologische Veränderungen auftraten. Bei den übrigen Stämmen wurde die Resistenz in den 3 Passagen über einen Gesamtzeitraum von 3 Monaten beibehalten.

Neben Versuchsfehlerstreuungen von  $\pm 1$  mm bei der Messung der Koloniedurchmesser, welche insbesondere bei geringwüchsigen Kolonien zu großen Streuungen in den relativ dargestellten Wachsraten von bis zu  $\pm 7$  % führten, konnten nur in Einzelfällen geringe Wachstumsabnahmen auf 100 mg Benomyl/l im Laufe der Passagen gefunden werden. So war bei der Isolierung Nr. 59 im Laufe der 3 Passagen eine Abnahme der Wachstumsrate auf 100 mg Benomyl/l um 24 % zu erkennen. Da bei den Isolierungen der Kolonien sowie bei den Überimpfungen von Mycel ausgegangen wurde, ist nicht auszuschließen, daß erst im Laufe der Kultur eine Stabilisierung der morphogenetischen Eigenschaften des Isolates (und damit auch ihrer Wuchseigenschaft) stattfand.

Hin und wieder traten morphologisch sichtbare Habitusänderungen und Sektorenbildungen auf, bei denen es sich um genetische Aufspaltungen handelte, wie sie auch in der wirkstofffreien Nährbodenkultur als Folge von Mutationen vorkamen.

Die Abb. 37 zeigt die bei dem resistenten Stamm b 39 häufig vorkommende Abspaltung eines kräftig gelb gefärbten Sektors, der sich besonders stark vom dunklen Substratmycel der Restkolonie abhebt.

Die Überprüfung dieser gelb gefärbten Sektoren ergab, daß es sich hier um ebenfalls stabile Formen mit gleichartiger Resistenz handelt. Weitere bei verschiedenen resistenten Stämmen im Laufe der Kultur auf wirkstofffreien Nährböden auftretende stark-wüchsige Sektoren konnten in den meisten Fällen nach ihrem Wuchsbild dem Ausgangsstamm zugeordnet werden. Überprüfungen zeigten den Verlust der Wirkstoffresistenz an, so daß diese Veränderungen als Rückmutationen angesprochen werden konnten.

Abb. 38 zeigt eine solche Sektorenbildung beim Wachstum des Stammes b 38 auf PDA.



Abb. 37: Abspaltung eines gelb gefärbten Sektors vom Benomyl-resistenten Stamm b 39

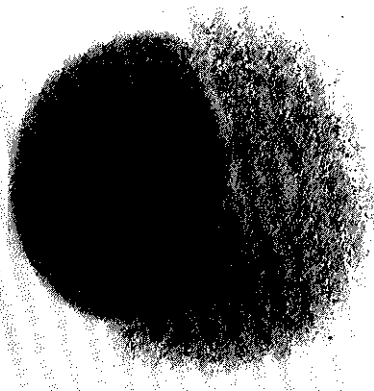


Abb. 38: Abspaltung eines Sektors vom Benomyl-resistenten Stamm b 38 in Folge einer Rückmutation

Die Stabilität der Resistenz von 6 Stämmen wurde auch nach mehreren Wirtspassagen überprüft, da nicht auszuschließen war, daß unter den andersartigen Wachstumsverhältnissen in vivo ein abweichendes Verhalten auftritt. Dazu wurden Bohnenpflanzen der Sorte 'Saxa' nach der Sprühinokulationsmethode (siehe Kap. 6.1.) infiziert, die Erreger von den befallenen Hypokotylen reisoliert, einer Zwischenvermehrung auf wirkstofffreien Nährböden unterzogen und erneut inokuliert. Nach der 2. Reisolierung erfolgte eine Überprüfung der Wachstumsraten auf wirkstoffhaltigen und -freien Nährböden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14:** Resistenzverhalten verschiedenartiger Stämme nach ein bzw. zwei Wirtspassagen gemessen am Wachstum auf 100 mg MBC/l in PDA

<sup>a</sup> Wachstum in mm in 10 Tagen

<sup>b</sup> Wachstum in Prozent des Wachstums vor der 1. Passage auf PDA

Stamm	vor der 1. Passage		nach der 1. Passage		nach der 2. Passage	
	mg MBC/l					
	0	100	0	100	0	100
64	43,3 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	103 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>	96 <sup>b</sup>	18 <sup>b</sup>
101	28,7	51	105	49	110	48
119	39,0	21	105	18	106	21
309	11,3	87	124	88	103	88
d43	33,5	40	94	35	93	39
f57	46,2	50	87	43	87	45

Bei allen 6 überprüften verschiedenartigen Stämmen blieb die Resistenz und auch das Kolonienwuchsbild unverändert erhalten. Die geringfügigen Abweichungen zwischen den entsprechenden Versuchsgliedern liegen im Bereich der Versuchsfehlerstreuungen.

#### 5.4. Beispiele für Gruppenresistenz

Der Wirkungsmechanismus der Benzimidazolfungizide beruht im wesentlichen auf dem Wirkstoff 2-(Methoxy-carbamoyl)-benzimidazol, kurz MBC genannt, der im Fungizid Bavistin unmittelbar vorliegt. Die Wirkstoffe der Fungizide Benomyl, Folcidin und Thiophanate M werden, wie bereits erwähnt, in wässrigen Suspensionen in Abhängigkeit von pH-Wert, von der Temperatur, der Einstrahlung und anderen Einflußgrößen in mehr oder weniger starkem Maße durch Seitenkettenabspaltung oder Molekülumlagerung in MBC umgewandelt. Der Wirkstoff Thiabendazol (TBZ) bleibt, soweit bekannt, in seiner zum MBC analogen Molekülstruktur erhalten. Aus diesen Erkenntnissen heraus



wurden zur Selektion resistenter Stämme ausschließlich die Fungizide Benomyl und MBC benutzt.

Bei stichprobenartiger Überprüfung des Verhaltens resistenter Stämme gegen andere Benzimidazolfungizide zeigte sich, daß die sowohl auf Benomyl- wie auch auf MBC-Resistenz selektierten Kolonien auch auf 100 mg AS/l der Fungizide Derosal, Folcidin, Thiophanate M und auch Thiabendazol zu wachsen vermögen. Es lag die Vermutung nahe, daß es sich bei der erzielten Resistenz um eine alle Benzimidazolfungizide umfassende Gruppenresistenz handelt.

Zur Bestätigung der Gruppenresistenz wurden die Wachsraten einer Auswahl morphologisch unterschiedlicher Wuchstypen resistenter Isolate, die von verschiedenen Ausgangsstämmen gewonnen wurden, auf äquimolaren Konzentrationen der Wirkstoffe von 523  $\mu\text{mol/l}$  (entspricht 100 mg MBC/l) erfaßt und die Ergebnisse in Tabelle 15 zusammengestellt.

Danach waren alle geprüften resistenten Stämme in der Lage, auf den genannten Konzentrationen von MBC, Benomyl, Folcidin und Thiophanate M zu wachsen und erwiesen sich als resistent. Gegen Thiabendazol waren 5 der 20 geprüften Stämme nicht resistent. Damit ist nachgewiesen, daß keine absolute Gruppenresistenz gegen Benzimidazolfungizide vorliegt, und die genetische Verankerung unterschiedlich sein kann. Darüber hinaus zeigten sich trotz der äquimolaren Wirkstoffmengen unterschiedliche Wachstumsraten. Dies dürfte eine Folge der verschieden ablaufenden Umsetzungsprozesse beim Benomyl, Folcidin und Thiophanate M sein. So ist vom Benomyl bekannt (HAMMVERSCHLAG und SISLER 1972, 1973), daß neben MBC auch weitere fungitoxische Verbindungen auftreten, die sich in diesen Untersuchungen offensichtlich auf die Wachstumsraten ausgewirkt haben.

Ebenso reagierten die einzelnen resistenten Stämme unterschiedlich auf die Fungizide. So konnte eine Gruppe mit gleichen Wachstumsraten auf MBC und Benomyl (obere Tabellenhälfte) und eine weitere Gruppe mit gegenüber MBC geringeren Wachstumsraten auf Benomyl (untere Tabellenhälfte) zusammengestellt werden. Der Stamm 200 zeigte dadurch ein beson-

deres Verhalten, daß unter Wirkstoffeinfluß ein stärkeres Wachstum als in der Kontrolle erreicht wurde.

Tabelle 15: Wachstum MBC-resistenter Stämme auf PDA mit 523 µmol/l der Fungizide MBC, Benomyl, Folcidin, Thiophanate M (TM) und Thiabendazol (TBZ)

Stamm	Wachstum nach 10 Tagen in % der Kontrolle					
	mm	MBC	Benomyl	Folcidin	TM	TBZ
200	3	345	336	336	382	282
219	17	79	82	92	92	46
228	17	78	77	97	100	41
f57	45	46	43	48	58	25
d43	36	30	33	27	41	30
74	45	20	24	23	30	26
212	45	17	15	15	21	16
64	44	15	12	13	23	20
119	38	12	11	14	23	16
309	11	78	49	68	88	28
306	13	61	51	71	92	26
323	40	61	37	48	77	22
144	35	56	40	48	64	22
165	15	54	40	43	67	38
137	38	37	21	26	60	18
143	14	78	37	54	70	1
268	30	64	23	24	26	0
199	19	51	32	49	52	3
101	31	46	15	23	59	0
208	31	25	15	16	31	0

### 5.5. Verhalten gegen weitere Fungizide

Die andersartigen Wirkungsmechanismen spezifisch wirkender, systemischer Wirkstoffe und anderer konventioneller Fungizide lassen eine über die aufgezeigte Gruppenresistenz hinausgehende Kreuzresistenz bei den MBC-resistenten Stämmen nicht erwarten, es sei denn, daß es sich bei der Resistenzbildung um eine vollkommen unspezifische Reaktion handelt, deren Ursache z.B. in einer allgemein verminderten Wirkstoffaufnahme liegt. Daneben ist denkbar, daß eine Veränderung des physiologischen Geschehens als Folge der Resistenzbildung gegen Benzimidazolfungizide Verschiebungen in der Sensibilität gegen einige andere Wirkstoffe herbeiführt. Von besonderer Bedeutung wären an dieser Stelle solche Sensibilitätsveränderungen, die auf Grund ihrer Größenordnung zu wesentlichen Veränderungen in der Bekämpfbarkeit der resistenten Stämme mit anderen Fungiziden führen könnten. Die Überprüfung der Wachstumspotenz resistenter Stämme bei Fungizidkonzentrationen, die im Grenzbereich der Wachstumshemmung der nicht-resistenten Stämme liegen, können am geeignetsten für die Beantwortung der aufgeworfenen Fragen herangezogen werden.

In entsprechenden Untersuchungen zeigten verschiedene resistente Wuchstypen der Ausgangsstämme f/1 und b/1 unter dem Einfluß von Tridemorph, Dichlofluanid, Captan oder TMTD keine deutlich abweichenden Reaktionen gegenüber den Ausgangsstämmen; lediglich bei einzelnen resistenten Stämmen schien eine geringfügig größere Fungizidempfindlichkeit gegeben zu sein.

## 6. Pathogenitätsprüfungen

Beim Auftreten von Fungizidresistenz ist von entscheidender Bedeutung, ob die Pathogenität auf der gleichen Stufe des Ausgangsmaterials erhalten geblieben ist. Die durch die Resistenzbildung bedingten physiologischen Veränderungen könnten zum Beispiel neben einem Verlust der Konidienbildung auch zur Verminderung oder zum Verlust der Pathogenität oder zu einer abweichenden Befallsreaktion auf bisher anfälligen Sorten führen. Daher wurden Pathogenitätsuntersuchungen an in-vitro erzielten, resistenten Stämmen vorgenommen. Dabei dienten gleichartige Untersuchungen zur Pathogenität der Erregerherkünfte sowie deren Einordnung in Rassen mittels eines Sortiments unterschiedlich anfälliger Buschbohnsorten als Ausgangsbasis.

### 6.1. Infektionsmethoden

Die besondere Anfälligkeit von Keimlingen und den Hypokotylen junger Bahnenpflanzen führte zu zwei unterschiedlichen Inokulationsmethoden.

#### Keimlingstauchmethode

Erste Pathogenitätsuntersuchungen wurden in Anlehnung an das Standardverfahren zur Prüfung der Brennfleckenresistenz, hier auch Keimlingstauchmethode genannt, durchgeführt. Nach dieser Methode wurden Bohnensamen für 2 Tage bei Zimmertemperatur auf feuchtes Filterpapier in geschlossenen Gefäßen ausgelegt. Bei den nach dieser Zeit mit einer 1 bis 3 cm langen Keimwurzel gekeimten Bohnen wurden manuell die Samenschalen entfernt. Anschließend wurden die Sämlinge für etwa 2 Minuten in Konidiensuspensionen mit in der Regel 100 000 Konidien/ml eingetaucht, in Töpfe oder Schalen mit Sand oder Torfkultursubstrat (TKS 1) ausgelegt und mit einer dünnen Substratschicht abgedeckt. Durch Feuchthalten des Substrats wurde die für Infektionen erforderliche hohe relative Feuchte erreicht. Die Aufstellung der Töpfe erfolgte bei etwa 15-25°C im Gewächshaus. Nach etwa 7 Tagen konnte eine Bewertung des Befalls vorgenommen werden.

