

Institut für Pflanzenkrankheiten
der
Rheinischen Friedrich–Wilhelms-Universität Bonn

**Die Zellwand des Oomyceten *Phytophthora infestans*
als Wirkort von Fungiziden**

Inaugural – Dissertation

zur
Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften
(Dr. agr.)

der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am
10. September 2001

von
Dipl.-Biol. Gabriele Jende

aus Remagen
Bonn 2001

D 98

Referent: Prof. Dr. H.-W. Dehne

Korreferent: Prof. Dr. G. Noga

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2001

Gedruckt bei: Copy-Shop, Bonn

Kurzfassung

Gabriele Jende

Die Zellwand des Oomyceten *Phytophthora infestans* als Wirkort von Fungiziden

Der Einfluß von 'Iprovalicarb', einem neuen Wirkstoff aus der Klasse der Aminosäureamidcarbamate, auf die Entwicklung von *Phytophthora infestans*, dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln und der Braunfäule an Tomate, wurde charakterisiert und mit der Wirkung anderer Oomyceten-Fungizide verglichen.

Der Befall von *Phytophthora infestans* an Tomate wurde durch 'Iprovalicarb' sowohl protektiv als auch kurativ bereits bei Wirkstoffkonzentrationen von 5 ppm a.i. wirksam begrenzt und die Ausprägung der Symptome erfolgreich verhindert.

In mikroskopischen Untersuchungen, die vor allem mit der konfokalen Laser Scan Mikroskopie durchgeführt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass bereits frühe Entwicklungsstadien von *Phytophthora infestans* auf der Oberfläche von Tomatenpflanzen nach protektiver Applikation von 'Iprovalicarb' gehemmt wurden. Morphologische Veränderungen der Keimschläuche, vor allem die partielle Lyse der Zellwände, deuteten auf einen erheblichen Stabilitätsverlust hin. Am stärksten wirkte sich 'Iprovalicarb' aber auf die Infektionsstrukturen von *Phytophthora infestans* aus, die im Gewebe von Tomatenblättern gebildet wurden. Dabei wurde vor allem die Ausbreitung des Pathogens in tiefere Schichten des Wirtsgewebes deutlich begrenzt. Das Anschwellen von pilzlichen Strukturen sowie die Auflösung von Hyphenzellwänden waren Hinweise, dass 'Iprovalicarb' einen Einfluß auf die pilzliche Zellwand ausübte.

Im Vergleich mit anderen Oomyceten-Fungiziden, die sich hinsichtlich ihrer Wirkungsmechanismen unterscheiden, ergab sich, dass *in vitro* nur 'Azoxystrobin', ein Elektronentransporthemmer, und 'Dimethomorph' sehr gute Wirkungen wie 'Iprovalicarb' aufwiesen.

Sowohl 'Iprovalicarb' als auch 'Dimethomorph' riefen ähnliche morphologische Veränderungen an Hyphen von *Phytophthora infestans* hervor- wie perlschnurartiges Aussehen der Hyphen und die Bildung verdickter Hyphenspitzen. Sie griffen unterschiedlich in die Struktur der Zellwand ein. 'Iprovalicarb' zeigte einen Einfluß auf die Nachweisbarkeit von Mono- und Polysacchariden in der Zellwand, der nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung nicht beobachtet wurde. Weiterhin verursachte 'Iprovalicarb' eine strukturelle Veränderung der Cytoskelettelemente. Dies könnte möglicherweise die Regulation auf die Anordnung der Cellulosemikrofibrillen beeinflussen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung die Zellwände verdickt waren und eine erhöhte spezifische Markierungsdichte für Cellulose aufwiesen. Trotzdem wurden unter Stoffeinfluß die Zellwände erheblich instabiler. Dies könnte auf einen veränderten Kristallisationszustand der Cellulose zurückzuführen sein. Auch nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung wurde eine Zunahme der Zellwandstärke beobachtet, im Gegensatz zu dem Einfluß von 'Iprovalicarb' blieb die Anordnung der Cytoskelettelemente jedoch unbeeinflusst.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass sich 'Iprovalicarb' hinsichtlich seiner Wirkungen trotz ähnlicher Auswirkungen auf die pilzliche Zellwand von anderen Oomycetenfungiziden unterscheidet und damit das Instrumentarium des Pflanzenschutzes erweitert.

Abstract

Gabriele Jende

The cell wall of the oomycete *Phytophthora infestans* as a target of fungicides

The influence of 'Iprovalicarb' as a novel fungal compound from the new class of amino acid amidecarbamates, on the development of *Phytophthora infestans*, causing late blight of potatoes and tomatoes, was characterised and compared to the activity of other fungicides.

The infestation of *Phytophthora infestans* on tomato plants was effectively limited after a protective or curative application of 'Iprovalicarb' in concentrations of 5 ppm a.i. and the formation of symptoms was prevented successfully.

Microscopical investigations, which were carried out with a confocal laser scanning microscope, could demonstrate that early developmental stages of *Phytophthora infestans* on the surface of tomato plants were inhibited after a protective application of 'Iprovalicarb'. Morphological changes of the germ tubes, especially the lysis of cell wall structures, indicated that the cell wall lost stability substantially. 'Iprovalicarb' was found to affect mainly the infection structures of *Phytophthora infestans* in the tissue of tomato leaves. The spread of the pathogen into deeper tissue layers was suppressed to a high extent. The swelling of fungal structures and the lysis of hyphal cell walls indicated that 'Iprovalicarb' influenced the fungal cell wall.

Compared to other oomycete-fungicides, with different modes of action, only 'Azoxystrobin', an electron transport inhibitor, and 'Dimethomorph' had an excellent effect *in vitro* like 'Iprovalicarb'.

Both 'Iprovalicarb' and 'Dimethomorph' caused similar morphological changes in the hyphae of *Phytophthora infestans* like a 'beaded morphology' of the hyphae and swollen hyphal tips, but they interfered differently with the cell wall structure.

'Iprovalicarb' showed an influence on the evidence of mono- and polysaccharides in the cell wall, which was not observed after an application of 'Dimethomorph'. Furthermore, 'Iprovalicarb' caused structural changes of the cytoskeletal components, which probably influenced their regulation of the alignment of the cellulose microfibrils.

Electron microscopical investigations showed that the cell walls became thicker and had a higher marking density for cellulose after an 'Iprovalicarb'-treatment. However the cell walls lost stability under the influence of 'Iprovalicarb'. This might be due to the fact that the state of crystallisation of cellulose had changed. After a 'Dimethomorph'-treatment abnormally thickened cell walls appeared as well, but in contrast to 'Iprovalicarb' the structure of the cytoskeletal elements was not affected.

The present investigations indicated that 'Iprovalicarb' is different from other oomycetes-fungicides concerning its effects despite similar changes in the fungal cell wall and by this 'Iprovalicarb' broadens the instrumentarium of plant protection.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1	Pflanzen	6
2.2	Pathogen	6
2.2.1	Herkunft.....	6
2.2.2	Pathogenerhaltung	6
2.2.3	Inokulationen	7
2.2.4	Befallsauswertung	7
2.3	Fungizide	7
2.3.1	Wirkstoffe	8
2.3.1.1	‘Iprovalicarb‘	8
2.3.1.2	‘Propamocarb-Hydrochlorid‘	8
2.3.1.3	‘Azoxystrobin‘	8
2.3.1.4	‘Metalaxyl‘	8
2.3.1.5	‘Dimethomorph‘	8
2.3.2	Anwendung	9
2.4	<i>In vitro</i>-Untersuchungen zur Wirksamkeit von ‘Iprovalicarb‘ und anderen fungiziden Wirkstoffen gegenüber <i>Phytophthora infestans</i>	10
2.4.1	Keimung und Keimschlauchwachstum encystierter Zoosporen	10
2.4.2	Myzelwachstumstest	10
2.5	Lichtmikroskopische Untersuchungen	11
2.5.1	Mikroskopie	11
2.5.2	Präparation.....	11
2.5.2.1	Vitalpräparate.....	11
2.5.2.2	Fixierung	12
2.5.3	Färbetechniken.....	12
2.5.3.1	Übersichtsfärbungen zum Nachweis von Pilzstrukturen im Blattgewebe	12
2.5.3.2	Nachweis von Mitochondrienvitalität	12
2.5.3.3	Nachweis von Cytoskelettelementen	13
2.5.3.3.1	Mikrotubuli	13

2.5.3.3.2	Actin	14
2.5.3.4	Nachweis von Zellwandkomponenten.....	14
2.5.3.4.1	Monosaccharide	14
2.5.3.4.2	Polysaccharide.....	16
2.6	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	16
2.6.1	Präparation.....	16
2.6.2	Enzymgold-Markierung von Cellulose.....	17
2.6.3	Auswertung	17
2.6.4	Mikroskopie	17
2.7	Statistische Auswertung.....	18
3	ERGEBNISSE.....	19
3.1	Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Ausprägung von Schadsymptomen durch <i>Phytophthora infestans</i> an Tomatenpflanzen	19
3.1.1	Verminderung von Schadsymptomen nach protektiver Applikation	19
3.1.2	Verminderung von Schadsymptomen nach kurativer Applikation	20
3.2	Einfluß von 'Iprovalicarb' auf verschiedene Entwicklungsstadien von <i>Phytophthora infestans in vitro</i>.....	22
3.2.1	Zoosporenkeimung und Keimschlauchwachstum encystierter Zoosporen	22
3.2.2	Myzelwachstum.....	25
3.3	Einfluß von 'Iprovalicarb' auf den Infektionsverlauf von <i>Phytophthora infestans</i> an Tomatenpflanzen.....	27
3.3.1	Frühe Entwicklung auf der Blattoberfläche.....	27
3.3.1.1	Zoosporenkeimung	27
3.3.1.2	Appressorienbildung	28
3.3.2	Ausbreitung im Blattgewebe nach protektiver Applikation	29
3.3.2.1	Wachstum in der Epidermis	29
3.3.2.2	Wachstum im Palisadenparenchym.....	30
3.3.3	Ausbreitung im Blattgewebe nach kurativer Applikation	32
3.3.3.1	Wachstum in der Epidermis	32
3.3.3.2	Wachstum im Mesophyll	33
3.3.4	Einfluß der Applikationsbedingungen auf die Wirkung von 'Iprovalicarb'.....	35
3.3.4.1	Entwicklung der Appressorien.....	35
3.3.4.2	Penetration und Primärvesikelbildung.....	36

3.3.4.3	Ausbreitung in der Epidermis	38
3.3.4.4	Ausbreitung im Mesophyll	39
3.4	Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Struktur von <i>Phytophthora infestans</i>.....	40
3.4.1	Morphologische Veränderungen des Myzels	40
3.4.2	Einfluß auf Monosaccharide in der pilzlichen Zellwand.....	41
3.4.2.1	Von Zoosporen und Keimschläuchen	42
3.4.2.2	Von Sporangien	44
3.4.2.3	Von Myzel	45
3.4.3	Einfluß auf Polysaccharide in der pilzlichen Zellwand.....	45
3.4.3.1	Von Zoosporen und Keimschläuchen	46
3.4.3.2	Von Myzel	46
3.4.4	Einfluß auf den Cellulose-Gehalt in der pilzlichen Zellwand	46
3.4.5	Veränderungen von Cytoskelettkomponenten	48
3.4.5.1	Mikrotubuli.....	48
3.4.5.2	Actin	49
3.4.6	Einfluß auf die Mitochondrienvitalität.....	49
3.5	Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit ausgewählter Fungizide ge- genüber <i>Phytophthora infestans in vitro</i>	50
3.5.1	Frühe Entwicklungsstadien	50
3.5.2	Entwicklung von Myzel.....	52
3.5.3	Vergleich der Wirkungsmechanismen von 'Iprovalicarb' und 'Dimethomorph'	53
3.5.3.1	Morphologische Veränderungen an Myzel von <i>Phytophthora infestans</i>	53
3.5.3.2	Strukturelle Veränderungen an Myzel von <i>Phytophthora infestans</i>	54
4	DISKUSSION.....	85
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	105

1 Einleitung

Die Aufklärung der Wirkungsmechanismen von Verbindungen mit fungiziden Eigenschaften ist nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern auch für den praktischen Pflanzenschutz von Bedeutung. Die Kenntnis von den Wirkungsweisen und den molekularen Wirkorten im pilzlichen Stoffwechsel bieten die Chance, Fungizide gezielt im Rahmen eines ausgewogenen Resistenzmanagements einzusetzen.

