

Charakterisierung der genetischen Variabilität von *Botrytis cinerea* aufgrund von Fungizidresistenz und Enzymaktivität

Doctoral Thesis

Author(s):

Martinetti, Gladys

Publication date:

1986

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000398940>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

1. Okt. 1986

Diss. ETH Nr. 8060

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

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZEURICH

vorgelegt von

Gladys Martinetti

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

E. Müller

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. E. Müller, Referent

PD Dr. H. Schüepp, Korreferent

1986

lat

5. ZUSAMMENFASSUNG

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5. SUMMARY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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