### Sprühinokulationsmethode

Die geringe Eignung der Keimlingstauchmethode für protektive Fungizidanwendungen führte zur Benutzung einer weiteren Methode, die hier Sprühinokulationsmethode genannt wird, und die eine abgeänderte Form der von CHARRIER und BANNEROT (1970) beschriebenen Infektionsmethode darstellt. Danach wurden Bohnen in Töpfe oder Schalen in Substratmischung von TKS und Sand (1 : 1) ausgesät, wobei eine sorgfältige Aussaat, gute Feuchteführung und konstante Temperaturen zu gleichzeitigem und gleichmäßigem Saataufgang führten. Die Aufstellung der Schalen erfolgte in einem klimatisierten Kellerraum bei 20°C und 16 Stunden Beleuchtung bei 10 000 Lux (Philips TLF 40W/34). Etwa 8 Tage nach der Aussaat durchbrachen die Keimlinge die Substratoberfläche und wurden dann mit Hilfe eines Sprüngerätes (Desaga-Spray-Gun) mit Konidien-suspensionen von 100 000 Konidien/ml annähernd tropfnaß besprüht. Geeignete Infektionsbedingungen hinsichtlich der erforderlichen relativen Feuchte wurden durch Abdeckung der Gefäße für 48 Stunden mit durchsichtigen Polystyroldeckeln geschaffen. Die Befallsauswertung konnte 7 Tage nach der Inokulation vorgenommen werden. Wegen der konstanten Wachstumsbedingungen und des ungestörten Wachstumsverlaufs der Pflanzen sowie der gleichbleibenden Infektionsbedingungen ergaben sich gut reproduzierbare Befallsverhältnisse.

### Befallsbewertung

Zur Befallsbewertung konnten bei beiden Inokulationsmethoden etwa die gleichen Maßstäbe angelegt werden. 5 Tage nach der Inokulation zeigten sich erste Symptome durch eingesunkene Stellen am Hypokotyl. Diese längs verlaufenden, meist wenige mm großen Läsionen wurden dann meist sehr schnell nekrotisch und in ihnen zeigten sich Acervuli und schleimige Konidienmassen des Pilzes. Im Extremfall gelang es dem Parasiten, in kurzer Zeit das Hypokotyl vollkommen zu durchwachsen und die Pflanzen zum Umknicken und Eintrocknen zu bringen. Bei der Keimlingstauchmethode ging in Einzelfällen die Besiedlung des Wirtes so rasch vor sich, daß der Keimling nicht mehr aus dem Boden hervorbrechen konnte. Abb. 39 zeigt als Beispiel den Befall von Buschbohnen der Sorte 'Irol' zum Zeitpunkt der Auswertung.



Abb. 39: Befallsbild 7 Tage nach der Inokulation (Keimlings-  
tauchmethode)

Bei einzelnen Wirt-Parasit-Reaktionen traten an Stelle der aufgezeigten Symptome winzige bis etwa 2 mm lange nekrotische Flecke oft in großer Zahl auf. In diesen Flecken zeigten sich nur einige wenige Acervuli. Hier scheint der Abwehrmechanismus der Pflanze sehr schnell nach der Infektion die Ausbreitung des Erregers zu begrenzen. Daneben traten Symptome in Form größerer Befallsstellen an den Kotyledonen und in Form kleiner nekrotischer Flecke auf den Blattadern der Unterseite der Primärblätter auf.

Zur Befallsbewertung wurden jedoch wegen ihres gleichmäßigen Auftretens ausschließlich die Symptome an den Hypokotylen herangezogen und diese nach Zahl und Größe in einem Bonitierungsschema mit den Bonitierungszahlen 1 - 5 angeordnet.

#### Bonitierungsschema

- 1 kein Befall
- 2 einzelne bis viele, kleine nekrotische Flecke (kleiner als 2 mm im Durchmesser)
- 3 1 - 3 größere Befallsstellen (größer als 4 mm lang) je Hypokotyl
- 4 mehr als 3 größere Befallsstellen je Hypokotyl
- 5 Ausweitung der Befallsstellen über gesamten Hypokotyl-Umfang; innerhalb von 7 bis 10 Tagen sind die Pflanzen

völlig zusammengebrochen

Die Abbildungen 40 und 41 sollen die Zuordnung der Bonitierungszahlen zum aufgetretenen Befall veranschaulichen.

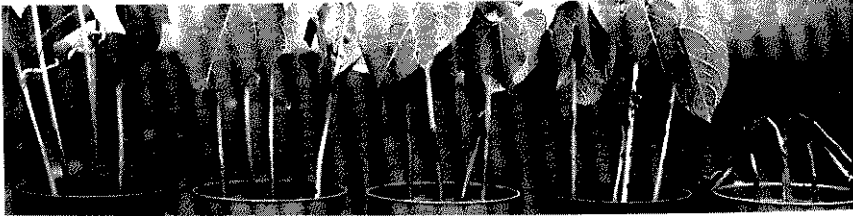


Abb. 40: Befallsbild nach der Sprühinokulationsmethode und Zuordnung der Bonitierungszahlen (von links (1) nach rechts (5) ansteigend)



Abb. 41: Hypokotylbefall; geordnet nach Bonitierungszahlen (von oben (1) nach unten (5) ansteigend)

## 6.2. Pathogenität und Rassendifferenzierung

Erste Versuche befaßten sich mit der Auswahl geeigneter Buschbohnsensorten für die Untersuchungen zur Pathogenität und zur Rassendifferenzierung. Nach diesen Untersuchungen erwiesen sich die Sorten 'Saxa', 'Hinrichs Riesen', 'Sotexa' und 'Irol' als gleichermaßen stark anfällig gegen alle geprüften Stämme. Für die Untersuchungen zur Pathogenität wurde vor allem die Sorte 'Saxa' benutzt.

Zur Überprüfung der Rassenzugehörigkeit der Wildherkünfte und der resistenten Stämme wurde das folgende Buschbohnenstassortiment \* ausgewählt. Die Reaktion der Testsorten auf die Inokulation mit den einbezogenen Rassen von *C. lindemuthianum* ist in Tabelle 16 zusammengestellt.

**Tabelle 16:** Reaktion von 5 Buschbohnsensorten nach Inokulation mit Rassen von *Colletotrichum lindemuthianum* (S = Befall vorhanden, R = kein Befall)

Sorte Stamm	Saxa (BB67)	Grandessa (BB65)	Noblessa (BB71)	Comtessa (BB70)	Wavero (BB85)
a/2 <sup>1</sup>	S	R	R	R	R
b/1	S	S	R	S	R
c/3 <sup>1</sup>	S	S	S	R	R
d/1	S	S	S	S	R
a-M/1	S	S	S	S	R
f/1	S	S	S	S	S

<sup>1</sup> Wegen des Verlustes der Konidienbildung bei a/1 und der Pathogenität bei c/1 in den Nährbodenpassagen der Sensibilitätsprüfungen mußten hier andere Stämme (a/2 bzw. c/3) der entsprechenden Rassen einbezogen werden.

Durch dieses Testsortiment lassen sich die in die Versuche einbezogenen Rassen mit Ausnahme von 'Delta' (d/1) und 'Alpha-Mutante' (a-M/1) differenzieren.

\* FrI.Dr.J.Krüger, Weihenstephan, danke ich Hinweise auf diese Testsorten.



### 6.2.1. Erregerherkünfte

Zur Darstellung der Pathogenität und der Rassenzugehörigkeit wurden die Wildherkünfte und die Stämme b/1, c/1, d/1, a-M/1 und f/1 nach der Sprühhinokulationsmethode mit 100 000 Konidien/ml auf jeweils 10 Sämlinge der Sorten 'Hinrichs Riesen', 'Grandessa', 'Comtessa', 'Noblessa' und 'Wavero' inokuliert.

Die Ergebnisse der Befallsauswertung sind in Tabelle 17 zusammengefaßt. Dabei wurde nach dem Bonitierungsschema (Kap.6.1.) eine Einzelpflanzen-Bewertung vorgenommen und der durchschnittliche Befallwert auf Grund der geringen Pflanzenzahl auf ganze Wertzahlen abgerundet.

Die Wildherkünfte sind nach dem Befall des Bohnentestsortiments in 2 Gruppen zu unterteilen. Die Stämme C1/1, C5/1, C6/1, C17/1 und C21/1 zeigen das rassenspezifische Verhalten von b/1 und müssen nach Tabelle 16 der Rasse 'Beta' zugeordnet werden. Die übrigen Wildherkünfte gehören entsprechend der Reaktion von d/1 und a-M/1 den Rassen Delta oder Alpha-Mutante an.

Die überwiegende Zahl der Stämme erreicht nahezu den maximal erreichbaren Pathogenitätsgrad. Nur bei einzelnen Stämmen ist die Pathogenität erkennbar schwächer. Dies betrifft nach den Befallszahlen auf den Sorten 'Hinrichs Riesen', 'Grandessa' und 'Comtessa' den Stamm C1/1 und auf 'Hinrichs Riesen' die Stämme C6/1 und C17/1. Der Stamm c/1 hat seine Pathogenität weitgehend verloren.

Tabelle 17: Befall der Buschbohnsensorten 'Hinrichs Riesen' (BB48), 'Grandessa' (BB65), 'Comtessa' (BB70), 'Noblessa' (BB71) und 'Wavero' (BB85) mit den differenzierten Rassen (b/1 - f/1) und den Wildherkünften (C1/1 - C21/1) von *Colletotrichum lindemuthianum*

	Hinrichs Riesen BB48	Grandessa BB65	Comtessa BB70	Noblessa BB71	Wavero BB85
b/1	4	4	3	1	1
c/1	2	1	1	1	1
d/1	4	4	4	4	1
a-M/1	5	5	5	5	1
f/1	4	5	4	5	5
C1/1	3	3	2	1	1
C2/1	5	5	5	4	1
C3/1	5	5	5	5	1
C4/1	5	5	5	4	1
C5/1	5	4	4	1	1
C6/1	2	5	4	1	1
C7/1	5	5	5	5	1
C8/1	5	5	5	5	1
C9/1	5	5	5	4	1
C10/1	5	4	5	5	1
C11/1	5	5	5	5	1
C16/1	4	5	5	4	1
C17/1	3	4	4	1	1
C21/1	4	5	5	1	1

### 6.2.2. Resistente Stämme

Die Überprüfung der Pathogenität der resistenten Stämme erfordert eine ausreichende Konidienbildung, die jedoch nach den in Kapitel 5.2.2. dargestellten Untersuchungen bei einigen Stämmen unter den üblichen Wachstumsbedingungen auf Glucose-Pepton-Agar nicht zu erzielen war. Daher konnten Stämme mit fehlender oder sehr geringer Konidienbildung keine Verwendung finden.

Von einer Auswahl von 12 resistenten Stämmen, die durch Selektion aus der Mycelphase gewonnen worden waren, zeigten 9 Stämme eine ausreichende Konidienbildung. Davon erwiesen sich jedoch nur 3 Stämme (d43, f57 und f58) als pathogen. Sie erreichten auf der anfälligen Bohnensorte 'Irol' nach der Keimlingstauchmethode jedoch nur verminderte Befallswerte.

Eine weitere Auswahl morphologisch verschiedenartiger resistenter Stämme von f/1, die durch Selektion aus der Konidialphase gewonnen wurden, erzielten zur Hälfte eine ausreichende Konidienbildung auf GPA-Nährboden. Die von diesen Stämmen auf der anfälligen Buschbohnsorte 'Sotexa' erzielten Befallswerte sind in Tabelle 18 zusammengestellt.

Tabelle 18: Pathogenität Benomyl-resistenter Stämme; Befallswertzahlen auf der Buschbohnsorte 'Sotexa'

Stamm Nr.	24	44	47	48	52	53	54	57	62	64	74	f/1
Befall	2	2	3	4	5	5	5	4	2	4	5	5

Im Vergleich zum Ausgangsstamm f/1, der die maximale Befallsziffer erreicht, vermögen 7 der 11 resistenten Stämme einen gleichartigen Befall (Bonitierungszahlen 4 und 5) hervorzurufen.

Nach diesen Beispielen kann im Zuge der Selektion sowohl eine vollständige oder teilweise Minderung der Pathogenität als auch eine Beibehaltung des ursprünglichen Pathogenitätsgrades auftreten. Zusammenhänge zwischen den speziellen Wuchsformen

Tabelle 19 a: Befall des Buschbohnenstammsortimentes durch eine Auswahl von 13 resistenten Stämmen im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen.

Abgerundete Befallswertzahlen aus 2-3 Wiederholungen mit jeweils 10 Bohnensämlingen; N = normal, L = langsam.

Ausgangs- stamm	Resistenter Stamm	Wachstum in vitro	Grandessa BB65	Comtessa BB70	Noblessa BB71	Wavero BB85
--------------------	----------------------	----------------------	-------------------	------------------	------------------	----------------

C3/1		N	5	5	5	1
	119	N	4	4	4	1
	137	L	5	4	5	1

C6/1		N	5	4	1	1
	101	L	4	4	1	1
	268	L	5	4	1	1

C21/1		N	5	5	1	1
	306	L	4	3	1	1
	309	L	2	3	1	1

Tabelle 19 b: Befall des Buschbohnenbestsortimentes durch eine Auswahl von 13 resistenten Stämmen im Vergleich zu ihren Ausgangsstämmen  
 Abgerundete Befallswertzahlen aus 2-3 Wiederholungen mit jeweils 10 Bohnensämlingen; N = normal, L = langsam.

Ausgangs- stamm	Resistenter Stamm	Wachstum in vitro	Grandessa BB65	Comtessa BB70	Noblessa BB71	Wavero BB85
f/1		N	5	4	5	5
	64	N	4	4	4	4
	74	N	5	5	5	5
	201	N	3	3	2	2
	212	N	4	4	5	5
	f57	N	4	4	3	4
d/1		N	4	4	4	1
	d45	N	2	2	3	1
c7/1		N	5	5	5	1
	323	N	4	3	3	1

der resistenten Stämme und deren Pathogenität konnten nicht gefunden werden. Zur Prüfung der Frage, ob sich durch die physiologischen Veränderungen in Folge der Resistenzbildung möglicherweise Veränderungen im Befallsspektrum des Testsortimentes ergeben haben, wurde eine Auswahl von 13 resistenten Stämmen, selektiert von 6 verschiedenen Ausgangsstämmen, auf ihre Pathogenität auf den Buschbohnsorten des Testsortimentes überprüft und deren Befallsreaktion mit der der entsprechenden Ausgangsstämme verglichen. Die Ergebnisse sind in Tab. 19 wiedergegeben.

Danach haben sich in der Rassenzuordnung keine Veränderungen ergeben. Außerdem zeigt sich in diesen Versuchen, daß die unterschiedliche Wüchsigkeit der resistenten Stämme in vitro keine wesentliche Wirkung auf den erzielten Pathogenitätsgrad hat, wie die Gegenüberstellung der Befallszahlen zur Einteilung der Stämme in eine Gruppe normalwüchsiger Formen (N) und eine Gruppe langsamwüchsiger Formen (L) zeigt.

