

Diss. ETH Nr. 7599

RESISTENZ GEGENUEBER METALAXYL
UND GENETISCHE VARIABILITAET
VON PLASMOPARA VITICOLA

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

der

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

Jürg Herzog

Dipl. Ing.-Agr. ETH

geboren am 26. September 1955

von Thal SG

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. H. Kern, Referent

PD Dr. H. Schüepp, Korreferent

1984

5. ZUSAMMENFASSUNG

Versuche mit radioaktiv markiertem Metalaxyl zeigten, dass dieser Wirkstoff sehr rasch und in wirksamen Konzentrationen über die Gasphase verbreitet wird. Daher müssen unbehandelte und mit Metalaxyl behandelte Pflanzen unter Laborbedingungen getrennt inkubiert werden. Dieses methodische Problem konnte durch die Installation von drei Feuchtkabinen in einer Klimakammer gelöst werden.

Die Einlagerung von Rebenblättern mit frischgebildeten Sporangien bei -80°C erwies sich als einfache und sichere Methode zur langfristigen Erhaltung der Lebensfähigkeit von Plasmopara viticola.

Die Metalaxyl-Empfindlichkeit der Plasmopara-Isolate wurde mit einem Blattrondellentest ermittelt. Dabei konnte neben sensiblen und resistenten Isolaten erstmals ein dritter Sensibilitätstyp, der als vermindert sensibel bezeichnet wurde, gefunden werden. Dieser Befund liess sich durch den Haustorien-Entwicklungs-Test (HET), mit dem die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Plasmopara viticola im Blattinnern erfasst werden kann, bestätigen.

Die Aufnahme von ^{14}C -Metalaxyl in Rebenblätter und Blattrondellen wurde quantitativ bestimmt. Der Metalaxylgehalt der Blattrondellen erhöhte sich während der 9-tägigen Inkubationsperiode stetig. Dagegen zeigten Rebenblätter, bei denen das oberflächliche Fungiziddepot abgewaschen wurde, keine weitere Zunahme des Wirkstoffgehalts. Die Aufnahme von Metalaxyl ist auf der Blattunterseite höher als auf der Blattoberseite.

Anhand eines Versuchs mit Ridomil-Folpet und dem resistenten Plasmopara-Isolat F50 wurde der Einfluss der Applikationstechnik auf den Erfolg der Einsatzstrategie mit Fungizidmischungen zur Verzögerung der Resistenzbildung geprüft und eingehend diskutiert.

Metalaxyl-sensible und Metalaxyl-resistente Plasmopara-Isolate zeigten auf unbehandelten Reben keine Unterschiede in der Keimung, in der durchschnittlichen Haustorienzahl nach 30 Stunden Inkubation, im prozentualen Blattbefall und in der Sporangien-dichte. Resistenz gegenüber Metalaxyl ist offensichtlich nicht mit einer reduzierten Konkurrenzfähigkeit ver-

bunden. Trotzdem liess eine Kompetitivitätsuntersuchung die Möglichkeit offen, dass bei Plasmopara-Populationen mit einem geringen Anteil von resistenten Sporangien eine Resensibilisierung möglich ist. Liegt der Anteil der resistenten Teilpopulation jedoch schon über 10 %, bleibt das Resistenzniveau langfristig hoch. Mit dem Haustorien-Entwicklungs-Test liegt erstmals eine Methode vor, mit der das genaue Verhältnis zwischen sensiblen und resistenten Zoosporen in Mischkulturen ermittelt werden kann.

Ein Grössenvergleich der substomatalen Vesikel bestätigte die konzentrationsabhängige Wirkung von Metalaxyl im subletalen Bereich.

Alle getesteten Phenylamidderivate (Metalaxyl, Benalaxyl, Ofurace und Oxadixyl) zeigten Kreuzresistenz, was auf den gleichen Wirkungsmechanismus schliessen lässt. Da die Resistenzfaktoren der 4 Wirkstoffe über 100 lagen, bleiben die ermittelten Abweichungen ohne praktische Bedeutung.

Mit einem neuentwickelten Biotest, der auf der Agarstreifendiffusionstechnik beruht, konnten in nur 0,5 bis 1 Gramm extrahiertem Rebenblattgewebe Metalaxylmengen von 8 bis 4000 ng nachgewiesen werden. Rückstandsbestimmungen mit ¹⁴C-Metalaxyl bestätigten die Genauigkeit des Biotests.