Oomyceten gehören zu den Krankheitserregern, die weltweit wirtschaftlich bedeutende Schäden an Kulturpflanzen hervorrufen. Dazu zählen der Erreger der Kraut- und Knollenfäule (*Phytophthora infestans*) an Kartoffeln und Tomaten, sowie der Falsche Mehltau (*Plasmopara viticola*) im Weinbau. Diese meist obligaten Parasiten zeichnen sich durch eine überaus schnelle (asexuelle) Generationsfolge aus. Die rasche Ausbreitung dieser Pathogene im Wirtsgewebe führt zu hohen Schäden bis hin zum Totalverlust der Kultur. Dies hat eine vergleichsweise hohe Intensität an Pflanzenschutzmaßnahmen zur Folge, denn zur Sicherung von Quantität und Qualität des Ertrages wie auch aus epidemiologischen Gründen kann praktisch kein Befall toleriert werden.

Oomyceten werden aufgrund ihrer phylogenetischen Unterschiede gegenüber den Echten Pilzen in das Reich der Chromista eingeordnet (BEAKES *et al.* 1998). Besonderes Charakteristikum der Oomyceten ist ein diploides, unseptiertes und vielkerniges Myzel. Die Zusammensetzung ihrer Zellwand unterscheidet sich dadurch von den Vertretern des Reiches der Echten Pilze, dass sie anstatt Chitin als Hauptbestandteil Cellulose enthält.

Im Gegensatz zu den meisten anderen *Phytophthora*-Arten ist der Wirtspflanzenkreis von *Phytophthora infestans* auf Kartoffeln, Tomaten, Eierfrüchte und andere *Solanaceae* begrenzt. An Tomaten verursacht *Phytophthora infestans* eine Kraut- und Fruchtfäule, die zu erheblichen Ertragsverminderungen und –ausfällen führt. Auch die Züchtung von *Phytophthora infestans*-resistenten Kartoffel- und Tomatensorten sowie die Berücksichtigung von Prognoseverfahren verhinderten nicht das Auftreten der Krankheiten.

Phytophthora infestans ist seit über 150 Jahren Gegenstand intensiver phytopathologischer Forschung. Dies hat seine Ursache vor dem Hintergrund der großen wirtschaftlichen Auswirkungen dieser pilzlichen Kartoffelerkrankung. Mitte des vorigen Jahrhunderts wurde der Erreger aus Nordamerika in Europa eingeschleppt und verursachte ein epidemisches Auftreten der Kartoffelfäule. Besonders in England und Irland führte dies zu verheerenden Hungerkatastrophen und Auswanderungsbewegungen. Die Kraut- und Knollenfäule ist trotz intensiver Kontrollmaßnahmen bis heute die weltweit wichtigste Erkrankung der Kartoffel.

Phytophthora infestans wurde erstmals 1885 durch die Entwicklung der "Bordeaux-Brühe" aus Kalziumhydroxid und Kupfersulfat chemisch bekämpft (MILLARDET 1885). Kupferpräparate werden bis heute zur Bekämpfung der Kraut- und Knollenfäule angewendet. Mit der Einführung der ersten organischen Fungizide standen weitere, allerdings nur protektiv wirkende Fungizide zur Verfügung. Ein entscheidender Fortschritt im modernen Pflanzenschutz zur Bekämpfung von pflanzenpathogenen Oomyceten und damit auch von *Phytophthora infestans* war die Entwicklung und Einführung systemisch und kurativ wirkender Fungizide (STRUCK *et al.* 1998).

In den letzten 20 Jahren gelang die Entwicklung von Präparaten aus sieben neuen Fungizidklassen (Tab. 1), die vielfältige Möglichkeiten in der Bekämpfung der Oomyceten eröffneten (SCHWINN & STAUB 1995). Diese umfassen die Carbamate, Isoxazole, Cyanoacetamid-Oxime, Ethylphosphonate (Organophosphate), Phenylamide, 2,6-Dinitro-anilide und die Morpholine.

Die Anwendung moderner physiologischer, biochemischer und molekularer Techniken hat in den vergangenen Jahren zu einem vertieften Verständnis der Biologie pflanzenpathogener Pilze beigetragen. Insbesondere die Initialphase der Infektion, in der der Pilz sich in der Wirtszelle etabliert, ist entscheidend für seine Ausbreitung. Daher ergeben sich gerade während dieser Phase - Anheftung an die Blatt- bzw. Wurzeloberfläche, Sporenkeimung, Keimschlauchwachstum, Appressoriumbildung und Penetration in das Blatt - bzw. Wurzelgewebe - unterschiedliche Angriffspunkte für eine frühzeitige Bekämpfung (STRUCK *et al.* 1998). Detaillierte Kenntnisse über die molekularen Zusammenhänge des Infektionsverlaufes eröffnen die Aussicht auf die Entwicklung spezifischer Fungizide, die keine Nebenwirkungen auf andere Organismen haben.

Mikroskopische Techniken ermöglichen Einblicke in Fungizid-Pathogen-Interaktionen sowohl *in planta* als auch *in vitro*. Diese können zur Aufklärung der Wirkungsmechanismen von Fungizide beitragen, indem morphologische bzw. strukturelle Veränderungen des Pathogens beobachtet werden können. Die Transmissionselektronen-Mikroskopie gibt anhand von Ultradünnschnitten Aufschluß darüber, inwieweit sich eine Fungizid-Applikation verändernd auf die Ultrastruktur von Pathogen und Wirt auswirkt.

Tab. 1: Chemische Stoffklassen und die Wirkungsmechanismen von Oomycetenfungiziden (modifiziert nach SCHWINN & STAUB 1995).

Chemische Stoffklasse	Wirkstoffe	Biochemische Targets	ausgewählte Referenzen
Carbamate	'Propamocarb-Hydrochlorid' 'Prothiocarb'	Zellmembranen	PAPAVIZAS <i>et al.</i> (1978), BURDEN <i>et al.</i> (1988)
Isoxazole	'Hymexazol'	RNA Synthese	NAKANISHI <i>et al.</i> (1983)
Cyanoacetamid-Oxime	'Cymoxanil'	sekundärer Effekt auf die Nukleinsäuresynthese	DESPREAU <i>et al.</i> (1981), ZIOGAS & DAVIDSE (1987)
Ethylphosphonate	'Fosetyl'	Aminosäure-Metabolismus und Proteinhaushalt	FENN & COFFEY (1984), GRIFFITH <i>et al.</i> (1992)
Phenylamide	Acylalanines ('Furalaxyl', 'Metalaxyl', 'Benalaxyl') Acylamino-Butyrolactone ('Ofurace') Acylamino-Oxazolidinone ('Oxadixyl', 'Cyprofuram')	ribosomale RNA-Synthese	KERKENAAR & KAARS-SIJPESTEIJN (1981), GISI & COHEN (1996)
2,6- Dinitroaniline	'Fluazinam'	mitochondriale Atmung (Phosphorilierung)	GUO <i>et al.</i> (1991)
Morpholine	'Dimethomorph'	Zellwandstruktur	KUHN <i>et al.</i> (1991)

Immunhistochemische Färbemethoden spielen heute in der biologisch-medizinischen Forschung eine wesentliche Rolle und liefern bedeutende Möglichkeiten, zelluläre Strukturen genauer zu charakterisieren (STOWARD *et al.* 1998, BRANDTZAEG 1998). Im Vergleich zu den Anfängen der Immunhistochemie (1941) wurden die Sensitivität und Spezifität Fluorochrom-markierter Antikörper deutlich verbessert. Ziel immunhistochemischer Techniken sind Nachweis und Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch spezifische Antikörper, die durch Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme oder Goldpartikel markiert sind (HODGES & CARR 1990).

Neu entwickelte, hochauflösende Mikroskope in Verbindung mit einer digitalen Bildverarbeitung liefern die Möglichkeit, Totalpräparate bzw. dickere Präparate detailliert zu analysieren. Das umfangreiche Angebot an fluoreszierenden Farbstoffen, durch die eine spezifische Markierung von feinsten Strukturen möglich wurde, tragen bedeutend zur Aufklärung cytologischer Vorgänge bei. Die Entwicklung des Konfokalen Laser Scan-Mikroskops (CLSM) ist dabei ein besonderer Fortschritt in der optischen Analyse von biologischen Präparaten. Dreidimensionale Abbildungen vermitteln dem Betrachter wesentlich differenziertere Informationen über das zu analysierende Objekt als herkömmliche zweidimensionale Aufnahmen.