### 6.2.3. Verhalten nach Wirtspassagen

Soweit eine Pathogenitätsminderung vorlag (Stämme 119, 306, 309, 323, d43, f57 und 201), wirkte sich diese auf alle anfälligen Bohnensorten etwa gleichermaßen aus. Inwieweit diese verminderte Pathogenität fixiert ist oder durch Wirtspassagen erhöht werden kann, zeigten Versuche, in denen 6 resistente Stämme nacheinander über 2 Wirtspassagen geführt wurden.

Dazu wurden Bohnen der Sorte 'Saxa' nach der Sprühinokulationsmethode infiziert. Nach 7 Tagen wurde von befallenen Stengeln reisoliert und das Reisolat nach einer Nährbodenpassage zur Gewinnung von Inokulat ein weiteres Mal inokuliert und reisoliert. Die Reisolatbeiden Passagen wurden in Reinigungsschritten auf Nährböden von Bakterien befreit und zusammen mit dem Ausgangsisolat in 2 Wiederholungen auf Bohnen der Sorte 'Saxa' infiziert. Die durchschnittlichen Befallswerte sind in Tabelle 20 zusammengestellt.

Tabelle 20: Befall der Bohnensorte 'Saxa' durch MBC-resistente Stämme vor und nach Wirtspassagen.  
(Durchschnittliche Bonitierungszahlen aus 2 Wiederholungen mit jeweils 10 Pflanzen)

Befall Stamm	vor der 1. Wirtspassage	nach der 1. Wirtspassage	nach der 2. Wirtspassage
64	3,9	3,8	3,9
101	4,2	4,4	4,5
119	3,1	2,6	2,7
309	2,0	2,1	2,0
d43	2,9	3,4	3,7
f57	3,2	3,6	3,6

Daraus kann entnommen werden, daß die vor Wirtspassagen auftretenden Pathogenitätsgrade auch nach zwei Wirtspassagen erhalten bleiben und damit als stabil gelten können. Damit ist nachgewiesen, daß neben der bereits aufgezeigten Stabilität der Wuchseigenschaften und der Fungizidresistenz der Stämme auch die gefundenen Pathogenitätsgrade in Wirtspassagen beibehalten werden.

#### 7. Auswirkung der Fungizidresistenz in vivo

Von besonderer Bedeutung für die Beurteilung der in vitro gebildeten Fungizidresistenz gegen Benzimidazolfungizide ist die Frage nach der Auswirkung dieser Resistenz in vivo. Daher wurden Infektionsversuche auf fungizidbehandelten Bohnen durchgeführt, die einerseits Zusammenhänge zu den bereits aufgezeigten Verhalten der resistenten Stämme auf Nährböden aufzeigen sollen und andererseits Angaben über die Bekämpfbarkeit solcher Stämme unter Feldbedingungen ermöglichen.

### 7.1. Methoden der Fungizidapplikation in vivo

Zur Prüfung der Fungizidresistenz in vivo wurden in Anlehnung an die Sprühinokulationsmethode zwei Wege zur protektiven Fungizidanwendung beschrrieben.

- I. Unter Ausnutzung der systemischen Eigenschaften wurde Bavistin in steigenden Konzentrationen gleichmäßig in die Aussaaterde eingemischt. Dadurch erfolgte von der Keimung bis zur Befallsauswertung eine kontinuierliche Wirkstoffaufnahme durch die zunehmende Durchwurzelung der Aussaaterde. Über das Wurzelsystem wird das MBC im Transpirationsstrom in die oberirdischen Pflanzenorgane transportiert und reichert sich im zeitlichen Verlauf in den Transpirationsendpunkten an. In den Stengeln findet eine relativ geringe Verlagerung des MBC ins Parenchym- und Epidermalgewebe statt. Durch die ständige Wirkstoffaufnahme ist jedoch auch im Hypokotyl während der Infektion und Inkubation eine Wirkstoffeinwirkung vorhanden.

Inokulation und Befallsauswertung erfolgten nach den bereits in Kapitel 6.1. dargestellten Verfahren.

Bei sehr hohen Wirkstoffkonzentrationen von mehr als 1000 mg MBC je 1 Aussaatsubstrat (TKS/Sand) wurde eine geringe Keimungs- und Wachstumsverzögerung bei der für diese Versuche benutzten Buschbohnsorte 'Saxa' festgestellt.

- II. Nach der zweiten Methode wurden die gekeimten Pflanzen wenige Stunden vor der Inokulation mit einem Fungizidbelag versehen. Dazu wurden die Keimlinge mit dem auch für Inokulationen benutzten Sprühgerät allseitig benetzt und nach dem Antrocknen des Belages auf die übliche Weise inokuliert.

Über die Primärverteilung hinaus erfolgt bei systemischen Fungiziden durch die teilweise Aufnahme der Wirkstoffe ins Gewebe eine systemische Sekundärverteilung.

Die Bewertung der Fungizidwirksamkeit in vivo wurde an Hand der auftretenden Läsionen nach dem Bonitierungs-schemata für Pathogenitätsabstufungen vorgenommen.



## 7.2. Fungizidnachweis in Pflanzenteilen

### Nachweismethode

Um einen Wirkstoffnachweis in den Hypokotylen der über das Aussaatsubstrat behandelten Pflanzen zu erbringen und Angaben über deren Konzentration zu erhalten, wurde eine biologische Nachweismethode benutzt. Grundlage dieser Methode stellt die Hemmzonenausbildung um ausgelegte, behandelte Pflanzenteile dar. Durch standardisierte Bedingungen kann zum Teil auch eine quantitative Aussage ermöglicht werden.

Die auf ihren Wirkstoffgehalt zu überprüfenden Hypokotyle der Keimlinge wurden geerntet und zunächst tiefgefroren, um das Gewebe durch die Kristallbildung teilweise zu zerstören und durchlässig zu machen. Die Hypokotyle wurden anschließend im gefrorenen Zustand in 5 mm lange Stücke geschnitten und diese jeweils längs auf Agarstreifen aufgelegt, wie dies aus Abb. 42 zu ersehen ist.

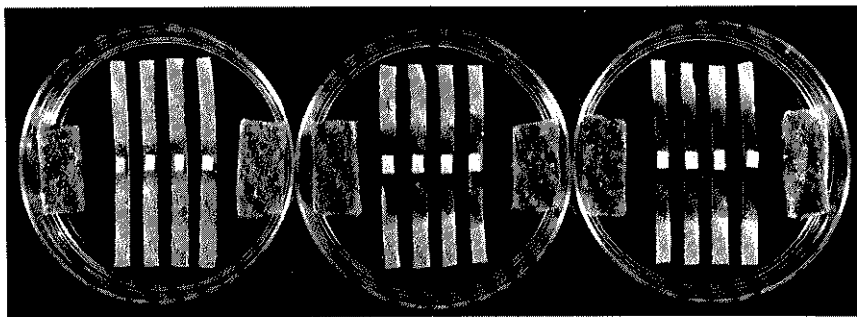


Abb. 42: Hemmzonen auf den Agarstreifen bei von links nach rechts ansteigenden MBC-Konzentrationen in den aufgelegten Hypokotylstücken; (Keim- und Wachstumshemmung von *Penicillium brevicompactum*)

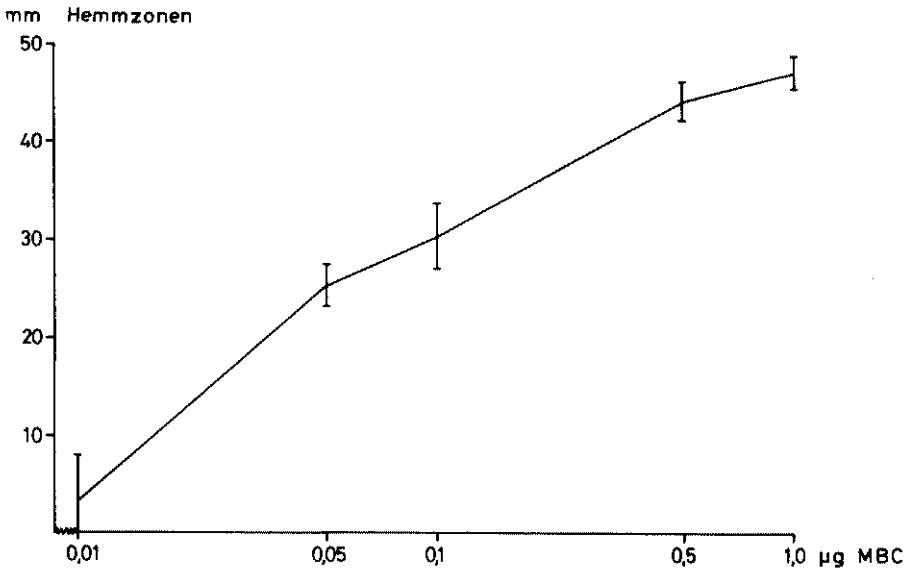
Die Agarstreifen wurden durch Zerschneiden von dünn gegossenen Nährböden in 5 mm breite und 60 mm lange Streifen erzielt. In die Randzonen der Schalen wurden jeweils 2 wassergetränkte Filterstücke gelegt, welche durch ihr Wasserpotential bei geschlossenen Petrischalen eine Austrocknung der Agarstreifen verhinderten. Die Streifen wurden anschließend mit Konidien-suspensionen des gegen MBC besonders sensiblen Pilzes *Penicillium brevicompactum* besprüht und 2 Tage bei 23°C inkubiert.

Durch die Diffusion des Wirkstoffs in die Agarstreifen bildet sich von den ausgelegten Hypokotylstücken ausgehend ein Konzentrationsgradient in beide Richtungen. Dadurch entstehen infolge Wachstumshemmung des Pilzes unbewachsene Zonen, die in ihrem Durchmesser von der Ausgangsmenge des Wirkstoffs abhängig sind. Mit Hilfe vorgegebener Wirkstoffmengen wurde eine Eichung vorgenommen.

#### Ergebnisse der Wirkstoffbestimmung

Die errechneten Rauminhalte der aufgelegten Hypokotylstücke betragen durchschnittlich 35 µl. Diese Stücke gaben eine Flüssigkeitsmenge von ungefähr 10 µl in die Agarstreifen ab. Die gleichen Flüssigkeitsmengen mit steigenden MBC-Konzentrationen wurden zur Erstellung einer Eichkurve an Stelle der Hypokotylstücke auf die Agarstreifen aufgetropft. Die aus den mittleren Hemmzonen bei steigenden Fungizidkonzentrationen erstellte Eichkurve, dargestellt in Abb. 43, kann zur Abschätzung der Fungizidmengen in den Hypokotylstücken herangezogen werden.

Unter den gegebenen Bedingungen wird die erwartete exponentielle Kurve nur in Annäherung erreicht. Dies zeigt sich in der halblogarithmischen Darstellung in dem nicht völlig gradlinigen Verlauf der Eichkurve.



**Abb. 43:** Abhängigkeit der Größe der Hemmzonen von den aufgetragenen MBC-Mengen

Bei den nach der Bodenbehandlungsmethode applizierten Fungizidmengen ergaben sich die in Tabelle 21 zusammengefaßten, mittleren Hemmzonen und die daraus abgeleiteten, mittleren Wirkstoffkonzentrationen in den Hypokotylen.

**Tabelle 21:** Hemmzonen und errechnete, mittlere Hypokotylnkonzentrationen (nach der Eichkurve) bei verschiedenen Bavistin-Applikationen (Einzelwerte aus 12 Hypokotylnstücken von jeweils 12 Pflanzen)

	Bodenbehandlung (mg/l Boden)			
	0	10	100	1000
Hemmzonen (mm)				
Mittelwert	0	3	18	36
Extremwerte		0 - 6	15 - 21	31 - 41
Hypokotylnkonzentration (mg/l)	0	0,3	1	5

### 7.3. Befall fungizidbehandelter Pflanzen

Zur Überprüfung der *in vitro* gefundenen Fungizidresistenz auf fungizidbehandelten Buschbohnen und zur Darstellung von Zusammenhängen zwischen dem Resistenzverhalten *in vitro* und *in vivo* wurde eine Auswahl resistenter Stämme von verschiedenen Ausgangsstämmen und der Ausgangsstamm f/1 benutzt.

Diese Stämme wurden nach dem üblichen Verfahren auf Keimlinge inokuliert, die mit dem Fungizid Bavistin nach der Bodenbehandlungsmethode mit den Konzentrationen 0, 10, 100 und 1000 mg MBC/l Boden oder mit einer Sprühbehandlung mit 250 und 1000 mg MBC/l behandelt worden waren. 250 mg MBC/l entspricht der üblichen Anwendungskonzentration von 0,05 % des 50 %igen Spritzpulvers Bavistin. Die Ergebnisse der Befallsauswertung sind in Tab. 22 dargestellt.

**Tabelle 22:** Befallsbewertungen von Bohnen der Sorte 'Saxa' nach Bavistin-Anwendungen und Inokulation mit resistenten Stämmen von *C. lindemuthianum* (abgerundete Mittelwerte aus 2 Wiederholungen mit je 5 Pflanzen pro Versuchsglied)

Stamm	Bodenbehandlung (mg MBC/l Boden)				Sprühbehandlung (mg MBC/l Brühe)	
	0	10	100	1000	250	1000
f/1	5	1	1	1	2	2
119	3	1	1	1	1	1
d43	2	1	1	1	1	1
f57	3	1	1	1	2	1
64	3	2	1	1	1	2
212	4	3	1	1	2	1
74	5	2	1	1	3	1
306	3	3	3	3	3	3
309	4	3	4	4	4	3
137	5	5	5	5	4	4
101	5	5	4	4	5	4
268	5	5	5	5	5	5

Der zum Vergleich inokulierte, nicht resistente Ausgangsstamm f/1 war bereits bei der niedrigsten Stufe der Bodenbehandlungen von 10 mg Wirkstoff/l Substrat nicht mehr in der Lage, Befallsflecke zu erzielen. Bei beiden Sprühbehandlungskonzentrationen traten jedoch bei den hohen Inokulatkonzentrationen in diesem Modellversuch einzelne, meist sehr kleine Befallsflecke an den Stengeln auf. Zur Bewertung der Fungizidresistenz in vivo mußten daher vor allem die bodenbehandelten Versuchsglieder herangezogen werden. Danach konnten die überprüften, resistenten Stämme in zwei Gruppen eingeordnet werden. In der ersten Gruppe wurden Stämme zusammengefaßt, die in diesen Versuchen keine über die Reaktion des sensiblen Ausgangsstammes f/1 hinausgehende Fungizidverträglichkeit aufwiesen (119, d43 und f57) und solche, die noch einen geringen Befall bei 10 mg Wirkstoff/l Boden erzielen konnten (64, 212 und 74).