Zur Aufspaltung von Plasmopara-Isolaten in Monozoosporokulturen wurde eine neue Methode erarbeitet. Mit ihrer Hilfe konnte gezeigt werden, dass auch ein resistentes Isolat noch sensible Zoosporen enthalten kann. Ein vermindert sensibles Isolat liess sich sogar in sensible, vermindert sensible und resistente Monozoosporokulturen aufspalten. Wie die gute Uebereinstimmung der Resultate bewies, ist es mit dem Haustorien-Entwicklungs-Test auch möglich, den genauen Anteil der Zoosporen mit unterschiedlicher Metalaxyl-Empfindlichkeit innerhalb eines Isolats zu ermitteln. Dieser Test ist im Vergleich zur Aufspaltmethode aussagekräftiger, da mit einem geringeren Arbeitsaufwand bedeutend mehr Zoosporen geprüft werden können. Warum ein vermindert sensibles Isolat nach einer einmaligen Weitervermehrung auf Metalaxyl-behandelten Pflanzen resistent reagiert, ist noch unbekannt.

5. SUMMARY

Studies with ^{14}C -labeled metalaxyl demonstrated that the labeled fungicide was readily distributed as a volatile at effective concentrations. Therefore it is necessary to separate untreated and metalaxyl-treated plants in the laboratory during the incubation period. This methodical problem could be solved by the installation of three moist chambers in a growth room.

The storage of grape-vine leaves with freshly produced sporangia at a temperature of -80°C proved to be a simple and successful technique for long-term preservation of Plasmopara viticola in order to provide a continuous and standard supply of the fungus.

The sensitivity of Plasmopara-isolates to metalaxyl was determined by a leaf disc test. For the first time, this permitted a distinction of not only sensitive and resistant isolates but also isolates belonging to a third type of sensitivity, termed the reduced sensitive type. These findings could be confirmed by the haustoria development test (HDT), which makes it possible to determine the speed of growth of Plasmopara viticola inside the leaves.

Quantitative data on the uptake of ^{14}C -labeled metalaxyl applied to grape leaves and leaf discs were determined. The concentration of metalaxyl in the leaf discs increased continuously during the incubation period of 9 days. On the other hand no further increase in the fungicide content of grape-vine leaves occurred if the foliar deposits were washed off. The uptake of metalaxyl was higher on the lower leaf surface than on the upper one.

The influence of the application technique on the validity of the use strategy whereby fungicide mixtures are used to prevent or delay the build-up of resistance was examined and thoroughly discussed carrying out an experiment with Ridomil-Folpet and the resistant Plasmopara-isolate F50.

There were no differences in germination, the average number of haustoria per infection site 30 h after inoculation, the assessed infection grade of the leaves nor in sporangia density between metalaxyl-sensitive and

metalaxyl-resistant Plasmopara-isolates. Resistance to metalaxyl is obviously not accompanied by reduced fitness. Nevertheless, based on a competition test, the possibility can't be excluded that Plasmopara-populations with a low proportion of resistant sporangia will become completely sensitive again. However, if the proportion of the resistant subpopulation is higher than 10 %, the resistance remains stable on a high level for a long time. The haustoria development test makes it possible, again for the first time, to determine the precise ratio of sensitive and resistant zoospores from a mixed population.

Differences in the size of substomatal vesicles confirmed that the inhibition of fungal development by metalaxyl in the sublethal range is concentration dependent.

All phenylamide derivatives examined (metalaxyl, benalaxyl, ofurace and oxadixyl) showed cross resistance, which strongly suggests a common mode of action. Since the factors of resistance were generally higher than 100, the differences found were considered as being of no practical importance.

A modified bioassay method using the agar band diffusion technique permitted quantitation of metalaxyl in foliage at levels of 8 to 4000 ng following the extraction of only 0,5 to 1 gram of grape-vine leaf tissue. The concentrations of metalaxyl assessed in grape-vine leaf discs using ¹⁴C-metalaxyl and the bioassay technique showed excellent agreement and confirmed the validity of the latter method.

A new technique was developed to separate Plasmopara-isolates in single-zoospore cultures. With the aid of this technique it could be demonstrated that a resistant isolate still contains some sensitive zoospores. A reduced sensitive isolate could be even separated in sensitive, reduced sensitive and resistant single-zoospore cultures. As the good agreement of the results demonstrated, the precise ratio of differentially sensitive zoospores to metalaxyl can also be determined by the haustoria development test. In comparison with the separating-technique this test gives more evidence because a considerable number of zoospores can be examined with regard to sensitivity to metalaxyl in a short time. The reason for the rapid change from a reduced sensitive isolate to a resistant one following one infection cycle on metalaxyl-treated plants is unknown.