Phytopathologisch relevante Objekte sind komplex und auf mikroskopischer Ebene oftmals aus optisch dichteren Strukturelementen aufgebaut. Dies kann zur Folge haben, das fluoreszenzmarkierte Strukturen nicht getrennt voneinander aufgelöst werden können. Durch den hohen Streulichtanteil ist es oft nicht möglich, eine einzelne Ebene des Präparates in einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop deutlich darzustellen. Das konfokale Verfahren der mikroskopischen Abbildungen hat dieses Problem weitgehend gelöst. Im Gegensatz zu gewöhnlichen Mikroskopen zeichnet das konfokale Mikroskop nur Informationen auf, die aus der Fokusebene kommen. Alle anderen Informationen werden wirkungsvoll durch eine Blende (Pinhole) abgetrennt, die im Strahlengang des emittierten Fluoreszenzlichtes angebracht ist. Dies führt zu einer Zunahme an bildlicher Schärfe und Kontrast. Der Laserstrahl wird zeilenförmig über das Präparat geführt und die Fluoreszenz mit einem Detektor erfaßt. Die so gewonnen optischen Schnitte haben Dicken von mindestens 0,1 µm. In Kombination mit hochselektiven Fluorochromen lassen sich so spezifisch Zellstrukturen mit höchster räumlicher Auflösung darstellen. Ein großer Vorteil besteht darin, dass das Präparat dabei nicht zerstört wird und deshalb auch wiederholte Messungen möglich sind. Zur Herstellung von dreidimensionalen Abbildungen werden die optischen Schnitte in Serie aufgezeichnet und anschließend mit Hilfe von bildverarbeitender Software zu einem Bild mit großer Tiefenschärfe zusammengesetzt.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Charakterisierung der Wirkung des Wirkstoffs 'Iprovalicarb' auf *Phytophthora infestans* im Vergleich zu anderen Oomycetenfungiziden. Anhand von *in vitro*-, *in vivo*- und *in planta*-Experimenten wurde der Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Keimung von encystierten Zoosporen, das Keimschlauchwachstum, die Myzelmorphologie und das Myzelwachstum von *Phytophthora infestans* erfaßt. Dabei wurden sowohl die Auswirkungen von protektiven als auch kurativen Applikationen des Wirkstoffes berücksichtigt. Neben der konventionellen Lichtmikroskopie wurde dafür die konfokale Laser Scan-Mikroskopie verwendet. Diese ermöglicht nach Markierung der mikroskopischen Präparate mit Fluorochromen eine Zerlegung der Objekte in optische Schnitte und nach deren bildanalytischer Verrechnung eine räumliche Darstellung der Pilzstrukturen. Zusätzlich wurden mit

einem Transmissionselektronen Mikroskop ultrastrukturelle Untersuchungen durchgeführt, um die Wirkung von 'Iprovalicarb' und anderen Oomycetenpräparaten zu ermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzen

Als Wirtspflanzen wurden Tomaten (*Solanum lycopersicum*) der Sorte 'Frembgens Rheinland Ruhm' verwendet, die im Gewächshaus angezogen wurden. Die Aussaat erfolgte in Klasmann 'Seedling Substrat' (96 % Vol. Hochmoortorf, pH-Wert 5,5-6,0; Klasmann, Geste-Groß-Hesete). Sieben Tage nach der Aussaat wurden die Keimlinge in 9x9x9 cm große Vierecktöpfe in Klasmann 'Spezialmischung' (70 % Vol. Weißtorf und 30 % Vol. Schwarztorf; pH 5,0-5,5) pikiert. Für die Versuche wurden drei Wochen alte Pflanzen verwendet, deren zweites Laubblatt vollständig entwickelt war. Die Gewächshaustemperatur von 21 ± 5 °C wurde über die Heizung und die Lüftung gesteuert. Eine Tageslänge von 16 Stunden wurde durch Zusatzlicht von Natriumdampflampen Philips SGR 140 (Photosynthese-Belichtung mit erhöhtem Blaulichtanteil) mit einer Lichtstärke von $300 \mu\text{E}/\text{m}^2$ gewährleistet.

2.2 Pathogen

Die Untersuchungen wurden mit *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffeln und der Fruchtfäule an Tomaten, durchgeführt.

2.2.1 Herkunft

Es wurden Isolate aus dem Freiland von 1997 von verschiedenen Standorten in Aachen (Nr. 1, 18, 22, 32), Hennef (Nr. 3, 12, 24, 26, 27) und Kerpen (Nr. 19, 31) verwendet.

2.2.2 Pathogenerhaltung

Die Erhaltung von *Phytophthora infestans* erfolgte durch wöchentliches Übertragen auf frischen Gemüsesaftagar (160 ml Gemüsesaft (Krings, Lüdinghausen), 2,4 g CaCO_3 , 12 g Agar-Agar mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin.}}$ auf 800 ml auffüllen) bei 18 °C im Dunkeln. Für die Versuche wurden acht Tage alte Kulturen von *Phytophthora infestans* verwendet. Alle vier Wochen erfolgte eine Passage über Kartoffelknollengewebe, um die Pathogenität des Erregers zu erhalten. Dazu wurde Kartoffelknollengewebe nach Oberflächensterilisation mit Ethanol in ca. 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten und in eine Petrischale auf eine 1 cm^2 große Scheibe Gemüsesaftagar mit *Phytophthora infestans* gelegt. Alternativ wurde ein Stück Myzel des Erregers zwischen zwei Kartoffelscheiben gelegt. Nach einer Wachstumsphase von vier bis fünf Tagen bei 18°C im Dunkeln hatte das Myzel die Kartoffelhälfte durchwachsen und wurde zur Herstellung der Reinkultur auf Gemüsesaftagar übertragen.

2.2.3 Inokulationen

Die Inokulation erfolgte mit einer Zoosporensuspension von *Phytophthora infestans* aus Myzel einer höchstens acht Tage alten Kultur. Dafür wurde Myzel in Leitungswasser suspendiert und durch Mull filtriert. Eine anschließende zweistündige Kühlphase bei 4 °C regte die Zoosporen zum Schlüpfen an.

Für **Gewächshausuntersuchungen** wurde von Isolat Nr. 19 eine Zoosporensuspension mit einer Konzentration von 120.000 Sporen/ml hergestellt. Die Inokulation protektiv behandelter Pflanzen erfolgte 24 Stunden nach Antrocknen des Spritzbelags mit einer Handspritze. Für die Inkubation wurden die Pflanzen für 48 Stunden in eine transparente Feuchtekammer und anschließend für drei Tage im Gewächshaus bis zur Versuchsauswertung aufgestellt.

Für die **mikroskopischen Untersuchungen** an Tomatenblättern wurde eine Zoosporensuspension von Isolat Nr. 19 mit einer Konzentration von 90.000 Sporen/ml verwendet. Ein Dekantieren der Zoosporensuspension gewährleistete, dass die Suspension keine entleerten Zoosporangien enthielt, wodurch die mikroskopische Arbeit erleichtert wurde. Die Inokulation erfolgte 24 Stunden nach der 'Iprovalicarb'-Applikation auf die ersten gepaarten Blättchen des zweiten voll entwickelten Blattes von oben mit 20 µl Zoosporensuspension. Bis zur Fixierung wurden die Blättchen in einer transparenten Feuchtekammer aufbewahrt.

Die **in vitro-Untersuchungen** wurden außer mit den Isolaten mit den Nummern 1, 3, 12, 18, 19, 22, 24, 26, 27, 31, 32 zusätzlich mit Einspor-Isolaten von Isolat Nr. 19 durchgeführt. Dafür wurden 500 µl einer Zoosporensuspension (10.000 Zoosporen/ml) auf Wasseragar (18 g Agar/l) verteilt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 18 °C im Dunkeln wurden Agarstückchen mit einzelnen gekeimten Zoosporen auf Gemüsesaftagar übertragen.

2.2.4 Befallsauswertung

Die Befallsauswertung intakter Pflanzen erfolgte fünf Tage nach Inokulation. Der prozentuale Anteil nekrotisierter Blattfläche im Verhältnis zur gesamten Blattfläche wurde geschätzt. Je Wiederholung (n = 5 Pflanzen) wurden jeweils die vordersten drei Blättchen des ersten, zweiten und dritten vollentwickelten Blattes von der Sproßspitze bonitiert.

2.3 Fungizide

Für die Untersuchungen wurden Fungizide verschiedener Wirkstoffklassen ausgewählt, wobei im Rahmen der Gewächshausuntersuchungen die Auswirkungen von 'Iprovalicarb' als neuem Wirkstoff auf den Befall von *Phytophthora infestans* im Vordergrund standen.

2.3.1 Wirkstoffe

2.3.1.1 'Iprovalicarb'

'Iprovalicarb' ([2-Methyl-1-[1-(4-methylphenyl)-ethylaminocarbonyl]-propyl]-carbaminsäureisopropylester) ist ein systemischer Wirkstoff gegen Oomyceten aus der neuen chemischen Stoffklasse der Aminosäureamidcarbamate, der von der Bayer AG, Monheim, entwickelt wurde. Der Wirkstoff (98,7 %) wurde mit dem Emulgator PS 16 in Aceton (2 %) formuliert.

2.3.1.2 'Propamocarb-Hydrochlorid'

Handelsname: Previcur N[®], 722 g/l, wasserlösliches Konzentrat

'Propamocarb-Hydrochlorid' (in der Folge: 'Propamocarb'; Propyl 3-(dimethylamino)-propylcarbamate) gehört zu den Vertretern der Carbamate. Der Wirkstoff wurde vor allem zur Bekämpfung von Wurzel- und Stengelkrankheiten, die durch *Pythium*- und *Phytophthora*-Arten verursacht werden, von der Hoechst Schering AgrEvo GmbH, Düsseldorf, entwickelt.

2.3.1.3 'Azoxystrobin'

Handelsname: Amistar[®], 250 g/l, Suspensionskonzentrat

'Azoxystrobin' (Methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylat) gehört zu der Wirkstoffklasse der Strobilurine und wird zur Bekämpfung von Getreidekrankheiten eingesetzt. Das Präparat stammt von Zeneca, Frankfurt/Main.

2.3.1.4 'Metalaxyl'

Handelsname: Fongamil Neu[®], 240 g/l, emulgierbares Konzentrat

'Metalaxyl' (Methyl N-(2-methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninat) gehört zu der chemischen Stoffklasse der Phenylamide und wird zur Oomycetenbekämpfung eingesetzt. Der Wirkstoff wurde von der Ciba-Geigy GmbH, Frankfurt, entwickelt.

2.3.1.5 'Dimethomorph'

Handelsname: Acrobat[®], 500 g/kg, wasserdispergierbares Pulver

'Dimethomorph' (4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-acryloyl]-morpholin), ein Vertreter der chemischen Stoffklasse der Zimtsäurederivate zur Bekämpfung von Oomyceten, wurde von der Cyanamid Forschung GmbH, Schwabenheim, entwickelt.

2.3.2 Anwendung

Für die **Gewächshausversuche** wurde 'Iprovalicarb' unmittelbar vor der Applikation formuliert und mit Leitungswasser angesetzt. Protektive Applikationen erfolgten mit 'Iprovalicarb'-Konzentrationen von 0,1 bis 50 ppm a.i., kurative Applikationen mit 'Iprovalicarb'-Konzentrationen von 5 und 10 ppm a.i. zum Zeitpunkt der Inokulation, fünf, 10 und 24 Stunden nach der Inokulation. Der Wirkstoff wurde mit einer preßluftbetriebenen Spritzpistole mit einem Druck von 2 bar bis kurz vor dem Ablaufen auf die intakten Pflanzen gesprüht. Die Auswertung erfolgte fünf Tage nach Inokulation.

Für die **mikroskopischen Untersuchungen** an fixierten Tomatenblattstücken wurde 'Iprovalicarb' mit einer Konzentration von 5 ppm a.i. auf intakte Pflanzen gesprüht. Die Blätter wurden 24 Stunden später, nach Antrocknung des Spritzbelags in eine transparente Feuchtekammer gelegt. Die kurativen Applikationen (5 und 10 ppm a.i.) erfolgten durch Zugabe der Fungizidlösung in den Tropfen Zoosporensuspension fünf und 10 Stunden nach der Inokulation. Die Auswertung wurde bei protektiv behandelten Tomatenblättern vier, sechs, acht und 12 Stunden nach der Inokulation, bei kurativ behandelten 29 bzw. 34 Stunden nach Inokulation durchgeführt.