Die Stämme der zweiten Gruppe (306, 309, 137, 101 und 268) erreichten in allen behandelten Versuchsgliedern einen annähernd gleichen Befall wie in der unbehandelten Kontrolle. Das heißt, die von 10 bis 1000 mg MBC/l Boden ansteigenden Wirkstoffmengen in den Hypokotylen führten bei diesen Stämmen zu keinerlei Befallsminderung. Auch die Sprühbehandlungen mit 250 und 1000 mg MBC/l bewirkten keinen Befallsrückgang. Bei den resistenten Stämmen 306 und 309, die in der Kontrolle nur verminderte Befallswerte erreichten, blieb der Befallsgrad über alle Dosierungen in gleicher Höhe erhalten. Die in diesen Untersuchungen gefundenen großen Unterschiede in der Wirkstoffverträglichkeit der resistenten Stämme waren zunächst anhand der Untersuchungen in vitro (Kap. 5.1.) nicht zu erwarten gewesen, denn alle hier einbezogenen Stämme vermochten auf Nährböden mit 100 mg MBC/l zu wachsen. Jedoch hatten sich bereits bei einer Testung der Stämme auf Nährböden mit Konzentrationen von 0,1 bis 100 mg MBC/l (Abb. 26) erste Anhaltspunkte für die hier deutlich gewordenen Resistenzunterschiede ergeben.

## 8. Verhalten resistenter Stämme in Mischpopulationen

Die bisher dargelegten Untersuchungen zu den Wuchseigenschaften in vitro, zur Pathogenität und zur Fungizidresistenz in vivo der resistenten Stämme beantworten nur zum Teil die Frage, ob diese ihren Ausgangsstämmen in Vitalität und Aggressivität ebenbürtig sind. Diese Frage ist aber von großer Bedeutung für die Übertragbarkeit der Ergebnisse der in vitro erzielten Resistenzbildung auf natürliche Verhältnisse und deren dortige Auswirkung.

Nach den Pathogenitäts- und Fungizidresistenz-Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, daß auf fungizidbehandelten Pflanzen einige der resistenten Stämme in der Lage sind, sich ungehindert auszubreiten und sich dadurch im Vergleich zu den fungizidempfindlichen Ausgangsstämmen einen Wachstumsvorteil zu verschaffen. Wie sich solche hochgradig pathogenen, resistenten Stämme unter wirkstofffreien Verhältnissen in Mischpopulationen mit ihren jeweiligen Ausgangsstämmen verhalten, sollte mittels folgender, zu diesem Zweck erarbeiteter Methodik überprüft werden.

### 8.1. Prüfverfahren

Von den jeweiligen Partnerstämmen (Ausgangsstamm/resistenter Stamm) wurden nach einer Nährbodenkultur auf GPA Konidien-suspensionen von 100 000 Konidien/ml im Mischungsverhältnis 1:1 hergestellt und damit Buschbohnen der Sorte 'Saxa' inokuliert.

Nach einer Infektionszeit von 5 Tagen, nach der erste Läsionen sichtbar wurden, erfolgte eine zweitägige Bedeckung der Pflanzen in den Saatschalen, um durch die dadurch erzeugte, hohe relative Feuchte das rasche, völlige Zusammenbrechen der Pflanzen hinauszuzögern und die unter diesen Bedingungen verstärkt auftretende Konidienbildung auf den befallenen Stengeln auszunutzen.

Diese Konidien wurden dadurch gewonnen, daß 5 der meist über die gesamte Länge besiedelten Hypokotyle nach der zweitägigen

Feuchtphase geerntet und kurz in 100 ml Wasser geschüttelt wurden. Die daraus gewonnenen Konidiensuspensionen wurden nach ihrer Verdünnung auf die üblichen 100 000 Konidien/ml auf Bohnenkeimpflanzen aufgesprüht. Durch dieses Verfahren konnte eine Nährbodenzwischenkultur umgangen werden. Derartige Wirtspassagen wurden mit jeweils 40 Pflanzen mehrfach hintereinander durchgeführt.

Ausgehend von den Konidiensuspensionen für die jeweilige erneute Inokulation dienten entsprechende Prüfungen der Feststellung der Anteile der einzelnen Partner in den Mischsuspensionen. Dazu wurden die Konidiensuspensionen im Verhältnis 1 : 25 in einer Antibiotikallösung, bestehend aus 150 mg/l Streptomycinsulfat, 500 mg/l Terramycin-HCl und 500 mg/l Neomycin verdünnt und jeweils 1 ml auf GPA-Nährböden in Petrischalen ausgesät. Der Antibiotikazusatz verhinderte die Bakterienvermehrung auf den Nährböden, ohne die Konidienkeimung zu beeinträchtigen. Nach der Keimung wurden wahllos 100 Konidien isoliert auf PDA-Nährboden übertragen und nach einer kurzen Wachstumsdauer durch Mycelüberimpfung auf ihre Fungizidresistenz überprüft.

## 8.2. Populationsveränderungen in Wirtspassagen

Als Mischungspartner zu den Ausgangsstämmen f/1, C3/1 und C6/1 wurden einige der jeweils aus ihnen entstandenen resistenten Stämme mit ebenfalls hohen Pathogenitätsgraden ausgewählt. Es wurden für die erste Inokulation folgende Konidienmischungen hergestellt:

Ausgangsstamm	+	resistenter Stamm
f/1	+	74
C3/1	+	137
C6/1	+	101
C6/1	+	268

Die resistenten Stämme 137, 101 und 268 besitzen nach den Ergebnissen in Tabelle 22 eine hochgradige Fungizidresistenz in vivo.

Mit diesen Kombinationen wurden 4 direkt aufeinanderfolgende Wirtspassagen durchgeführt und nach der 2., 3. und 4. Passage

Die Mischungsverhältnisse der Partner bestimmt. Dabei wurden jeweils 100 Einzelkonidialkulturen angelegt und deren Reaktion nach Mycelüberimpfung auf Nährböden mit 0 und 100 mg MBC/l überprüft. Bei den Mischungen C3/1 - 137, C6/1 - 101 und C6/1 - 268 unterschieden sich die resistenten Partner von ihren Ausgangsstämmen bereits durch ihre unterschiedlichen Wuchsformen auf wirkstofffreien Nährböden deutlich voneinander. Dies wird auch aus den Abb. 44 und 45 ersichtlich. Bei den Stämmen f/1 - 74 ist auf wirkstofffreiem Nährboden eine Unterscheidung weder am Wuchs bild noch an der Wachstumsrate möglich, wie Abb. 46 links zeigt.

Abb. 44 - 46: Wachstum von einigen nach Wirtspassagen reisollierten sensiblen und MBC-resistenten Einzelkonidialkulturen auf 0 (links) und 100 (rechts) mg MBC/l in PDA

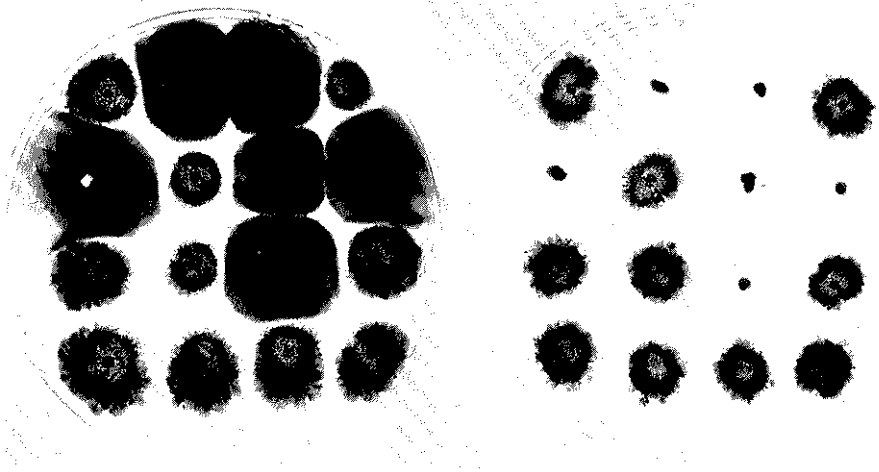


Abb. 44: Mischung aus C3/1 (S) und 137 (R)



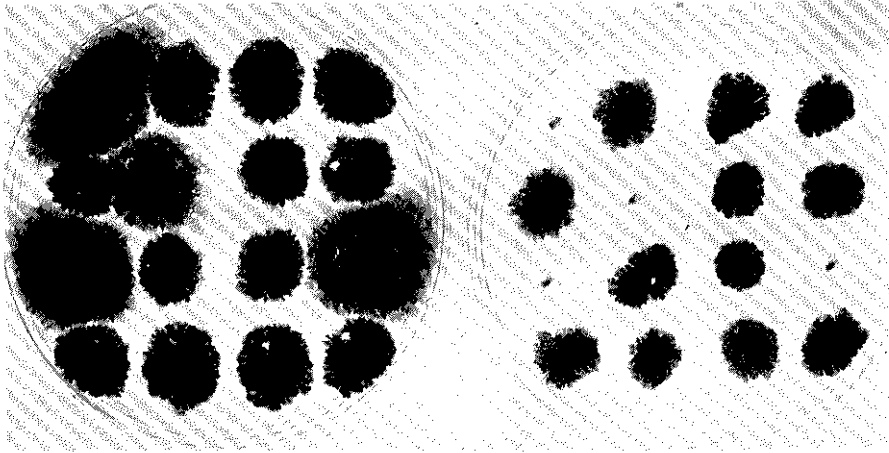


Abb. 45: Mischung aus C6/1 (S) und 101 (R)

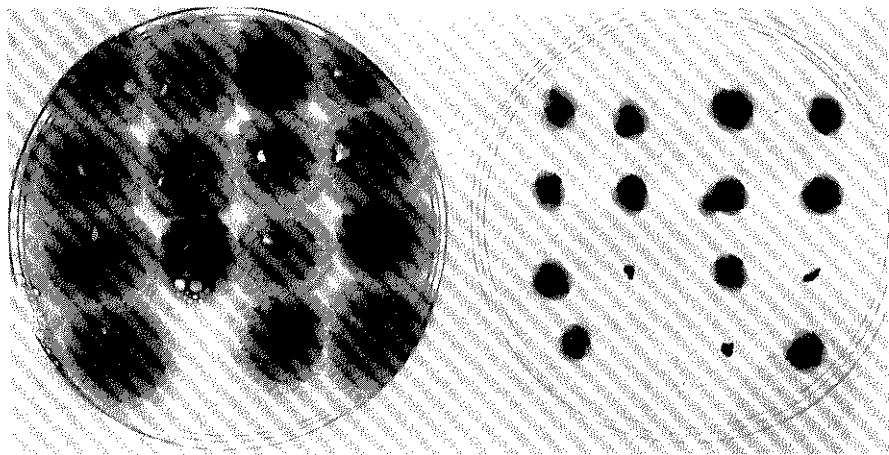


Abb. 46: Mischung aus f/1 (S) und 74 (R)

Daher mußte in jedem Fall auf fungizidhaltige Nährböden überimpft werden (siehe Abb. 46 rechts), während bei den weiteren Kombinationen eine Überimpfung nur zur Bestätigung durchgeführt wurde.

Die völlige Parallelität von morphologischen Unterschieden zwischen den Mischungspartnern und deren Reaktion auf wirkstoffhaltigen Nährböden erlaubt die Feststellung, daß alle gekeimten und in der Kontrolle zu Kolonien herangewachsenen Konidien des resistenten Partners ihre Resistenz beibehalten haben.

Die in diesen Untersuchungen gefundenen Mischungsverhältnisse nach der 2. bis 4. Wirtspassage sowie die Mischungsverhältnisse nach der 4. Wirtspassage einer Wiederholung des Versuches sind in Tabelle 23 zusammengestellt.

Danach wurden die 4 überprüften resistenten Stämme in Mischpopulationen mit ihren Ausgangsstämmen in mehreren Wirtspassagen auch unter fehlendem Fungizideinfluß nicht eliminiert. In den Mischungen 74:f/1, 101:C6/1 und 268:C6/1 blieben die resistenten Partner nach 4 Wirtspassagen in einem erheblichen Anteil erhalten.

Tabelle 23: Anzahl der Isolierungen und relative Anteile der Mischungspartner (Mischungen aus MBC-resistenten Stämmen und deren Ausgangsstämmen; 74:f/1; 137:C3/1; 101:C6/1; 268:C6/1)

	Anzahl der Iso-lierungen	Anteile 74:f/1 (%)	Anzahl der Iso-lierungen	Anteile 137:C3/1 (%)	Anzahl der Iso-lierungen	Anteile 101:C6/1 (%)	Anzahl der Iso-lierungen	Anteile 268:C6/1 (%)
vor der 1. Passage	-	50:50	-	50:50	-	50:50	-	50:50
nach der 2. Passage	89	76:24	92	61:39	96	63:37	95	65:35
nach der 3. Passage	45	22:78	112	76:24	110	65:35	108	69:31
nach der 4. Passage	115	50:50	125	6:94	113	60:40	111	68:32
nach der 4. Passage*	81	78:22	111	1:99	79	32:68	108	26:74

\* Ergebnis einer Versuchswiederholung

## 9. Diskussion

Als Prüfmethode zur Bestimmung der Sensibilität von Pilzstämmen *in vitro* wurde in den vorliegenden Untersuchungen die auf das wachsende Mycel einwirkende Fungizidapplikation benutzt. Diese Methode eignet sich vor allem deshalb, weil bei curativen Anwendungen systemischer Fungizide ebenfalls Einwirkungen auf das in der Pflanze wachsende Mycel des Parasiten in Form einer Wachstumsreduktion oder Mycelabtötung eintreten. *In-vitro*-Versuche können im allgemeinen als Maßstab für die Wirksamkeit der Fungizide zur Bekämpfung des Parasiten *in vivo* herangezogen werden, da auch dort ein direkter Stoffeinfluß auf den Parasiten vorliegt. Nur bei einzelnen als systemische Fungizide nutzbaren Verbindungen, wie zum Beispiel 6-azauracil (DEKKER 1962) findet erst durch den Metabolismus der Pflanze eine Umwandlung in fungitoxische Metabolite statt. Inwieweit jedoch durch die andersartigen Ernährungs- und Wachstumsverhältnisse auf Nährböden veränderte Einwirkungsmöglichkeiten der Wirkstoffe auf den Metabolismus des Parasiten gegeben sind, kann nur in vergleichenden Untersuchungen zur Sensibilität *in vivo* geklärt werden. Die in den Untersuchungen angewandten Methoden zur Prüfung der Sensibilität und Resistenz *in vitro* wurden in ähnlicher Form auch von anderen Autoren benutzt (BOLLEN und FUCHS 1970; SNEL et al. 1970; EDGINGTON et al. 1966, 1971; BOLLEN 1972).

Von natürlichen Verhältnissen wesentlich abweichende Wirkungsmöglichkeiten der Fungizide *in vitro* sind offensichtlich nur unter extremen Temperatur- und pH-Werten vorhanden. Autoklavieren von Nährböden (20 Minuten bei 121°C) führt z.B. beim Benomyl zur vollständigen Umlagerung in das thermostabile MBC. Hinsichtlich geeigneter pH-Werte fanden BARTELS-SCHOOLEY und MAC NEILL (1971) bei *Fusarium oxysporum* auf Minimalmedien bei konstanten Benomyl-, Thiazobenzazol- und Fuberidazolkonzentrationen eine von pH 4 bis pH 8,6 zunehmende Wachstumshemmung, die ihre Ursache in der zunehmenden Aufnahme in Folge sinkender Ionisierung der Wirkstoffmoleküle bei steigenden pH-Werten haben soll. Nach eigenen mit anderen Nährböden bei *Colletotrichum lindemuthia-*

num durchgeführten Überprüfungen ist lediglich unter pH 4,5 eine merkliche Wirkungsminderung festzustellen, so daß bei den in allen Nährbodenversuchen zugrundegelegten pH-Werten von pH 5,4 bis 5,6 eine vollständige Wirksamkeit der Fungizide vorausgesetzt werden kann.

Die bei *Colletotrichum lindemuthianum* eintretenden morphologischen Auswirkungen der Behandlungen mit Benzimidazolfungiziden stimmen weitgehend mit den von RICHMOND und PRING (1971) an *Botrytis fabae* unter Benomyleinwirkung gemachten Beobachtungen überein. Sie fanden bei keimenden Konidien von *Botrytis* unter Benomyleinfluß geschwollene, verdrehte und stark verzweigte Keimschläuche. Ihre zytologischen Untersuchungen zeigten, daß eine Desorganisation der Zellorganellen vorlag und das endoplasmatische Retikulum sowie auch die Zellkerne ein abnormales Aussehen aufwiesen. Nach eigenen mikroskopischen Untersuchungen treten bei *C. lindemuthianum* unter der Einwirkung aller Benzimidazolfungizide gleichermaßen bei Konzentrationen oberhalb der  $ED_{50}$ -Werte zunehmend sowohl im Randmycel wachsender Kolonien wie auch bei Keimhyphen lokale Anschwellungen und Hyphenverdrehungen auf. Auch die bei der Konidienkeimung von *C. lindemuthianum* festgestellte starke Volumenzunahme verbunden mit einer unterdrückten Keimschlauchbildung deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen von CLEMONS und SISLER (1971), die bei Konidien von *Neurospora crassa* bei 1 mg MBC/l innerhalb von 24 Stunden eine Zunahme des Trockengewichtes um das 12fache, aber keine Keimschlauchbildung feststellten. Die Messung der DNS-Gehalte ergab bereits nach 8 Stunden eine komplette Hemmung der Synthese. Nach den morphologischen Auswirkungen vermag bei beiden Pilzarten der Wirkstoff offensichtlich in derselben Weise in den Metabolismus einzugreifen. Entsprechend der gefundenen Gleichartigkeit der Hyphenveränderungen dürften allen Benzimidazolfungiziden identische Wirkungsmechanismen zugrunde liegen. Dies wurde beim Benomyl und Thiophanate M wegen ihrer Umlagerung in MBC auch erwartet und durch die auftretende Gruppenresistenz, bei welcher jedoch das Thiazobenzodazol nicht bei allen resistenten Stämmen eingeschlossen ist, untermauert. Die fungistatische Wirkung der Benzimidazolfungizide steht in direktem Zusammenhang mit deren primär

nur auf Synthesevorgänge beschränkter Einwirkung (SIJPESTEIJN 1970). Im strengen Sinne müßte man danach die genannten Benzimidazolwirkstoffe nicht als Fungizide sondern als Fungistatika bezeichnen.

Bestimmungen der Wachstumshemmung von Pilzkolonien auf Nährböden mit Zusatz von Benzimidazolfungiziden wurden von BOLLEN und FUCHS (1970), BOLLEN (1972) und EDGINGTON et al. (1971) zur Aufstellung von Wirkungsspektren bei mehreren Pilzarten durchgeführt und an Hand der  $ED_{50}$ -Werte die Arten in Gruppen unterschiedlicher Fungizidempfindlichkeit geordnet. BOLLEN und FUCHS (1970) stuften Pilzarten mit  $ED_{50}$ -Werten von unter 10 mg Benomyl/l als fungizidempfindlich, solche über 10 mg Benomyl/l als tolerant oder resistent ein und konnten damit weitgehende Übereinstimmung mit den seinerzeit aus der Literatur bekannten Angaben zur Wirksamkeit in vivo aufzeigen.

Wie die eigenen Untersuchungen bei *C. lindemuthianum* zeigten, liegen die  $ED_{50}$ -Werte aller getesteten Ausgangsstämme gegen Benzimidazolfungizide unter 0,6 mg AS/l. Sie können nach der Gruppeneinteilung von BOLLEN und FUCHS (1970) als sehr sensibel eingestuft werden. Die Wirkung steigender Fungizidkonzentrationen auf die Wachstumsrate wird in Dosis-Effekt-Kurven dargestellt, die eine differenzierte Aussage erlauben. Diese Kurven geben durch ihren Verlauf die Gesamttoleranz des aus vielen einzelnen Hyphen bestehenden Thallus an. Es konnte gezeigt werden, daß sich durch eine Probit-Transformation und logarithmische Darstellung der Konzentrationen gegen den Wirkstoff MBC in Annäherung Geraden ergeben. Eine entsprechende mathematische Transformation benutzten auch GROVER und CHOPRA (1970) um die Wirkung systemischer Fungizide auf das Kolonienwachstum von *Rhizoctonia*-Arten darzustellen.

Vergleiche zwischen den Ausgangsstämmen bezüglich ihrer Sensibilität wurden im Konzentrationsbereich der  $ED_{50}$ -Werte vorgenommen, da sich anhand der Dosis-Effekt-Kurven gezeigt hatte, daß in diesem Bereich im allgemeinen die größten Sensibilitätsunterschiede auftraten. Die danach ermöglichte Bildung zweier Gruppen von *Colletotrichum*-Stämmen mit unterschiedlicher Sensibilität gegen Benzimidazolfungizide in

vitro erschien zunächst von untergeordneter Bedeutung, da die gefundenen Unterschiede bei normalen Fungizidanwendungen in vivo von 250 mg MBC/l nicht zum Tragen kommen, es sei denn, daß sich in den Grenzbereichen wirksamer Konzentrationen (0,05 bis 0,5 mg AS/l) geringe Unterschiede ergeben. Eine größere Bedeutung kam den Sensibilitätsunterschieden dadurch zu, daß Stämme mit besonders hoher Empfindlichkeit der Rasse Beta zuzuordnen waren. Es ist ungewöhnlich, daß sich eine besondere Sensibilität gegen Fungizide auf bestimmte Rassen beschränkt. Interessanterweise reagierten die Stämme der Rasse Beta auch gegen den im Wirkungsmechanismus abweichenden Wirkstoff Tridemorph besonders sensibel, jedoch nicht gegen Dichlofluanid und Captan, so daß diese Reaktion weder als eine wirkstoffspezifische Eigenschaft angesehen werden kann, noch als eine generell höhere Sensibilität gegen "Chemikalien" aufzufassen ist. Die höhere Sensibilität dieser Gruppe wirkte sich, wie noch zu erörtern sein wird, auch negativ auf die Resistenzbildung aus.

Eine Resistenzbildung gegen Fungizide war bisher aus der Literatur sowohl als Folge genetischer Veränderungen als auch durch physiologisch bedingte Adaptation bekannt geworden. Die Versuche zur Erzielung einer Resistenz bei *Colletotrichum lindemuthianum* waren deshalb auf beide Möglichkeiten abgestellt worden.

Die im Wirkstoffsteigerungsverfahren bei anfänglichen Benomylkonzentrationen von 0,1 und 0,2 mg AS/l sich abzeichnende, kontinuierlich verlaufende Wachstumssteigerung deutete zunächst auf eine Adaptation an den Wirkstoff hin. Durch abgestufte Konzentrationssteigerungen konnten steigende Wachstumsraten auf gleichen Konzentrationen wie auch Wachstumserfolge auf den erhöhten Wirkstoffkonzentrationen gemessen werden. Dieses Verfahren führte über 5 Monate bei den zur Rasse Beta gehörenden Stämmen zu einer wenig erhöhten Wirkstoffverträglichkeit und bei Stämmen anderer Rassen zu einem deutlichen Wachstum auch auf 100 mg Benomyl/l. Neben der kontinuierlich verlaufenden Wachstumssteigerung erfolgten in einzelnen Kolonien spontane Wachstumssteigerungen, die zum Teil als Sektoren sichtbar wurden, so daß auch Mutationen

als Ursache der Resistenzbildung in Betracht kamen. In anschließenden wirkstofffreien Passagen ging die erworbene Wirkstoffverträglichkeit zum Teil in der ersten Passage verloren oder blieb stabil.

Die vorgefundenen Verhältnisse hinsichtlich des stabilen Verhaltens erlauben nur die Schlußfolgerung, daß genetische Veränderungen zur Resistenzbildung geführt haben. Es muß angenommen werden, daß die kontinuierlich gestiegenen Wachstumsraten in diesem Wirkstoffsteigerungsverfahren durch eine Anreicherung mutierter resistenter Kerne im wachsenden Thallus eingetreten sind. In Einzelfällen konnten sich offenbar mutierte resistente Kerne rasch vermehren, wodurch Sektorenbildung eintrat. In den Fällen, in denen in wirkstofffreier Kultur sofort ein vollständiger Verlust der Resistenz zu verzeichnen war, kann angenommen werden, daß Rückmutationen aufgetreten sind, die sich im allgemeinen auf Grund ihrer höheren Wachstumsrate rasch durchsetzten. Solche traten gelegentlich auch nach längerer Kultur bei resistenten Stämmen auf fungizidfreiem Substrat auf. Darüber hinaus ist jedoch auch denkbar, daß sich bis zum Zeitpunkt der Mycelüberimpfungen auf wirkstofffreie Nährböden trotz des vorhandenen Selektionsdruckes heterokaryotische Verhältnisse erhalten haben, die sich auf wirkstofffreien Nährböden zugunsten der sensiblen Kerne entmischt haben. Als bemerkenswert erwies sich in diesen Untersuchungen das Verhalten der besonders sensiblen Beta-Stämme. Sie erreichten lediglich eine geringfügig erhöhte Wirkstoffverträglichkeit, wichen jedoch in ihrer Stabilität in wirkstofffreien Passagen von den übrigen resistenten Stämmen nicht ab, so daß ihre Entstehung ebenfalls auf genetische Veränderungen zurückgeführt werden muß.

In gleichartigen Untersuchungen von RICHARDSON (1973) bildeten sich bei *Fusarium solani* unter dem Selektionsdruck von Benzimidazolfungiziden durch Mutationen offensichtlich sehr leicht resistente Sektoren, die in wirkstofffreier Kultur schwachwüchsig, aber stabil waren. Nur in geringer Rate entstanden Rückmutationen. In ähnlichen Wirkstoffsteigerungsverfahren, die von THANASSOULOPOULOS et al. (1971) bei *Fusarium oxysporum* durchgeführt wurden, konnten deutliche Toleranzerhöhungen gegen den Wirkstoff Benomyl festgestellt werden.



Über die Stabilität der Toleranzerhöhung wurden jedoch keine Angaben gemacht. Eine als Adaptation bezeichnete Resistenzbildung des heterokaryotischen Pilzes *Rhizoctonia solani* an erhöhte Konzentrationen von Benomyl, Thiophanate M, Chloroneb und PCNB wurde vor kurzem von KATARIA und GROVER (1974) beschrieben.

Resistente Stämme konnten auch durch eine Massenauslese aus der Mycelphase unter hohem Selektionsdruck innerhalb weniger Tage erreicht werden. Durchschnittlich aus einem Zehntel der auf fungizidhaltige Nährböden übertragenen Mycelbewachsenen Agarscheiben bildeten sich resistente Mycelteile heraus. Daraus könnte in folgender Weise die Mutationsrate errechnet werden:

Unter der Voraussetzung, daß bei geschätzten Kernzahlen von  $10^6$ /je bewachsene Agarscheibe jede zur Resistenz führende Mutation auch zur Ausprägung kommt, ergibt sich eine Mutationsrate von  $1 \cdot 10^{-7}$ , welche mit der einer Massenselektion aus Konidien in Annäherung übereinstimmt. Die resistenten Kolonien verhielten sich in Stabilität und Wuchseigenschaften wie die durch das Wirkstoffsteigerungsverfahren erzielten Kolonien.