Weiterhin wurde die Wirkung von 'Iprovalicarb' auf die Entwicklung von *Phytophthora infestans* auf und im Tomatenblatt in Abhängigkeit von den Applikationsbedingungen des Wirkstoffs untersucht. Dafür wurden die mit 'Iprovalicarb' benetzten Tomatenblätter sofort nach Applikation oder 24 Stunden nach Antrocknen des Spritzbelags in eine transparente Feuchtekammer überführt. Die Auswertung erfolgte 16 Stunden nach Inokulation.

In **in vitro-Untersuchungen** wurde die Wirkung verschiedener Oomycetenfungizide auf die Zoosporenkeimung und das Keimschlauchwachstum erfaßt. Dafür wurde 'Iprovalicarb' in den Konzentrationen von 0,01 bis 10 ppm a.i., 'Propamocarb' von 0,01 bis 100 ppm a.i., 'Azoxystrobin' von 0,01 bis 0,5 ppm a.i., 'Metalaxyl' von 0,01 bis 200 ppm a.i. und 'Dimethomorph' von 0,01 ppm bis 0,3 ppm a.i. angewendet. Die hemmende Wirkung der Fungizide auf das Myzelwachstum von *Phytophthora infestans* wurde auf Gemüsesaftagar untersucht. Dazu wurde der Gemüsesaftagar mit Fungizidlösung versehen, so dass für 'Iprovalicarb' Endkonzentrationen im Bereich von 0,01 bis 0,4 ppm a.i., für 'Propamocarb' und 'Metalaxyl' von 0,01 bis 1000 ppm a.i., für 'Azoxystrobin' und für 'Dimethomorph' von 0,01 ppm bis 1 ppm a.i. erreicht wurden.

2.4 *In vitro*-Untersuchungen zur Wirksamkeit von 'Iprovalicarb' und anderen fungiziden Wirkstoffen gegenüber *Phytophthora infestans*

2.4.1 Keimung und Keimschlauchwachstum encystierter Zoosporen

Zur Untersuchung der unter Stoffeinfluß gekeimten Zoosporen und gebildeten Keimschläuche von *Phytophthora infestans* in Abhängigkeit vom Kulturmedium wurden Zoosporensuspensionen von einem Einspor-Isolat mit Leitungswasser, demineralisiertem Wasser und Ringerlösung (4,8 % Natriumchlorid, 0,02 % Kaliumchlorid, 0,02 % Calciumchlorid und 0,1 % Natriumhydrogencarbonat) hergestellt. Nach erfolgtem Zoosporenschlupf wurde eine Zoosporenkonzentration von 90.000 Zoosporen/ml eingestellt. Die Keimung der Zoosporen erfolgte bei 18 °C in einer Feuchtekammer auf Deckgläschen und wurde 24 Stunden später durch Zugabe von Formaldehyd (3,5 %) unterbrochen. Geprüft wurde der Einfluß von verschiedenen Konzentrationen von 'Iprovalicarb' auf die Keimung. Die Untersuchungen zur keimungshemmenden Wirkung von 'Propamocarb', 'Azoxystrobin', 'Metalaxyl' und 'Dimethomorph' erfolgten an Zoosporen von *Phytophthora infestans*, die sich 3,5 Stunden in Leitungswasser entwickelt hatten.

Zur Untersuchung des Einflusses von 'Iprovalicarb' auf die Weiterentwicklung bereits vorhandener Keimschläuche unterschiedlicher Länge wurden Zoosporen von einem Einspor-Isolat untersucht, die nach dem Zoosporenschlupf 45 Minuten, 1½ und 2¼ Stunden bei 18 °C auf einem Deckglas keimten. Die weitere Entwicklung bei 18 °C wurde nach zwei Stunden durch Zugabe von Formaldehyd (3,5 %) unterbrochen. Die Länge der gebildeten Keimschläuche wurde mit der, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' in den Konzentrationen von 0,1 bis 10 ppm a.i. entwickelten, verglichen.

2.4.2 Myzelwachstumstest

Das radiale Myzelwachstum wurde von 11 verschiedenen *Phytophthora infestans*-Isolaten auf 'Iprovalicarb'-freiem und -haltigem Gemüsesaftagar ermittelt. Die 'Iprovalicarb'-Konzentrationen lagen in einem Bereich von 0,01 bis 1 ppm a.i.. Die Auswertung wurde neun Tage nach Überimpfung des Pathogens auf Agar durchgeführt.

Weiterhin wurde der Einfluß von 'Iprovalicarb' auf das radiale Myzelwachstum an 10 Einspor-Isolaten von *Phytophthora infestans* untersucht, während die Wirkung von 'Propamocarb', 'Azoxystrobin', 'Metalaxyl' und 'Dimethomorph' an einem Einspor-Isolat untersucht wurde. Die Fungizidkonzentrationen betragen 0,01 bis 1000 ppm a.i.. Das radiale Myzelwachstum wurde 12 Tage nach Überimpfung von Myzel bestimmt.

2.5 Lichtmikroskopische Untersuchungen

2.5.1 Mikroskopie

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop LSM 300 (CLSM) von Zeiss (Göttingen) sowie mit einem Leitz DMRP Photomikroskop (Leica, Bensheim) durchgeführt.

Das CLSM verfügte über drei Plan-Neofluar Objektive mit 10-, 40-, und 63-facher Vergrößerung, sowie ein Plan-Apochrom Objektiv mit einer 100-fachen Vergrößerung. Als Lichtquelle standen zwei Laser mit Anregungswellenlängen von 488 und 543 nm und verschiedene Bandpass- (BP 505-525, BP 510-565 und BP 575-640) und Langpass-Emissionsfilter (LP 515 und LP 570) zur Verfügung. Entlang der z-Ebene, die sich in die Tiefe der Präparate erstreckt, wurden optische Schnittstapel angefertigt. Dabei wurde die Intervallgröße in Abhängigkeit von der Strukturgröße gewählt. Für Übersichtsdarstellungen, die die Entwicklung des Pathogens im Pflanzengewebe zeigen, wurden optische Schnitte in einem Intervall von 1 μm angefertigt. Detaildarstellungen von Mitochondrien, Cytoskelettelementen und Zellwandkomponenten in Zoosporen, Sporangien, Keimschläuchen und Hyphen wurden in Intervallabständen von 0,1 bis 0,5 μm aufgenommen. Durch die variable Einstellung des pinholes (Blende) war es möglich, den Streulichtanteil deutlich zu reduzieren. Entsprechend der Strukturgröße wurde das Pinhole bei filigranen Objekten auf 15 units und bei größeren auf 20 units eingestellt. Die Scanzeit pro Bild betrug 64 Sekunden. Die CLSM-Software (Version 3.96) von Zeiss ermöglichte neben einer tiefenscharfen Darstellung, in der die Strukturen aller Ebenen zu einer Abbildung rekonstruiert werden, auch eine topographische Darstellung der Strukturen. In einer topographischen Abbildung werden die Strukturen in Falschfarben dargestellt, wobei die verschiedenen Farben die räumliche Lage der einzelnen Bildinhalte wiedergeben.

Das Leitz-Mikroskop war mit fünf PL Fluotar Objektiven mit 5-, 10-, 20-, 40- und 100- facher Vergrößerung und einer digitalen Kamera (Hitachi HV-C20A, Düsseldorf) ausgerüstet. Mit Hilfe der Software (Discus Version 4.20, Hilgers, Königswinter) war ein Messen der Keimschlauchlänge möglich.

2.5.2 Präparation

2.5.2.1 Vitalpräparate

In vitro-Untersuchungen früher Entwicklungsstadien von *Phytophthora infestans* erfolgten an Zoosporen von einem Einspor-Isolat, die auf Deckgläschen gekeimt waren, während Hyphen und Sporangien von 12 Tage altem Myzel eines Einspor-Isolates untersucht wurden. Dazu

wurde das Myzel in einen Tropfen Wasser auf Objektträgern überführt. Die morphologische und strukturelle Charakterisierung dieser Entwicklungsstadien erfolgte sowohl im ungefärbten als auch im gefärbten Zustand.

2.5.2.2 Fixierung

Die Entwicklung von *Phytophthora infestans* auf und im Blattgewebe zu verschiedenen Zeiten nach der Inokulation wurde an fixierten Präparaten quantifiziert. Die Tomatenblätter wurden vor der Fixierung mit Chloralhydrat (250 g mit H₂O_{demin.} auf 100 ml auffüllen) auf eine Größe von 1 cm² zugeschnitten. Die Fixierung erfolgte bei 60 °C für 48 Stunden und führte zu einer vollständigen Aufhellung der Tomatenblätter.

2.5.3 Färbetechniken

2.5.3.1 Übersichtsfärbungen zum Nachweis von Pilzstrukturen im Blattgewebe

Die Entwicklung von *Phytophthora infestans* auf und im Blattgewebe wurde an fixierten Präparaten, die anschließend mit Säurefuchsin-Lactophenol (Fluka, Buchs, CH) gefärbt wurden, verfolgt. Säurefuchsin-Lactophenol ist ein Farbstoff für die Licht- und für die Fluoreszenz-Mikroskopie, der an Kohlenhydrate bindet. Der Farbstoff färbte sowohl pilzliche Strukturen als auch nekrotisierte Mesophyllzellen. Die mit Chloralhydrat fixierten Blattstücke wurden für ein bis zwei Stunden in eine 0,01 prozentige Säurefuchsin-Lactophenol-Lösung überführt. Die Auswertung erfolgte mit dem 100-er Objektiv am CLSM im konfokalen Modus (Laser-Anregungswellenlänge 543 nm, Emissionsbandpassfilter 575-640 nm).

2.5.3.2 Nachweis von Mitochondrienvitalität

Zur Darstellung vitaler Mitochondrien und Membransysteme in gekeimten Zoosporen und im Myzel wurde nach MATZKE & MATZKE (1986) 3,3-Dihexyloxacabocyanin-Jodid (DIOC₆, 40 µM, Molecular Probes, Leiden, NL) verwendet. Dieser Farbstoff fluoreszierte aufgrund von Membranpotentialen vitaler Zellkompartimente. Zur Färbung der gekeimten Zoosporen wurden 10 µl der DIOC₆-Lösung zu einem Tropfen Zoosporensuspension (20 µl) von *Phytophthora infestans* auf einem Objektträger gegeben und 30 Minuten in einer Feuchtekammer inkubiert. Myzel wurde für 30 Minuten in eine DIOC₆-Lösung gegeben und danach mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Die Auswertung erfolgte am CLSM mit dem 100-er Objektiv im konfokalen Modus mit dem Laser der Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsbandpassfilter von 505-525 nm. Die Markierung wurde sowohl an Zoosporen durchgeführt, die sich 24 Stunden in Leitungswasser mit oder ohne 'Iprovalicarb' entwickelt

hatten, als auch an 12 Tage altem Myzel, das auf 'Iprovalicarb'-haltigem oder -freiem Gemüsesaftagar gewachsen war.