In den Untersuchungen zur Massenselektion aus der Konidialphase wurden Entstehungsraten resistenter Kolonien von  $1 \cdot 10^{-6}$  bis  $1 \cdot 10^{-7}$  registriert. Mutagene UV-Behandlungen steigerten die Raten um etwa der Faktor 9. Wenn davon ausgegangen wird, daß bereits ein Mutationsschritt in den einkernigen Konidien zur Resistenz führen kann, so sind die Entstehungsraten mit den Mutationsraten gleichzusetzen. Die Größenordnung dieser Entstehungsraten, die im Bereich der Mutationsraten für morphogenetische und auxotrophe Hinmutationen liegen (ESSER und KUENEN 1967), weist auf eine 1-Gen-Mutation als Ursache der Resistenzbildung von *C. lindemuthianum* gegen Benzimidazolfungizide hin.

Eine Veränderung der Mutantenausbeute in Abhängigkeit von den Benomylkonzentrationen in den Nährböden konnte im Bereich von 1 bis 300 mg Wirkstoff/l nicht festgestellt werden, so daß die von SEILER (1972, 1973), SEILER und LIMACHER (1973) und von DASSENOY und MEYER (1973) beobachtete mutagene Wirkung von Benomyl auf Bakterien-Arten und *Fusarium oxy-*

sporum unter den überprüften Versuchsbedingungen nicht in Erscheinung trat.

Bei der Massenselektion wirkte sich die erhöhte Ausgangssensibilität von Stämmen der Rasse Beta negativ auf die Resistenzbildung aus. Dies zeigte sich daran, daß lediglich 2 resistente Stämme bei Konzentrationen von mehr als 1 mg MBC/l selektiert werden konnten. Bei Konzentrationen von 0,2 mg MBC/l entwickelten sich Kolonien mit gesteigerter Wirkstoffverträglichkeit in Raten von  $2 \cdot 10^{-6}$  bis  $4 \cdot 10^{-6}$  nach UV-Bestrahlungen. Von diesen vermochte jedoch nur 1/10 auch auf Wirkstoffkonzentrationen von mehr als 1 mg MBC/l zu wachsen und konnte damit als resistent angesprochen werden. Unter Berücksichtigung der Stabilität aller selektierten Kolonien unter wirkstofffreien Verhältnissen muß angenommen werden, daß bei diesen Stämmen Mutationen zu einem geringeren Teil zur Resistenz führen.

Andere Autoren kamen bei Konidien-Massenselektion auf Resistenz gegen Benzimidazolfungizide und Dodine zu ähnlichen Ergebnissen (BARTELS-SCHOOLEY und MAC NEILL 1971; POLACH 1973; MAC NEILL und SCHOOLEY 1973; VAN TUYL et al. 1974; BEN-YEPHET et al. 1974). BARTELS-SCHOOLEY und MAC NEILL (1971) selektierten aus Konidienmassen von *Fusarium oxysporum* in einer Rate von  $1,2 \cdot 10^{-8}$  Benomyl-resistente Stämme und konnten durch eine UV-Behandlung die Rate um mehr als das 100fache steigern. VAN TUYL et al. (1974) fanden bei *Aspergillus nidulans* nach UV-Behandlung Benomyl-resistente Stämme in einer Rate von  $1,5 \cdot 10^{-7}$ . Darüber hinaus konnten HASTIE und GEORGOPOULOS (1971) bei *Aspergillus nidulans* verschiedene 1-Gen-Mutationen als Resistenzursache nachweisen. VAN TUYL et al. (1974) bestätigen das Vorliegen von 1-Gen-Mutationen bei *Aspergillus nidulans*.

Neben zum Teil auftretenden morphologischen Abweichungen der resistenten Stämme von *C. lindemuthianum* gegenüber dem jeweiligen Ausgangstyp zeigte sich überwiegend auch eine geringere Wüchsigkeit in vitro, die eng mit der Resistenzhöhe verbunden zu sein scheint. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, daß resistente Stämme mit normalen Wuchsraten auf fungizidfreien Nährböden im unteren

Konzentrationsbereich (unter 1 mg MBC/l) einer Wachstumsreduktion unterliegen, während schwachwüchsige Stämme bei diesen Konzentrationen nicht beeinflußt werden.

Entsprechend der Gleichartigkeit der Wirkungsmechanismen erwies sich die vorliegende Resistenzbildung als Gruppenresistenz gegen Bavistin, Derosal, Benomyl, Folcidin und Thiophanate M. Eine geringe Zahl MBC-resistenter Stämme zeigte jedoch keine Resistenz gegen Thiabendazol. Damit ist nachgewiesen, daß die genetische Verankerung der Resistenz unterschiedlich sein kann. Eine Gruppenresistenz einschließlich Thiabendazol wurde mehrfach festgestellt (BOLLEN und SCHOLTEN 1971; BOLLEN 1971; GRIFFEE 1973; HASTIE und GEORGOPOULOS 1971). VAN TUYL et al. (1974) fanden gelegentliches Auftreten einer fehlenden Kreuzresistenz zwischen Benomyl- und Thiabendazol-resistenten Stämmen bei *Aspergillus nidulans*. In Kreuzungsexperimenten wiesen sie nach, daß es sich hierbei um selten auftretende Mutationen innerhalb desselben Gens handelt.

Wesentliche Toleranzveränderungen gegen andersartige Wirkstoffe konnten bei den resistenten Stämmen von *Colletotrichum lindemuthianum* nicht festgestellt werden. BOCHOW et al. (1971) sprechen dagegen von aufgetretener Kreuztoleranz zwischen systemischen und protektiven Fungiziden.

Die Pathogenitätsuntersuchungen mit resistenten Stämmen von *Colletotrichum lindemuthianum* auf Buschbohnen zeigten ein breites Spektrum unterschiedlicher Reaktionen. Es lagen Stämme mit geringer wie auch mit normaler Virulenz vor. Soweit eine Verminderung der Pathogenität eingetreten war, blieb diese auch über mehrere Wirtspassagen erhalten und zeigte dadurch, daß sie offensichtlich genetisch bedingt ist. Eine Änderung des rassenspezifischen Verhaltens war bei keinem der überprüften Stämme mit der Resistenzbildung verbunden. Die stark unterschiedlichen Wachstumsraten resistenter Stämme auf Nährböden wirkten sich in vivo nicht aus, denn auch schwachwüchsige Stämme erreichten zum Teil hohe Befallswerte. Das läßt vermuten, daß die Wachstumsraten in vitro erst unter einer hier nicht erfaßten Schwelle in vivo zur Auswirkung kommen, oder daß unter den anders-

artigen Ernährungsbedingungen in vivo möglicherweise keine unterschiedliche Entwicklung der Stämme gegeben ist.

Nur wenige Autoren haben über Pathogenitätsprüfungen der in vitro selektierten, resistenten Stämme berichtet, so daß kaum Vergleiche zu den Verhältnissen bei anderen Pilzarten möglich sind. Von einer teilweise, aber nicht generell auftretenden Pathogenitätsminderung sprechen BOCHOW et al. (1971) bei *Fusarium solani*. KAPPAS und GEORGOPOULOS (1971) zeigten, daß bei 4 von 6 Dodine-resistenten Stämmen von *Netria haematococca* die vorliegende, reduzierte Pathogenität durch ein unabhängig mutiertes Gen bedingt wird, und kein pleotropher Effekt durch die Resistenzbildung vorliegt.

In eigenen Untersuchungen, in denen einige der resistenten Stämme von *C. lindemuthianum* auf ihre Fungizidresistenz in vivo überprüft wurden, ergaben sich unterschiedliche Resistenzabstufungen dadurch, daß ein Teil der Stämme lediglich reduzierte Fungizidkonzentrationen tolerierte. Die übrigen Stämme wurden dagegen durch normale und überhöhte Fungizidanwendungen in ihrer Befallsentwicklung nicht beeinträchtigt. Die genannte, reduzierte Resistenz in vivo steht in Einklang mit den Ergebnissen entsprechender Untersuchungen in vitro, in welchen sich zeigte, daß bei derartigen Stämmen bereits im niedrigen Konzentrationsbereich (0,1 bis 1 mg MBC/l) eine Wachstumsreduzierung vorlag. Offenbar verstärkt sich unter den andersartigen Wachstumsverhältnissen in vivo der zunächst von geringer Bedeutung erscheinende Wirkstoffeffekt auf Nährböden erheblich.

Darüber hinaus konnte bei 4 resistenten Stämmen gezeigt werden, daß sie in Mischungen mit ihren ebenso pathogenen Ausgangsstämmen durchaus in der Lage sind, sich in mehreren wirkstofffreien Passagen in einer Population anteilmäßig zu erhalten. Bei *C. lindemuthianum* ist also eine Resistenzbildung möglich, ohne daß der Pilz zugleich einen Verlust an Vitalität oder Fitness erleidet.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sprechen dafür, daß bei *C. lindemuthianum* auch unter Freilandverhältnissen eine Resistenzbildung eintreten kann, wie sie bei der verwandten Art *C. musae* inzwischen bekannt wurde (GRIFFEE 1973). Auch

kann aus den vorliegenden Untersuchungen entnommen werden, daß eine Resistenz unter wirkstofffreien Verhältnissen nicht innerhalb kurzer Zeit eliminiert wird.

Die weiteren, seit Beginn der vorliegenden Untersuchungen bekannt gewordenen Resistenzbildungen gegen Benzimidazol-fungizide unter natürlichen Gegebenheiten weisen nach, daß ähnliche Verhältnisse hinsichtlich des Auftretens resistenter, pathogener Stämme bei einer Reihe anderer phytopathogener Pilze möglich sind (HARDING 1972; KOOISTRA et al. 1972; VARGAS 1972; BERGER 1973; EHRENHARDT et al. 1973; BURTH 1973; GEORGIOPOULOS und DOVAS 1973; GOLDENBERG und COLE 1973; JARVIS und HARGRAVES 1973; LAMBERT und WUEST 1973; PROVVIDENTI und HUNTER 1973; SMITH 1973; VARGAS 1973; WATSON und KOONS 1973; GRIFFEE und BURDEN 1974; MAGIE und WILFRET 1974; MILLER und FLETSCHER 1974; RUPPEL und SCOTT 1974; WUEST et al. 1974). Auch gegen die systemischen Fungizide Dimethirimol (PROVVIDENTI und HUNTER 1973, Ethirimol (WOLFE und DINOOR 1973) und Dodine (SZKOLNIK und GILPATRICK 1973; POLACH 1973; GILPATRICK und BLOWERS 1974) sind weitere Resistenzbildungen bekannt geworden.

Es sollten zukünftig Anstrengungen unternommen werden, die Fähigkeit der zu bekämpfenden phytopathogenen Pilze zur Bildung einer effektiven Wirkstoffresistenz bereits vor dem breiten Einsatz neuer Fungizide abzuklären. Diese Untersuchungen über die Resistenzbildung bei *Colletotrichum lindemuthianum* gegen Benzimidazol-fungizide sind u.a. ein Beitrag zur Methodik der notwendigen Bewertung von Fungiziden.

## 10. Zusammenfassung

1. Die mit der Resistenzbildung phytopathogener Pilze gegen einige systemische Fungizide verbundenen, vielfältigen Fragestellungen hinsichtlich der Resistenzmechanismen, der charakteristischen Eigenschaften resistenter Stämme und deren Bedeutung für den Pflanzenschutz führten zu den vorliegenden Untersuchungen zur Resistenzbildung von *Colletotrichum lindemuthianum* gegen Benzimidazolfungizide.

2. In die Arbeiten zur Fungizidempfindlichkeit und Resistenzbildung wurden neben differenzierten Rassen (Alpha, Beta, Gamma, Delta, Alpha-Mutante und Rasse 'Ebnet') auch 14 Feldisolate dieses gegen Benzimidazolfungizide sensiblen Pilzes einbezogen.

3. Die Benzimidazolfungizide (MBC, Benomyl, Thiophanate M, Folcidin und Thiabendazol) reduzierten in vitro das Mycelwachstum und führten zu Hyphendeformationen. Das Volumen der Konidien war unnormal auf das Mehrfache vergrößert und das Wachstum der zum Teil noch gebildeten, kurzen Keimschläuche nahezu vollständig blockiert.

4. Zwischen den *Colletotrichum*-Herkünften zeigten sich im Keimverhalten der Konidien und in quantitativen Untersuchungen zu den Mycelwachstumsraten auf fungizidhaltigen Nährböden zum Teil erhebliche Sensibilitätsunterschiede. Als besonders empfindlich gegen Benzimidazolfungizide erwiesen sich die der Rasse Beta zugehörenden Herkünfte, was sich vor allem in dem schon bei sehr niedrigen Konzentrationen vollständig gehemmten Wachstum äußerte. Diese Reaktion war gegen alle Benzimidazolfungizide gleichermaßen festzustellen, so daß auf gleichartige Wirkungsmechanismen geschlossen werden kann. Bezogen auf das Mycelwachstum der verschiedenen Herkünfte lagen die  $ED_{50}$ -Werte unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei MBC und Benomyl bei 0,05 bis 0,15 mg AS/l.

5. Bei den zum Vergleich herangezogenen Fungiziden (Tridemorph, Dichlofluamid und Captan) ergaben sich nur gegen den systemischen Wirkstoff Tridemorph erhebliche Sensibilitätsunterschiede zwischen den Herkünften, wobei u.a. ebenfalls die Beta-Stämme besonders empfindlich reagierten.

6. Eine Resistenz kann im allgemeinen durch Adaptation oder durch genetische Veränderungen entstehen. Bei Anwendung von Wirkstoffsteigerungsreihen traten sowohl Stämme mit leicht erhöhter Benomyl-Verträglichkeit als auch resistente Stämme auf. Durch Massenselektion nach Animpfung von Mycel und Konidien auf MBC- bzw. Benomyl-haltige Nährböden konnten ebenfalls resistente Stämme erzielt werden. Die Häufigkeitsrate nach Animpfung von Konidien betrug  $1 \cdot 10^{-6}$  bis  $1 \cdot 10^{-7}$ . Mutagene UV-Bestrahlungen steigerten die Entstehungsraten resistenter Stämme.

7. Die resistenten Stämme zeigten auf Nährböden mit Konzentrationen von 1 bis mehr als 100 mg Wirkstoff/l deutliches Wachstum. Einige der Formen, die aus Stämmen der Rasse Beta selektiert wurden, erreichten Wachstum nur bis zu Konzentrationen von etwa 0,8 mg MBC/l, was den Schluß nahelegt, daß die höhere Sensibilität der Beta-Stämme sich nachteilig auf die Resistenzbildung auswirkt.

8. Auf Grund der Größenordnung, mit der resistente Stämme auftraten, sowie deren stabiles Verhalten in wirkstofffreien Wachstumsperioden müssen in allen Fällen Mutationen als Ursache der Resistenzbildung angenommen werden. Hinweise auf adaptive Veränderungen waren nicht zu ermitteln. In geringer Zahl traten Rückmutationen auf, so daß die Fungizidresistenz auch bei kurzfristiger Passage über wirkstofffreie Nährböden verlorenging.

9. Am Beispiel eines Ausgangsstammes war eine Einteilung von 100 daraus abgeleiteten, resistenten Stämme in 7 morphologische Gruppen möglich. Während eine Gruppe keine wesentlichen Abweichungen in Kolonienmerkmalen und Wuchsraten vom Ausgangsstamm aufwies, war bei den übrigen Gruppen eine verminderte Wachsrates festzustellen.

10. Die Resistenz gegen MBC und Benomyl schloß stets eine solche gegen Folcidin und Thiophanate M ein. Zusätzlich war bei der Mehrzahl der resistenten Stämme das Thiabendazol in die Gruppenresistenz einbezogen. Bei einigen Stämmen lag auf Grund ihrer Sensibilität gegen Thiabendazol offenbar keine genetische Kopplung vor.

11. Pathogenitätsuntersuchungen auf Bohnenkeimpflanzen führten zu dem Ergebnis, daß etwa die Hälfte der überprüften, resistenten Stämme eine ihren Ausgangsstämmen entsprechend hohe Pathogenität beibehielten. Andere Stämme konnten entweder wegen ihrer stark reduzierten Konidienbildung in vitro nicht untersucht werden oder sie zeigten eine verminderte Pathogenität, die sich auch nicht durch mehrere Wirtspassagen steigern ließ. Eine Reduktion der Pathogenität als Folge der geringeren Wüchsigkeit resistenter Stämme in vitro trat nicht in Erscheinung. Alle überprüften resistenten Stämme zeigten auf einem Bohnentestsortiment die ursprüngliche Befallsreaktion, d.h. der Rassencharakter war unverändert erhalten geblieben.

12. Die Auswirkung der Resistenz in vivo wurde durch Inokulation fungizidbehandelter Bohnenkeimpflanzen untersucht. Bei MBC-Anwendungen über das Aussaatsubstrat diente ein Biotest zum Wirkstoffnachweis in den Hypokotylen. Bei 5 von 11 Stämmen erbrachten auch überhöhte Fungizidanwendungen keinen Bekämpfungserfolg. In 6 Fällen wirkte sich jedoch die in vitro gefundene Fungizidverträglichkeit während der pathogenen Phase kaum merklich aus.

13. Anhand einiger, resistenter Stämme mit hoher Fungizidresistenz in vivo konnte gezeigt werden, daß sie ihren Ausgangsstämmen offenbar in ihrer Vitalität ebenbürtig sind, da sie in Mischungen mit ihren jeweiligen Ausgangsstämmen über mehrere Wirtspassagen in den Populationen erhalten blieben.



## 10. Summary

1. In connection with the development of resistance of phytopathogenic fungi to some systemic fungicides a lot of questions are arising about the mechanisms of resistance, the characteristics of resistant strains and the importance of fungicide resistance for crop protection. These questions led to these investigations about the development of resistance of *Colletotrichum lindemuthianum* to benzimidazole fungicides.

2. Differentiated races (alpha, beta, gamma, delta, alpha-mutant and race 'Ebnet') and 14 isolates of this fungus with normal sensibility to benzimidazole fungicides were used in experiments for testing the sensibility to fungicides and the development of resistance to benzimidazole fungicides.

3. In vitro the benzimidazole fungicides (MBC, benomyl, thiophanate M, folcudin and thiabendazole) reduced the mycelium growth and caused deformations of the hyphae. The volume of the conidia increased unnormally and the growth of the short germ tubes developing from a certain amount of the conidia was extremely reduced.

4. Among strains of *Colletotrichum lindemuthianum* great differences occurred in the sensibility to fungicides in vitro. These differences showed up as well in the germination of conidia as in the mycelium growth rates. All strains belonging to the race 'beta' were especially sensible to the benzimidazole fungicides, which was demonstrated by total growth inhibition at the presence of very low fungicide concentrations. This reaction was noticed in the same way to all benzimidazole fungicides. Therefore it can be concluded that these fungicides are acting on the fungus in the same manner. Concerning the fungicides MBC and benomyl the  $ED_{50}$ -doses for mycelium growth rate were between 0,05 and 0,15 mg active ingredients per litre under the special experimental conditions.

5. For comparison the fungicides tridemorph, dichlofluanid and captan were included in the experiments. Only to the

systemic acting fungicide tridemorph the tested strains of *Colletotrichum lindemuthianum* showed remarkable differences in sensibility. Again the 'beta'-strains were the most sensible ones.

6. Generally resistance can emerge by adaptation or by genetic changes. Strains with a reduced sensibility as well as resistant strains were selected by successive transfers to increasing concentrations of benomyl in the nutrient medium. Resistant strains were also obtained by mass selection from mycelium or conidia. When a MBC or benomyl containing medium was inoculated by conidia resistant colonies developed at a rate between  $1 \cdot 10^{-6}$  to  $1 \cdot 10^{-7}$ . The rate could be enhanced by mutagenic ultra-violet irradiation.

7. The resistant strains were able to grow on a medium containing from 1 to more than 100 mg active ingredients per litre. Some strains selected from 'beta'-strains grew only up to 0.8 mg MBC per litre. It can be concluded that the higher sensibility of the 'beta'-strains affects the development of resistance negatively.

8. The rate by which resistant strains developed and also the stability of these resistant strains in fungicide free passages led to the conclusions that the development of resistance in all cases is caused by mutations. There were no indications of adaptive processes. In a few cases back mutations occurred and the resistance was spontaneously lost in fungicide free passages.

9. Resistant strains selected from one sensible strain, for example, could be divided into 7 morphological groups. Compared with the original material one group showed no important differences in colony type and growth rate, while in the other groups a reduced growth rate was observed.

10. Resistance to MBC and benomyl was always connected with resistance to folcudin and thiophanate M. Mostly this included resistance to thiabendazole. Only a few MBC-resistant strains showed no cross-resistance to thiabendazole.

11. Investigations on the pathogenicity of the MBC-resistant strains on young bean plants showed that half of the tested

strains had retained a high pathogenicity equivalent to the original sensible strains. The other strains could not be included into the experimental work because of their minimal production of conidia or because they showed a noticeable reduction in pathogenicity, which could not be enhanced by passages in vivo. The reduced growth of resistant strains in vitro was without influence on pathogenicity. By retesting the various resistant strains on a range of bean cultivars it could be ascertained that no change in race character did occur.

12. The influence of resistance gained in vitro was tested in vivo by inoculation of young bean plants being penetrated by fungicides. After MBC-application to the substrate a bio-assay was used for assessing the fungicide content of the hypocotyls. There was no fungicidal effect on 5 of the 11 tested strains. The other 6 strains were able to infect the plant only in presence of very low fungicide concentrations.

13. By number equal mixtures of one normally sensible strain and one highly resistant strain, originally selected from the mixture partner, after some host passages proved that some resistant strains were still as vital as the original sensible strain.

12. Literaturübersicht

- ANDERSON, H.W. and NIENOW, I.: Effect of streptomycin on higher plants.  
Phytopathology 37. 1947, 1.
- ANDRUS, C.F. and WADE, B.L.: The factorial interpretation of anthracnose resistance in beans.  
Techn. Bull. U.S. Dep. Agr. 810. 1942, 29.
- ARX, J.A. von: Kultur- und Infektionsversuche mit einigen Colletotrichum-Arten.  
Tijdschr. Plziekt. 63. 1957, 171-188.
- BARRUS, M.F.: Varietal susceptibility of beans to strains of Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. et Magn.) B. et C.  
Phytopathology 8. 1918, 589-614.
- BARTELS-SCHOOLEY, J. and MAC NEILL, B.H.: Comparison of the modes of action of three benzimidazoles.  
Phytopathology 61. 1971, 816-819.
- BEBBINGTON, R.M., BROOKS, D.H., GEOGHEGAN, M.J., SNELL, B.K.: Ethirimol: a new systemic fungicide for the control of cereal powdery mildews.  
Chem. Ind. 1969, 1512.
- BENT, K.J., COLE, A.M., TURNER, J.A.W. and WOOLNER, M.: Resistance of cucumber powdery mildew to dimethirimol.  
Proc. 6th Br. Insectic. Fungic. Conf. 1. 1971, 274-282.
- BEN-YEPHET, Y., HENIS, Y. and DINOOR, A.: Genetic studies on tolerance of carboxin and benomyl at the asexual phase of Ustilago hordei.  
Phytopathology 64. 1974, 51-56.

- BERGER, R.D.: Disease progress of *Cercospora apii* resistant to benomyl.  
Plant Dis. Repr. 57. 1973, 837-840.
- BOCHOW, H., LUC, L.H. and SUNG, P.Q.: Untersuchungen über die Entwicklung einer Toleranz bei phytopathogenen Pilzen gegenüber Systemfungiziden.  
Acta Phytopathol. 6. 1971, 399-414.
- BOLLEN, G.J.: Resistance of benomyl and some chemically related compounds in strains of *Penicillium* species.  
Neth. J. Plant Pathol. 77. 1971, 187-193.
- BOLLEN, G.J.: A comparison of the in vitro antifungal spectra of thiophanates and benomyl.  
Neth. J. Plant Pathol. 78. 1972, 55-64.
- BOLLEN, G.J. and FUCHS, A.: On the specificity of the in vitro and in vivo antifungal activity of benomyl.  
Neth. J. Plant Pathol. 76. 1970, 299-312.
- BOLLEN, G.J. and SCHOLTEN, G.: Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen.  
Neth. J. Plant Pathol. 77. 1971, 83-90.
- BRIAN, P.W.: Griseofulvin.  
Trans. Br. mycol. Soc. 43. 1960, 1-13.
- BROWN, J.G. and BOYLE, A.M.: Effect of penicillin on a plant pathogen.  
Phytopathology 34. 1944, 760-761.
- BUCHENAUER, H. and ERWIN, D.C.: Control of *Verticillium* wilt of cotton by spraying foliage with benomyl and thiabendazole solubilized with hydrochloric acid.  
Phytopathology 61. 1971, 433-434.

- BURKHOLDER, W.H.: The gamma strain of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav.  
Phytopathology 13. 1923, 316-323.
- BURTH, U.: Resistenz von Gurkenmehltau (*Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht) Salmon) gegenüber Systemfungiziden aus der Benzimidazol-Gruppe. (Kurze Mitteilung).  
Archiv Phytopathol. Pflanzensch. 9. 1973, 411-414.
- CHARRIER, A. et BANNEROT, H.: Contribution à l'étude des races physiologiques de l'Anthracnose du Haricot.  
Ann. Phytopathol. 2. 1970, 489-506.
- CLEMONS, G.P. and SISLER, H.D.: Formation of a fungitoxic derivative from "Benlate".  
Phytopathology 59. 1969, 705-706.
- CLEMONS, G.P. and SISLER, H.D.: Localization of the site of action of a fungitoxic benomyl derivative.  
Pestic. Biochem. Physiol. 1. 1971, 32-43.
- CREMLYN, R.J.W.: Systemic fungicides - a widening choice for agriculture.  
Intern. Pest Control 15. 1973, 8-14.
- DASSONEY, B. and MEYER, F.A.: Mutagenic effect of benomyl on *Fusarium oxysporum*.  
Mutation Res. 21. 1973, 119-120.
- DEKKER, J.: Systemic control of powdery mildew by 6-azauracil and some other purine and pyrimidine derivatives  
Meded. LandbHooges. Opzoek-Stns. Gent 27. 1962, 1214.
- DEERTINGER, H., JUNG, H. und ZIMMER, K.G.: Molekulare Strahlenbiologie.  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1969.

- DUTTA, S.K. and GARBER, E.D.: Genetics of phytopathogenic fungi. VII. Fungicide resistance in *Colletotrichum lagenarium*.  
*Phytopathology* 52. 1962, 35-41.
- EDGINGTON, L.V., WALTON, G.S. and MILLER, P.M.: Fungicide selective for Basidiomycetes.  
*Science* 153. 1966, 307-308.
- EDGINGTON, L.V., KHEW, K.L. and BARRON, G.L.: Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds.  
*Phytopathology* 61. 1971, 42-44.
- EHRENHARDT, H., EICHHORN, K.W. und THATE, R.: Zur Frage der Resistenzbildung von *Botrytis cinerea* gegenüber systemischen Fungiziden.  
*Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig)* 25. 1973, 49-50.
- ELIAS, R.S., SHEPHARD, M.C., SNELL, B.K. and STUBBS, J.: 5-N-butyl-2-dimethylamino-4-hydroxy-6-methyl pyrimidine, a systemic fungicide.  
*Nature, Lond.* 219. 1968, 1160.
- ERWIN, D.C.: Progress in the development of systemic fungitoxic chemicals for control of plant diseases.  
*Pl. Prot. Bull. F.A.O.* 18. 1970, 73-82.
- ESSER, J. und KUENEN, R.: *Genetik der Pilze*.  
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1967.
- ESURUOSO, O.F. and WOOD, R.K.S.: The resistance of spores of resistant strains of *Botrytis cinerea* to quintozene, tecuazene and dichloran.  
*Ann. appl. Biol.* 68. 1971, 271-279.
- FUCHS, A., DOMA, S. and VÖRÖS, J.: Laboratory and greenhouse evaluation of a new systemic fungicide N,N'-bis-(1-formamido-2,2,2,-trichloroethyl)piperazine (Cela W 524).  
*Neth.J.Plant Pathol.* 77. 1971, 42-54.