2.5.3.3 Nachweis von Cytoskelettelementen

Das Cytoskelett besteht unter anderem aus den Proteinen Actin und Tubulin. Diese sind einer permanenten Poly- und Depolymerisation unterworfen, die eine ständige Strukturveränderung des Cytoskeletts zur Folge hat. Actin kann als globuläres (G)-Actin oder als filamentöses (F)-Actin vorliegen. Die Mikrotubuli bestehen aus zwei fest miteinander verbundenen globulären Untereinheiten, dem α - und β -Tubulin. Wenn Tubulinmoleküle zu Mikrotubuli aggregieren, bilden sie lineare „Proteinfilamente“. Ein vollständiger Mikrotubulus besteht aus 13 Proteinfilamenten, die Seite an Seite um einen Zentralbereich angeordnet sind. Die beiden Cytoskelettelemente wurden an 12 Tage altem Myzel der unbehandelten- und Fungizid-behandelten Variante untersucht.

2.5.3.3.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli können durch den Einbau von Tetramethylrhodamin-markiertem Tubulin (Molecular Probes, Leiden, NL) sichtbar gemacht werden. Das Fluorochrom-markierte Tubulin wird dabei wie zelleigenes Tubulin in Filamente eingebaut. Im Gegensatz zum zelleigenen Tubulin, das ständig zu Filamenten polymerisiert und in freies Tubulin depolymerisiert, wurde das markierte Tubulin nur dreimal in ein Filament integriert. 1 μ l Tetramethylrhodamingekoppeltes Tubulin (90 mM) wurde mit G-PEM-Puffer (80 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM GTP und 10 % DMSO, pH 6,8) verdünnt, so dass man eine Konzentration von 0,9 μ M erhielt. In dieser Farbstofflösung wurde Myzel von *Phytophthora infestans* 10 Minuten gefärbt und anschließend fünf Minuten in modifiziertem G-PEM-Puffer (anstelle von DMSO wurden 60 % Glycerol und 0,1 % Glutaraldehyd dazugegeben) gewaschen und fixiert. Die Auswertung erfolgte mit dem 100-er Objektiv am CLSM mit dem Laser der Anregungswellenlänge von 543 nm und einem Emissionsfilter BP 575-640.

2.5.3.3.2 Actin

Der F-Actinteil des Cytoskeletts wurde mit Alexa[®] 488-markiertem Phalloidin (Molecular Probes, Leiden, NL) angefärbt. 300 Einheiten dieses Farbstoffes wurden in 750 µl Methanol gelöst, dies entsprach einer Konzentration von 13,2 µM. Zum Färben wurden 5 µl dieser Suspension mit 100 µl PBS/2 (Lösung aus 0,01 M K₂HPO₄ mit 0,15 M NaCl durch Zugabe einer Lösung mit 0,01 M KH₂PO₄ mit 0,15 M NaCl auf einen pH-Wert von 7,2 einstellen; mit demineralisiertem Wasser auf das doppelte Volumen auffüllen) verdünnt. Die Endkonzentration betrug 0,66 µM. Die Markierung des F-Actins wurde an Myzel durchgeführt, das vor einer fünfminütigen Färbung mit Fluorochrom-markiertem Phalloidin zweimal drei Minuten in PBS/2 gewaschen wurde. Nach der Färbung wurde das Myzel wieder fünf Minuten in PBS/2 gewaschen um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Myzelstücke wurden direkt nach der Färbung in einen Tropfen PBS/2 übertragen und am CLSM mit dem 100-er Objektiv untersucht. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte mit dem Laser der Anregungswellenlänge von 488 nm. Als Emissionsfilter wurde der Bandpassfilter 510-565 verwendet.

2.5.3.4 Nachweis von Zellwandkomponenten

2.5.3.4.1 Monosaccharide

Für den Nachweis von Zuckerkomponenten in der Zellwand von *Phytophthora infestans* wurden Lectine (Molecular Probes, Leiden, NL) mit Bindungsaffinitäten für verschiedene Zucker ausgewählt (Tab. 2). Durch die Kopplung der Lectine an einen Fluoreszenzfarbstoff wurde deren Bindung an Monosaccharide sichtbar.

Tab. 2: Lectine für den Nachweis bestimmter Monosaccharide.

Lectin	Nachweis von Zucker-Liganden
Concanavalin A	α -D-Mannose \geq α -D-Glucose \geq α -D-N-Acetylglucosamin
Agglutinin RCA ₁₂₀	β -D-Galaktose \geq α -D-Galaktose
Wheat Germ Agglutinin	β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin) ₃ \geq β -D-1,4-N-Acetylglucoamin) ₂ N - Acetylneuraminsäure

Herstellen der Lectin-Suspensionen:

10 mg des Texas Red[®]-markierten Concanavalin A wurden in 1 ml PBS gelöst. Für die Markierung der Monosaccharide wurde die Stammlösung mit PBS auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml Lectin eingestellt.

2 mg des FITC-markierten Agglutinin RCA₁₂₀ wurden in 1,4 ml PBS gelöst. Die Markierung der Monosaccharide erfolgte nach Verdünnen dieser Lösung auf 0,1 mg/ml mit PBS.

5 mg des Oregon Green[®]-markierten Wheat Germ Agglutinins wurden in 2,5 ml PBS gelöst. Nach einer Verdünnung dieser Suspension mit PBS auf 0,1 mg/ml wurde sie zur Markierung der Monosaccharide eingesetzt.

Auf die Zoosporen wurden 20 µl der jeweiligen Lectinsuspension gegeben. Myzelstücke wurden für 30 Minuten in einer Lectinsuspension inkubiert. Die Myzelstücke wurden anschließend in PBS für 10 Minuten gewaschen. Die Auswertung erfolgte am CLSM mit dem 100-er Objektiv, den entsprechenden Lasern und Emissionsfiltern (Tab. 3). Die Markierung der ausgewählten Monosaccharide in der pilzlichen Zellwand erfolgte zum Zeitpunkt des Zoosporenschlupfes, sowie zwei und 3,5 Stunden nach Zoosporenschlupf. Sporangien wurden 24 Stunden nach der Keimung untersucht. Als Keimungsmedium diente Leitungswasser bzw. eine 'Iprovalicarb'-haltige Lösung. Myzel wurde 12 Tage nach Überimpfung auf Fungizid-haltigem oder -freiem Gemüsesaftagar untersucht.

Tab. 3: Anregungswellenlänge der Laser sowie Bandpassfilter für die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie.

Lectin mit gekoppeltem Farbstoff	Anregungswellenlänge des Lasers [nm]	Bandpassfilter für die Emission [nm]
Concanavalin A mit Texas Red [®]	543	575-640
Agglutinin RCA ₁₂₀ mit FITC	488	510-565
Wheat Germ Agglutinin mit Oregon Green [®] 488	488	510-565

2.5.3.4.2 Polysaccharide

Zum Nachweis von Polysacchariden wurde Kongorot (Serva, Heidelberg) verwendet, das an Cellulose bindet. Bei diesem Zucker handelt es sich um ein Homoglykan, in dem mehrere D-Glucose-Einheiten über β 1-4 miteinander verbunden sind. Daneben markiert Kongorot auch Amyloide, die Polysaccharide enthalten. Die Bindung an Cellulose erfolgt über eine Hydrogen-Bindung zwischen einer Hydroxylgruppe des Polysaccharids und der Aminogruppe des Farbstoffs. Myzel und Zoosporen der unbehandelten- und Fungizid-behandelten Variante wurden mit Kongorot in einer Konzentration von 0,1 % gefärbt (0,1 g Kongorot in 0,05 ml Ethanol lösen und auf 100 ml mit $H_2O_{demin.}$ auffüllen). Die konfokale Mikroskopie erfolgte mit einem 100-er Objektiv mit dem Laser der Anregungswellenlänge 543 nm und dem Emissionsfilter BP 575-640.

2.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

2.6.1 Präparation

Myzel eines Einspor-Isolates, das 12 Tage auf Fungizid-freiem oder -haltigem Gemüsesaftagar gewachsen war, wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer frisch angesetzten Lösung aus 2 % Form- und Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) nach KARNOVSKY (1965) fixiert. Nach fünfmaligem Waschen in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2) wurden die Proben in 2 % Osmiumtetroxid für ein bis drei Stunden bei Raumtemperatur nach DALTON (1955) postfixiert. Es folgte ein achtmaliges Waschen in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (pH 7,2).

Vor der Einbettung wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 15, 30, 50, 70, 80, 90, 95 bis 99,8 % entwässert. Die Verweildauer pro Konzentrationsstufe betrug 20 Minuten. Die Einbettung wurde in ERL-Harz (10 g ERL 4206 (Vinylcyclohexandioxid), 6 g D.E.R. (Diglycidylether von Polypropylenglycol), 26 g NSA (Nonenylsuccinatanhydrid), 0,4 g S-1 (Dimethylaminoethanol)) nach SPURR (1969) vorgenommen. Dazu wurden die Proben in eine aufsteigende ERL-Harz/Propylenoxid-Reihe (1:3 für 16 Stunden; 1:1 für acht Stunden; 3:1 für acht Stunden; 100 % ERL-Harz für höchstens zwei Tage) bei 4 °C überführt. Die anschließende Polymerisation wurde in 100 % ERL-Harz in Flacheinbettungsschalen für acht Stunden bei 70 °C durchgeführt.

Die Herstellung der Semidünnschnitte erfolgte mit einem Glasmesser. Zur Auffindung der Untersuchungsobjekte wurde mit 0,1 % Toluidinblaulösung vorgefärbt. Die Ultradünnschnitte (60-100 nm) wurden mit einem Diamantmesser hergestellt und auf Nickelgrids plaziert.

Durch eine Behandlung der Ultradünnschnitte mit zwei prozentigem Uranylacetat im Dunkeln ließ sich der Kontrast verbessern.

2.6.2 Enzymgold-Markierung von Cellulose

Die Herstellung des Cellulase-Gold-Komplexes erfolgte nach BERG (1990). 10 ml Gold-Lösung (15 nm Partikeldurchmesser) wurden zu 1 mg Cellulase (1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucan 4-Glucano-Hydrolase) gegeben, die zuvor in 200 μ l PBS vorgelöst und für 30 Minuten bei 4 °C bei 17.000 g zentrifugiert wurde. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 10 ml Citratpuffer (50 mM, pH 5,4), der eine Zentrifugation mit gleicher Geschwindigkeit folgte. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml Citratpuffer mit 0,02 % (W/V) Polyethylenglycol (20.000 MWT) re-suspendiert.

Die Goldmarkierung wurde nach KANG *et al.* (2000) durchgeführt. Die Ultradünnschnitte wurden für 20 Minuten in Citratpuffer (50 mM/l, pH 5,4) mit 1 % Bovine Serum Albumin (BSA) und 0,5 % Gelatine überführt. Nach Waschen in Citratpuffer und demineralisiertem Wasser erfolgte eine 20-minütige Inkubation der Ultradünnschnitte mit dem Cellulase-Gold-Komplex (1:10 verdünnt mit Citratpuffer). Anschließend wurden die Schnitte nach mehrmaligem Waschen mit Citratpuffer und demineralisiertem Wasser 10 Minuten im Dunkeln mit Uranylacetat kontrastiert. Nach mehreren Waschschritten in demineralisiertem Wasser wurden die Ultradünnschnitte ausgewertet. Als Spezifitätskontrolle dienen Ultradünnschnitte, die mit dem Cellulase-Gold-Komplex inkubiert waren, dem zuvor 1 mg/ml Carboxymethylcellulose zugefügt wurde, und Ultradünnschnitte, die mit Gold-Lösung inkubiert waren.

Alle verwendeten Chemikalien wurden von Sigma (München) bezogen.

2.6.3 Auswertung

Die Anzahl der Goldpartikel wurde pro Quadratcentimeter Zellwandfläche an Foto-Positiven ermittelt. Zusätzlich wurde die Zellwandstärke der Hyphenquerschnitte gemessen.

2.6.4 Mikroskopie

Die ultrastrukturellen Untersuchungen erfolgten mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop EM 109 (Fa. Zeiss, Jena). Für die Photographie standen 'Kodak' Filme (Technical Pan) mit 25 ASA zur Verfügung.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm 'SigmaStat 2,0 für Windows' (Jandel Scientific Software, USA). Daten wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ auf Normalverteilung und Varianzhomogenität überprüft. Unterschiede zwischen den Mittelwerten wurden mit dem t-Test, bei mehr als zwei Varianten mit dem Tukey-Test bestimmt. Bei Daten, die nicht normalverteilt oder varianzhomogen waren, erfolgte die varianzanalytische Verrechnung mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis, ebenfalls mit $p \leq 0,05$. Der Student-Newman-Keuls- und Dunn's Test dienten anschließend zur Berechnung der signifikanten Unterschiede. Signifikante Unterschiede gegenüber nur einer Bezugsvariante wurden mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test bestimmt. Signifikanzen wurden durch unterschiedliche Buchstaben in den Tabellen und Grafiken markiert. Im Ergebnisteil sind die Ergebnisse einzelner, repräsentativer Versuche dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Ausprägung von Schadsymptomen durch *Phytophthora infestans* an Tomatenpflanzen

Auf unbehandelten Gewächshauspflanzen traten schon 48 Stunden nach der Inokulation mit Zoosporen von *Phytophthora infestans* graugrüne Verfärbungen an Blättern auf, die sich im weiteren Infektionsverlauf zu braunen Nekrosen veränderten. Die Auswirkungen von 'Iprovalicarb' auf die durch *Phytophthora infestans* verursachten Schadsymptome wurden fünf Tage nach der Inokulation als Anteil nekrotisierter Blattfläche erfaßt.

3.1.1 Verminderung von Schadsymptomen nach protektiver Applikation

Unbehandelte Pflanzen der hochanfälligen Tomatensorte 'Frembgens Rheinlands Ruhm' wiesen fünf Tage nach Inokulation im Mittel aller Versuche auf 75 % ihrer Blattfläche Befallsymptome auf. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung für 'Iprovalicarb' gegenüber *Phytophthora infestans* an Tomate zeigt eine starke befallsreduzierende Wirkung nach protektiver Applikation bei einer Wirkstoffkonzentration von 10 ppm a.i. (Abb.1).

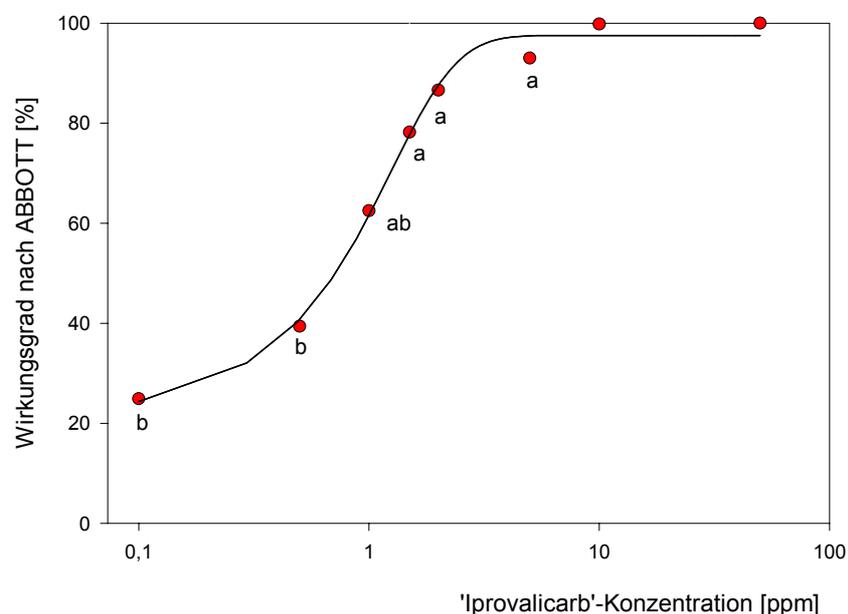


Abb. 1: Dosis-Wirkungs-Beziehung von 'Iprovalicarb' gegenüber *Phytophthora infestans* an Tomatenpflanzen nach protektiver Spritzapplikation (Auswertung fünf Tage nach Inokulation; n = 5 Pflanzen; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).



Bild 1: Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Ausprägung der Befallssymptome von *Phytophthora infestans* an Tomatenpflanzen nach protektiver Applikation (5 und 10 ppm a.i.).

Bereits die Applikation von 5 ppm a.i. des Wirkstoffes bewirkte eine Verminderung des Befalls um mehr als 90 % (Bild 1). Die Formulierung der fungiziden Substanz hatte keinen Einfluß auf den Befall mit *Phytophthora infestans*.

3.1.2 Verminderung von Schadsymptomen nach kurativer Applikation

Die kurative Anwendung von 'Iprovalicarb' mit einer Konzentration von 5 bzw. 10 ppm a.i. reduzierte bis zu 10 Stunden nach der Inokulation mit *Phytophthora infestans* den Befall der Blätter von Tomatenpflanzen um mehr als 80 % (Abb. 2).

Erfolgte die Applikation mit 10 ppm a.i. erst 24 Stunden nach der Inokulation war die Wirkung von 'Iprovalicarb' wesentlich geringer (Bild 2). Obwohl der Wirkungsgrad von 60 % bei dieser Konzentration doppelt so groß war wie nach einer 'Iprovalicarb'-Applikation mit 5 ppm a.i., war eine statistische Absicherung der Daten nicht möglich. Gegenüber der unbehandelten Variante ließen sich alle Fungizid-Varianten statistisch absichern.

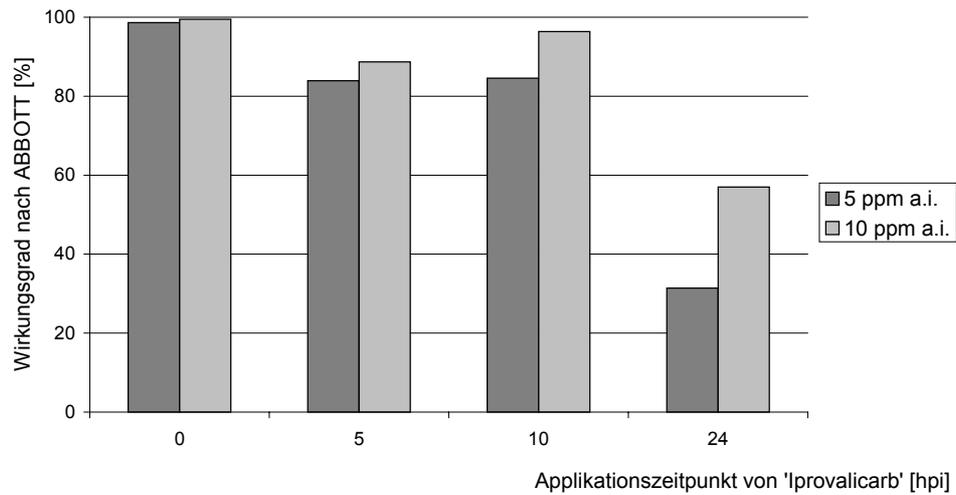


Abb. 2: Wirkung von 'Iprovalicarb' (5 und 10 ppm a.i.) nach kurativer Spritzapplikation auf den Befall von Tomatenpflanzen mit *Phytophthora infestans* (Auswertung sechs Tage nach Inokulation; n = 5 Pflanzen; keine signifikanten Unterschiede innerhalb einer Säulengruppe nach t-Test bei $p \leq 0,05$).

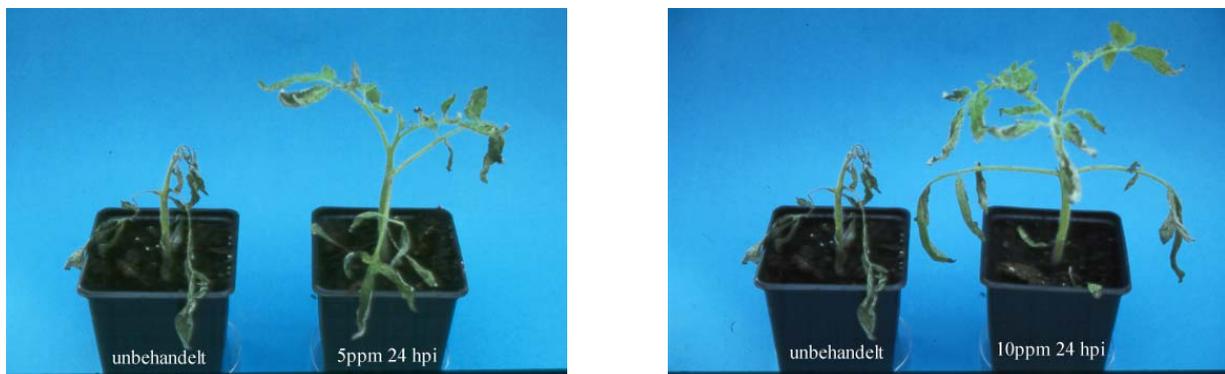


Bild 2: Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Ausprägung der Befallssymptome von *Phytophthora infestans* an Tomatenpflanzen nach kurativer Applikation (5 und 10 ppm a.i., 24 Stunden nach Inokulation).

3.2 Einfluß von 'Iprovalicarb' auf verschiedene Entwicklungsstadien von *Phytophthora infestans* *in vitro*

3.2.1 Zoosporenkeimung und Keimschlauchwachstum encystierter Zoosporen

Der Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Zoosporenkeimung und das Keimschlauchwachstum von *Phytophthora infestans* wurde in verschiedenen Kulturmedien mikroskopisch untersucht. Zur Bestimmung der Keimungsrate wurden pro Variante viermal 50 Zoosporen ausgezählt und zur Ermittlung der Keimchlauchlängen wurden pro Variante viermal 20 Keimschläuche gemessen. Eine Zoospore wurde als gekeimt bonitiert sobald die Ausbildung eines Keimschlauches erkennbar war.

In Abhängigkeit vom Kulturmedium

Erfolgte der Zoosporenschlupf und das Keimschlauchwachstum in Leitungswasser, keimten innerhalb von 24 Stunden 90 % der Zoosporen und bildeten einen Keimschlauch mit einer mittleren Länge von 120 µm aus (Abb. 3 und 4). In demineralisiertem Wasser keimten im Vergleich dazu nur 35 % der Zoosporen mit einer mittleren Keimschlauchlänge von 50 µm. Entwickelten sich die Zoosporen in isotonischer Ringerlösung, bildeten über 80 % der Zoosporen einen Keimschlauch mit einer mittleren Länge von 120 µm.