- GEORGOPOULOS, S.G. and ZARACOVITIS, G.: Tolerance of fungi to organic fungicides.  
Ann. Rev. Phytopathol. 5. 1967, 109-130.
- GEORGOPOULOS, S.G. and SISLER, H.D.: Gene mutation eliminating antimycin A -tolerant electron transport in *Ustilago maydis*.  
J. Bacteriol. 103. 1970, 745-750.
- GEORGOPOULOS, S.G. and DOVAS, C.: A serious outbreak of strains of *Cercospora beticola* resistant to benzimidazole fungicides in Northern Greece.  
Plant Dis. Repr. 57. 1973, 321-324.
- GILPATRICK, J.D. and BLOWERS, D.R.: Ascospore tolerance to dodine in relation to orchard control of apple scab.  
Phytopathology 64. 1974, 649-652.
- GOLDENBERG, C.W. and COLE, H.: In vitro study of benomyl tolerance exhibited by *Sclerotinia homoeocarpa*.  
Phytopathology 63. 1973, 201-202.
- GRAY, L.E. and SINCLAIR, J.B.: Uptake and translocation of systemic fungicides by soybean seedlings.  
Phytopathology 60. 1970, 1486-1488.
- GRAY, L.E. and SINCLAIR, J.B.: Systemic uptake of <sup>14</sup>C-labeled 2-(4'-thiazolyl)benzimidazole in soybean.  
Phytopathology 61. 1971, 523-525.
- GRIFFEE, P.J.: Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*.  
Trans. Br. mycol. Soc. 60. 1973, 433-440.
- GRIFFEE, P.J. and BURDEN, O.J.: Incidence and control of *Colletotrichum musae* on bananas in the Windward Islands.  
Ann. appl. Biol. 77. 1974, 11-16.



- GROSSMANN, F.: Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes systemischer Fungizide.  
Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch. 81. 1974, 671-677.
- GROSSMANN, F., BUCHENAUER, H. and EDGINGTON, L.V.: Photochemical transformations of some systemic fungicides.  
2nd Intern. Congr. Plant Pathol., Minneapolis 1973.
- GROVER, R.K. and CHOPRA, B.L.: Adaptation of Rhizoctonia species to two oxathiin compounds and manifestations of the adapted isolates.  
Acta Phytopathol.(Hung) 5. 1970, 113-121.
- HARDING, P.R., Jr.: Differential sensitivity to thiabendazole by strains of *Penicillium italicum* and *P. digitatum*.  
Plant Dis. Repr. 56. 1972, 256-260.
- HAMMERSCHLAG, R.S. and SISLER, H.D.: Differential action of benomyl and methyl-2-benzimidazolecarbamate (MBC) in *Saccharomyces pastorianus*.  
Pestic. Biochem. Physiol. 2. 1972, 123-131.
- HAMMERSCHLAG, R.S. and SISLER, H.D.: Benomyl and methyl-2-benzimidazolcarbamate (MBC): Biochemical, cytological and chemical aspects of toxicity to *Ustilago maydis* and *Saccharomyces cerevisiae*.  
Pestic. Biochem. Physiol. 3. 1973, 42-54.
- HASSEBRAUCK, K.: Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste. I. Die Beeinflussung des Fruktifikationsvermögens.  
Phytopathol. Z. 17. 1951, 384-399.
- HASSEBRAUCK, K.: Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste. II. Weitere Untersuchungen über die rosthemmende Wirkung.  
Phytopathol. Z. 18. 1952a, 453-460.

- HASSEBRAUCK, K.: Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste. III. Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Sulfonamiden und Sulfonen. *Phytopathol. Z.* 19. 1952b, 56-78.
- HASTIE, A.C.: Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature*, Lond. 226. 1970, 771.
- HASTIE, A.C. and GEORGOPOULOS, S.G.: Mutational resistance to fungitoxic benzimidazole derivatives in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 67. 1971, 371-373.
- HOFFMANN, G.M., SCHNOCK, M. und KRÜGER, J.: Zum Auftreten einer neuen physiologischen Rasse von *Colletotrichum lindemuthianum* an *Phaseolus vulgaris*. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch.* 81. 1974, 490-493.
- JARVIS, W.R. and HARGRAVES, A.J.: Tolerance to benomyl in *Botrytis cinerea* and *Penicillium corymbiferum*. *Pl. Path.* 22. 1973, 139-141.
- JAWETZ, E., MELNICK, J. und ADELBERG, E.A.: Medizinische Mikrobiologie. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1963.
- KAPPAS, A. and GEORGOPOULOS, S.G.: Independent inheritance of avirulence and dodine resistance in *Nectria haematococca* var. *cucurbitae*. *Phytopathology* 61. 1971, 1093-1094.
- KATARIA, H.R. and GROVER, R.K.: Adaptation of *Rhizoctonia solani* to systemic and non-systemic fungitoxicants. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch.* 81. 1974, 472-478.
- VAN DER KERK, G.J.M.: The development of synthetic fungicides, trends and prospects. *Neth. J. Plant Pathol.* 75. 1969, 5-20.

- KIRBY, A.H.M.: Progress towards systemic fungicides.  
PANS 18. 1972, 1-33.
- KIRKPATRICK, B.L. and SINCLAIR, J.B.: Uptake of two systemic fungicides and their breakdown products by soybean seeds.  
Phytopathology 63. 1973, 1532-1535.
- KOOISTRA, T., SLOOT, W.H.A. and JANSSEN, W.H.: Resistentie van konkomeermeeldauw (*Sphaerotheca fuliginea*) tegen Benlate, Topsin M, en Bavistin.  
Gewasbescherming 3. 1972, 121-125.
- LAMBERT, D.H. and WUEST, P.J.: Tolerance of *Verticillium dahliae* isolates to benomyl in relation to linear growth, geographical origin, spore volume, or zineb tolerance.  
Phytopathology 63. 1973, 203.
- LANKOW, R.K.: Growth responses of strains of *Botrytis cinerea* tolerant and susceptible to 2,6-dichloro-4-nitroaniline.  
Phytopathology 61. 1971, 900.
- LEBEN, C., BONNE, D.M. and KEITT, G.W.: *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. IX. Search for mutants resistant to fungicides.  
Phytopathology 45. 1955, 467-472.
- MAC NEILL, B.H. and SCHOOLEY, J.: The development of tolerance to dodine in *Venturia inaequalis*.  
Can. J. Botan. 51. 1973, 379-382.
- MAGIE, R.O. and WILFRET, G.J.: Tolerance of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* to benzimidazole fungicides.  
Plant Dis. Repr. 58. 1974, 256-259.
- MARKERT, C.L.: Lethal and mutagenic effects of ultraviolet radiation in *Glomerella conidia*.  
Exp. Cell. Res. 5. 1953, 427-435.

- MATHRE, D.E.: Mode action of oxathiin fungicides. Structure-activity relations.  
J. Agr. Food Chem. 19. 1971, 872-874.
- MERCER, P.C., WOOD, R.K.S. and GREENWOOD, A.D.: Resistance to anthracnose of French bean.  
Physiol. Plant Pathol. 4. 1974, 291-306.
- MILLER, M.W. and FLETCHER, J.T.: Benomyl tolerance in Botrytis cinerea isolates from glasshouse crops.  
Trans. Br. mycol. Soc. 62. 1974, 99-103.
- MISATO, T.: The development of agricultural antibiotics in Japan.  
Jap. Pesticide Information 1. 1970, 15.
- NETZER, D. and DISHON, I.: Field control of powdery mildew on muskmelons by root application of benomyl.  
Plant Dis. Repr. 54. 1970, 232-234.
- OHMORI, K.: Studies on characters of Piricularia oryzae made resistant to kasugamycin.  
J. Antibiotics (Tokyo) Ser. A 20. 1967, 109.
- PARRY, K.E. and WOOD, R.K.S.: The adaptation of fungi to fungicides: Adaptation to captan.  
Ann. appl. Biol. 47. 1959, 1-9.
- PETERSON, C.A. and EDGINGTON, L.V.: Quantitative estimation of the fungicide benomyl using a bioautograph technique.  
J. Agr. Food Chem. 17. 1969, 898-899.
- POLACH, F.J.: Genetic control of dodine tolerance in Venturia inaequalis.  
Phytopathology 63. 1973, 1189-1190.
- POMMER, E.H.: Probleme bei der Entwicklung systemischer Fungizide.  
Z. Pflanzenkrankh. Pflanzensch. 78. 1971, 513-521.

- PROVVIDENTI, R. and HUNTER, J.E.: Fungicide and nematocide tests; results of 1973.  
Fungic. Nematic. Tests 29. 1973, 62.
- RICHARDSON, L.T.: Adaptive tolerance of *Fusarium solani* to benzimidazole derivatives in vitro.  
Can. J. Botan. 51. 1973, 1725-1732.
- RICHMOND, D.V. and PRING, R.J.: The effect of benomyl on the fine structure of *Botrytis fabae*.  
J. Gen. Microbiol. 66. 1971, 79-94.
- RUPPEL, E.G. and SCOTT, P.R.: Strains of *Cercospora beticola* resistant to benomyl in the USA.  
Plant Dis. Repr. 58. 1974, 434-436.
- SCHREIBER, N.: Resistenzzüchtung bei *Phaseolus vulgaris*.  
Phytopathol. Z. 4. 1932, 415-454.
- SCHROEDER, W.T. and PROVVIDENTI, R.: Systemic control of powdery mildew on cucurbits with fungicide 1991 applied as soil drenches and seed treatments.  
Plant Dis. Repr. 52. 1968, 630-632.
- SCHROEDER, W.T. and PROVVIDENTI, R.: Resistance to benomyl in powdery mildew of cucurbits.  
Plant Dis. Repr. 53. 1969, 271-275.
- SEILER, J.P.: The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. I. Forward and reverse mutations in *Salmonella typhimurium* caused by benzimidazole and some of its derivatives.  
Mutation Res. 15. 1972, 273-276.
- SEILER, J.P.: A survey on the mutagenicity of various pesticides.  
Experimentia 29. 1973, 622-623.
- SEILER, J.P. and LIMACHER, H.: The influence of the 2-substituent in benzimidazole on the mutagenic activity.  
Chimia 27. 1973, 68-70.

- SIJPESTEIJN, A.K.: Biochemical modes of action of agricultural fungicides.  
World Rev. Pest Control 9. 1970, 85-93.
- SIMS, J.J., MEE, H. and ERWIN, D.C.: Methyl 2-benzimidazole carbamate, a fungitoxic compound isolated from cotton plants treated with methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazole carbamate (benomyl).  
Phytopathology 59. 1969, 1775-1776.
- SISLER, H.D.: Effect of fungicides on protein and nucleic acid synthesis.  
Ann. Rev. Phytopathol. 7. 1969, 311-330.
- SMITH, P.M.: Botrytis cinerea: tolerance to a soil-applied fungicide.  
Ann. Rep. Glasshouse Crops Res. Exp. Sta., Naaldwijk 1973, 106-107.
- SNEL, M., VON SCHMELING, B. and EDGINGTON, L.V.: Fungitoxicity and structure-activity relationships of some oxathiin and thiazole derivatives.  
Phytopathology 60. 1970, 1164-1169.
- STARON, T. et ALLARD, C.: Propriétés antifongiques du 2-(4'-thiazolyl) benzimidazole ou Thiabendazole.  
Phytiat. - Phytopharm. 13. 1964, 163-168.
- STEPHAN, B.R.: Untersuchungen über die Variabilität bei Colletotrichum gloeosporioides Penzig in Verbindung mit Heterokaryose.  
Dissertation, TU Hannover 1966.
- SZKOLNIK, M. and GILPATRICK, J.D.: Apparent resistance of Venturia inaequalis to dodine in New York apple orchards.  
Plant Dis. Repr. 53. 1969, 861-864.

- SZKOLNIK, M. and GILPATRICK, J.D.: Tolerance in *Venturia inaequalis* to dodine in relation to the history of dodine usage in apple orchards.  
Plant Dis. Repr. 57. 1973, 817-821.
- THANASSOULOPOULOS, G.C., GIANNOPOLITIS, C.N. and KITSOS, G.T.: Evaluation of sensitiveness and development of resistance of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* to benomyl.  
Phytopathol. Z. 70. 1971, 114-120.
- VAN TUYL, J.M., DAVIDSE, L.C. and DEKKER, J.: Lack of cross resistance to benomyl and thiabendazole in some strains of *Aspergillus nidulans*.  
Neth. J. Plant Pathol. 80. 1974, 165-168.
- VARGAS, J.M., Jr.: A benzimidazole-resistant strain of *Erysiphe graminis*.  
Phytopathology 62. 1972, 795.
- WAIN, R.L. and CARTER, G.A.: Historical aspects. In: MARSH, O.B.E.: Systemic fungicides.  
Longman Group Limited, London 1972.
- WATSON, A.G. and KOONS, C.F.: Increased tolerance to benomyl in greenhouse populations of *Botrytis cinerea*.  
Phytopathology 63. 1973, 1218-1219.
- WEBER, E.: Grundriss der biologischen Statistik.  
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1957.
- WEBSTER, R.K., OGAWA, J.M. and BOSE, E.: Tolerance of *Botrytis cinerea* to 2,6-dichloro-4-nitroanilide.  
Phytopathology 60. 1970, 1489-1492.
- WOLFE, M.S. and DINOOR, A.: The problem of fungicide tolerance in the field.  
Proc. 7th Br. Insectic. Fungic. Conf. 1973, 11-19.
- WUEST, P.J., COLE, H., Jr. and SANDERS, P.L.: Tolerance of *Verticillium dahliae* to benomyl.  
Phytopathology 64. 1974, 331-334.