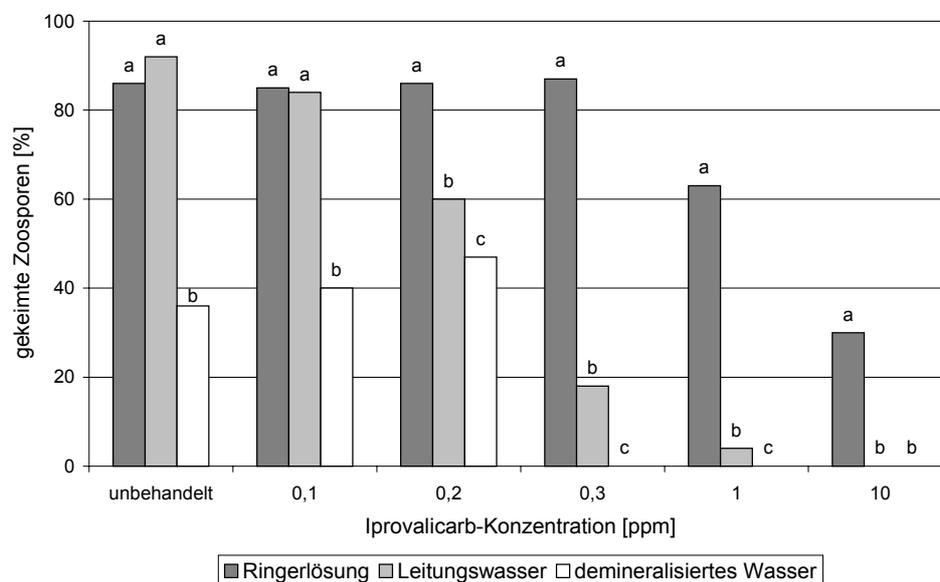


Abb. 3: Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Zoosporenkeimung von *Phytophthora infestans* in Abhängigkeit vom Kulturmedium nach 24-stündiger Entwicklung (n = 4 x 50 Zoosporen; unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Säulengruppe kennzeichnen Signifikanz nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$).

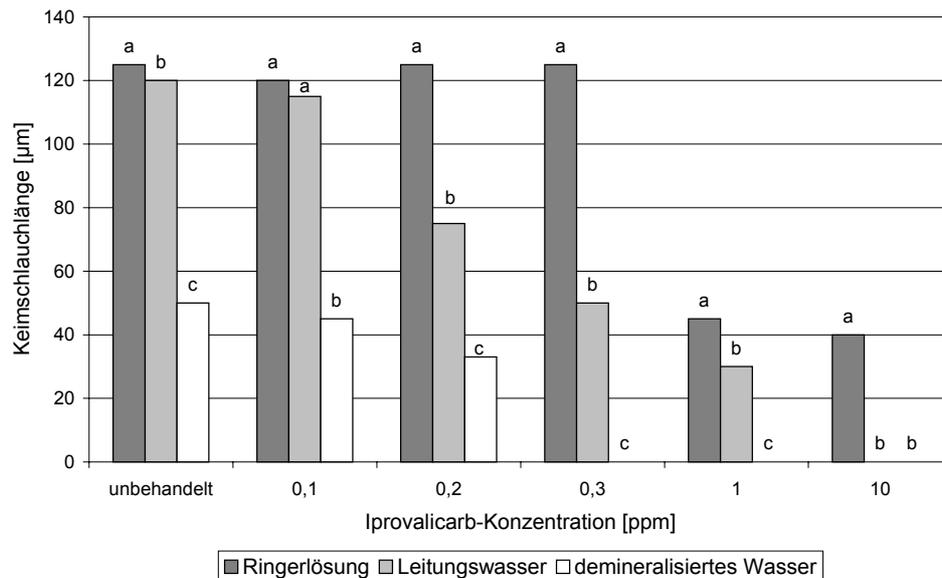


Abb. 4: Einfluß von 'Iprovalicarb' auf das Keimschlauchwachstum von *Phytophthora infestans* in Abhängigkeit vom Kulturmedium nach 24-stündiger Entwicklung (n = 4 x 20 Keimschläuche; unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Säulengruppe kennzeichnen Signifikanz nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$).

Unter dem Einfluß von 'Iprovalicarb' wurde die Keimung der sich in Leitungswasser entwickelten Zoosporen ab einer Konzentration von 0,3 ppm a.i. wirksam unterdrückt. Das Keimschlauchwachstum wurde um mehr als die Hälfte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduziert. Entwickelten sich die Zoosporen in demineralisiertem Wasser, unterblieb deren Keimung bei einer 'Iprovalicarb'-Konzentration von 0,3 ppm a.i.. Niedrigere 'Iprovalicarb'-Konzentrationen hatten einen geringen Einfluß auf die Keimschlauchlänge. Erfolgte die Entwicklung des Pathogens in Ringerlösung, blieb die starke keimungshemmende Wirkung von 'Iprovalicarb' bei einer Konzentration von 0,3 ppm a.i. aus, so dass bei einer Konzentration von 10 ppm a.i. noch 30 % der Zoosporen keimten. Die Länge der Keimschläuche wurde mit steigender Fungizidkonzentration geringer und betrug bei einer 'Iprovalicarb'-Konzentration von 10 ppm a.i. nur noch durchschnittlich 40 µm im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Formulierhilfsstoffe für 'Iprovalicarb' hatten keine Auswirkung auf die Zoosporenkeimung und das Keimschlauchwachstum.

Wachstum der Keimschläuche nach Fungizidapplikation in Abhängigkeit ihres Entwicklungsstadiums

Da 'Iprovalicarb' einen ausgeprägten Einfluß auf die Zoosporenkeimung zeigte (s. Abb. 3), wurde untersucht, inwieweit es einen Einfluß auf die Entwicklung bereits gekeimter Zoosporen hatte.

Hatten die Zoosporen vor Fungizidapplikation einen Keimschlauch von durchschnittlich 13 µm ausgebildet (Bild 3a), war die Hemmung auf das Keimschlauchwachstum durch 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.) in den darauffolgenden zwei Stunden gering (Tab. 4). Die Keimschlauchlänge der Zoosporen, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' entwickelten, betrug 36 µm, während die Keimschläuche der unbehandelten Kontrolle mit 45 µm nicht wesentlich länger waren.

Betrug die Länge der Keimschläuche vor Fungizidapplikation im Mittel 30 µm (Bild 3b), zeigte 'Iprovalicarb' eine deutlichere Wirkung auf die Weiterentwicklung der Keimschläuche. Nach Zugabe einer 'Iprovalicarb'-Konzentration von 0,5 ppm a.i. stagnierte das Keimschlauchwachstum bei einer Länge von 40 µm. Im Vergleich dazu verlängerten sich die Keimschläuche der gekeimten Zoosporen in der unbehandelten Kontrolle auf 60 µm.

Tab. 4: Wachstum bereits gekeimter Zoosporen von *Phytophthora infestans* nach zweistündiger Entwicklung in Gegenwart von 'Iprovalicarb' (n = 4 x 20 Keimschläuche; unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Säulengruppe kennzeichnen Signifikanz nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$).

Variante	Länge der Keimschläuche zwei Stunden nach Wirkstoffapplikation [µm]		
	Keimschlauchlänge zum Zeitpunkt der Wirkstoffapplikation (13 µm)	Keimschlauchlänge zum Zeitpunkt der Wirkstoffapplikation (30 µm)	Keimschlauchlänge zum Zeitpunkt der Wirkstoffapplikation (43 µm)
unbehandelt	45,4 a	60,6 a	69,9 a
0,1 ppm a.i.	48,9 a	59,7 a	63,2 b
0,5 ppm a.i.	41,6 b	42,1 b	43,6 c
5 ppm a.i.	36,1 c	40,3 b	42,1 c
10 ppm a.i.	38,2 c	41,2 b	44,3 c

Wesentlich ausgeprägter war die Wirkung von 'Iprovalicarb' auf die Entwicklung der Keimschläuche, deren Länge vor Fungizidzugabe im Durchschnitt 43 µm betrug (Bild 3c). Ab einer Konzentration von 0,5 ppm a.i. der fungiziden Substanz fand keine Verlängerung des Keimschlauchwachstums statt. Die mittlere Länge vor und nach Wirkstoffapplikation betrug 43,6 µm, während die Keimschläuche der unbehandelten Kontrolle in derselben Zeit eine Länge von 70 µm erreichten. Die Formulierung der fungiziden Substanz zeigte keinen Einfluß auf das Keimschlauchlängenwachstum.

3.2.2 Myzelwachstum

Das radiale Myzelwachstum von verschiedenen *Phytophthora infestans*-Isolaten sowie von Einspor-Isolaten auf 'Iprovalicarb'-freiem oder -haltigem Agar wurde untersucht. Das radiale Myzelwachstum wurde nach neun Tagen erfaßt.

In Abhängigkeit von verschiedenen *Phytophthora infestans*-Isolaten

Ab einer Wirkstoffkonzentration von 0,5 ppm a.i. wurde eine starke Hemmung des radialen Myzelwachstums von mindestens 70 % bei allen Isolaten beobachtet (Tab. 5). Einige Isolate wiesen bei dieser Konzentration kein Wachstum mehr auf. Ab 1 ppm a.i. wurde auch das Myzelwachstum anderer Isolate vollständig unterdrückt, mit Ausnahme des Isolats Nr. 31.

Tab. 5: Radiales Myzelwachstum verschiedener *Phytophthora infestans*-Isolate in Gegenwart von 'Iprovalicarb' gegenüber unbehandelt (Auswertung neun Tage nach Überimpfung; n = 4; unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Konzentration kennzeichnen Signifikanz nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$).

Variante [ppm]	Radiales Myzelwachstum [%] gegenüber unbehandelt										
	Isolat-Nummer										
	1	3	12	18	19	22	24	26	27	31	32
0,05	97 b	100 ab	100 a	100 a	100 ab	100 a	100 ab	100 ab	100 ab	100 a	100 a
0,1	84 b	100 a	97 a	95 a	97 a	100 a	108 a	100 a	100 a	100 a	92 a
0,5	0 e	13 c	14 c	9 d	16 c	9 d	23 b	0 e	22 b	31 a	12 d
1,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0

In Abhängigkeit von verschiedenen Einspor-Isolaten von *Phytophthora infestans*

Das Wachstum aller zehn Einspor-Isolate von *Phytophthora infestans* wurde durch 'Iprovalicarb' ähnlich beeinträchtigt. Ab einer 'Iprovalicarb'-Konzentration von 0,4 ppm a.i. wurde das radiale Myzelwachstum um mehr als 95 % gehemmt (Tab. 6).

Tab. 6: Radiales Myzelwachstum von zehn Einspor-Isolaten von Isolat 19 von *Phytophthora infestans* in Gegenwart von 'Iprovalicarb' gegenüber unbehandelt (Auswertung 12 Tage nach Überimpfung; n = 3; unterschiedliche Buchstaben innerhalb einer Konzentration kennzeichnen Signifikanz nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$).

Variante [ppm]	Radiales Myzelwachstum gegenüber unbehandelt [%]									
	Ein-Zoospor-Isolatnummer									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,05	100 b	96 d	101 a	98 c	93 d	95 d	92 d	93 d	94 d	98 b
0,1	96	92	93	95	94	88	94	94	91	91
0,4	1	1	1	2	1	2,2	1	1	1	1
0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3.3 Einfluß von 'Iprovalicarb' auf den Infektionsverlauf von *Phytophthora infestans* an Tomatenpflanzen

Zur mikroskopischen Charakterisierung des fungiziden Einflusses auf den Infektionsverlauf von *Phytophthora infestans* im Blattgewebe wurden die Zoosporenkeimung und die Appressorienbildung auf der Blattoberfläche sowie die Myzelentwicklung im Pflanzengewebe qualitativ und quantitativ erfasst.

3.3.1 Frühe Entwicklung auf der Blattoberfläche

Zur Charakterisierung der Wirkung von 'Iprovalicarb' auf frühe Entwicklungsstadien wurde die Zoosporenkeimung vier und sechs Stunden, die Appressorienbildung zusätzlich acht und 12 Stunden nach der Inokulation untersucht. Es wurden pro Variante 20 Zoosporen auf vier Blattscheiben ausgewertet.

3.3.1.1 Zoosporenkeimung

Bereits vier Stunden nach der Inokulation hatten sich die Zoosporen encystiert und einen Keimschlauch gebildet (Tab. 7; Bild 4a).

Unter dem Einfluß von 'Iprovalicarb' wurde die Keimung des Pathogens um mindestens 40 % gehemmt. Keimschläuche, die unter Wirkstoffeinfluß gebildet wurden, besaßen teilweise aufgelöste Zellwandstrukturen (Bild 4b) oder wiesen partielle Verdickungen auf (Bild 4c).

Tab. 7: Keimungsrate von *Phytophthora infestans* auf protektiv behandelten Tomatenblättern vier und sechs Stunden nach Inokulation mit 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.; n = 4 x 20 Zoosporen; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Rohdaten nach Mann-Whitney Rank Sum Test bei $p \leq 0,05$).

Fixierungszeitpunkt nach der Inokulation [hpi]	Behandlung	Keimung [%]
4	unbehandelt	100a
4	5 ppm a.i.	60b
6	unbehandelt	100a
6	5 ppm a.i.	55b

3.3.1.2 Appressorienbildung

Nach erfolgter Keimung orientierten sich die Keimschläuche bei engem Kontakt mit der Wirtsoberfläche entlang der Epidermiszellgrenzen. Die Keimschläuche erreichten eine Länge von 40-80 µm und bildeten an der Spitze ein Appressorium. Vier Stunden nach der Inokulation hatten 90 % der gekeimten Zoosporen ein ovales oder rundes Appressorium auf unbehandelten Tomatenblättern ausgebildet (Tab. 8, Bild 4a). Zu diesem Zeitpunkt war der Pilz in vielen Fällen bereits in die Pflanzenzelle eingedrungen. Zwölf Stunden nach der Inokulation hatten fast alle Zoosporen ein Appressorium ausgebildet.

Tab. 8: Appressorienbildung von *Phytophthora infestans* auf protektiv behandelten Tomatenblättern vier, sechs, acht und 12 Stunden nach Inokulation mit 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.; n = 4; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Rohdaten nach Mann-Whitney Rank Sum Test bei $p \leq 0,05$).

Fixierungszeitpunkt nach der Inokulation [hpi]	Behandlung	Appressorienbildung der gekeimten Zoosporen [%]
4	unbehandelt	90 a
4	5 ppm a.i.	54 b
6	unbehandelt	95 a
6	5 ppm a.i.	57 b
8	unbehandelt	95 a
8	5 ppm a.i.	63 b
12	unbehandelt	100 a
12	5 ppm a.i.	50 b

Unter dem Einfluß der fungiziden Substanz wurde die Ausbildung der Appressorien reduziert. Nur noch 50 bis 60 % der gekeimten Zoosporen auf 'Iprovalicarb'-behandelten Tomatenblättern waren in der Lage, ein Appressorium auszubilden. Gelang es, ein Appressorium zu entwickeln, zeigte dieses häufig ein verändertes Aussehen. Anstelle einer runden oder ovalen Struktur bildete der Pilz eine langezogene, flachere Struktur (Bild 4d).

3.3.2 Ausbreitung im Blattgewebe nach protektiver Applikation

Der Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Ausbreitung von *Phytophthora infestans* in der Epidermis und im Palisadenparenchym von Tomatenblättern wurde vier, sechs, acht und 12 Stunden nach der Inokulation untersucht. Pro Variante wurde auf vier Blattscheiben die Ausbreitung von jeweils 20 Zoosporen bewertet.

3.3.2.1 Wachstum in der Epidermis

In einem Zeitraum von vier Stunden gelang es fast allen Zoosporen eine Epidermiszelle zu befallen (Abb. 5).

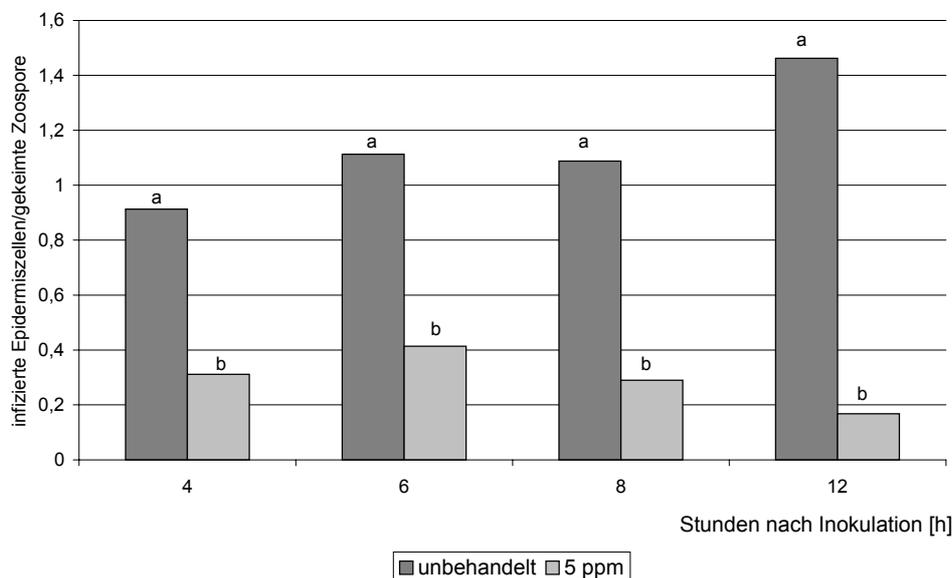


Abb. 5: Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Ausbreitung von *Phytophthora infestans* in der Epidermis von Tomatenpflanzen nach protektiver Applikation (5 ppm a.i.) vier, sechs, acht und 12 Stunden nach der Inokulation (n = 4 x 20 Zoosporen; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb einer Säulengruppe nach t-Test bei $p \leq 0,05$).

Nach erfolgreicher Penetration in die Pflanzenzelle bildete *Phytophthora infestans* ein Primärvesikel, von dem sich schmale Hyphen mit glatter Oberfläche entwickelten (Bild 5a). In den meisten Fällen reagierte die Pflanzenzelle auf den Pathogenbefall mit der Bildung von Nekrosen. Schon 12 Stunden nach Inokulation hatte das Pathogen auch benachbarte Epidermiszellen befallen, wodurch sich der infizierte Bereich in dieser Gewebeschicht vergrößerte. Von dort durchwuchsen die Hyphen den Interzellularraum und besiedelten das Palisadenparenchym. Auch im Palisadenparenchym breitete sich der Pilz sehr rasch aus, indem er mehrere Zellen befiel. Die topographische Darstellung mit Hilfe des konfokalen Laser-Scan-Mikroskops zeigt, wie das Pathogen von einer Epidermiszelle ausgehend, in der das Primärvesikel gebildet wurde, mehrere Epidermiszellen durchwuchs (Bild 5b). Dabei penetrierte der Pilz die epidermalen Zellwände mit einer schmalen Hyphe (Bild 5c-d). Das Myzel ließ sich durch den Farbstoff Säurefuchsin-Lactophenol gleichmäßig markieren, so dass die pilzlichen Strukturen deutlich fluoreszierten.

'Iprovalicarb' zeigte einen deutlichen Einfluß auf die Besiedlung der Epidermis durch *Phytophthora infestans*. Eine Infektion gelang nur noch jeder dritten bis fünften Zoospore. Die Zoosporen, die unter Wirkstoffeinfluß eine Epidermiszelle penetrierten, waren oft nicht mehr in der Lage, in der Pflanzenzelle ein Primärvesikel zu bilden. Kam es dennoch zur Ausbildung eines Primärvesikels, hatte dieses weder eine runde Form noch eine glatte Oberfläche (Bild 6a). Pilzliche Strukturen, die selten in nekrotisierten Epidermiszellen behandelter Tomatenpflanzen beobachtet wurden, zeigten vereinzelt eine Auflösung der Zellwand (Bild 6b), wie bei unter Wirkstoffeinfluß gebildeten Keimschläuchen. Durchwuchs der Pilz in behandelten Tomatenblättern die Zellwände, beobachtete man eine Volumenvergrößerung der Hyphen vor und häufig auch nach Penetration der Zellwände (Bild 6c und 6d). Vereinzelt Hyphenabschnitte zeigten eine sehr starke Fluoreszenz, während andere Hyphenbereiche entweder ungleichmäßig oder weniger stark gefärbt waren (Bild 6d). Weiterhin wurde beobachtet, dass um Hyphen, die sich in behandelten Pflanzen entwickelten, eine partiell unterbrochene, dünne Schicht gelagert war (Bild 6e).

3.3.2.2 Wachstum im Palisadenparenchym

Bereits vier Stunden nach der Inokulation hatte jede fünfte Zoospore von *Phytophthora infestans* die Epidermis durchwachsen, den Interzellularbereich besiedelt und eine Palisadenparenchymzelle befallen (Abb. 6). Die im Mesophyll besiedelten Zellen reagierten, wie auch die Epidermiszellen, auf den Pathogenbefall mit einer Nekrose und zeichneten sich durch eine stärkere Fluoreszenz aus im Vergleich zu den unbefallenen Zellen (Bild 7a). Zwölf Stunden nach der Inokulation hatte jede gekeimte Zoospore eine Palisadenparenchymzelle befallen. Nach 24 Stunden hatte das Pathogen nicht nur das Palisadenparenchym, sondern

auch das tiefer liegende Schwammparenchym vollständig durchwachsen. Sowohl im Palisaden- als auch im Schwammparenchym bildete *Phytophthora infestans* vereinzelt Haustorien aus (Bild 7b).

Durch eine protektive Spritzapplikation von 'Iprovalicarb' mit einer Aufwandmenge von 5 ppm a.i. wurde das Auswachsen des Pathogens aus der Epidermis in das Palisadenparenchym und noch tiefere Blattgewebeschnichten wirksam unterbunden. Gelang es einer Zoospore eine Epidermiszelle zu besiedeln, blieb die Infektionsstelle oft auf diese Gewebeschnicht beschränkt (Bild 7c). Eine Differenzierung der Infektionsstrukturen wurde nicht beobachtet. Die sehr selten gebildeten Haustorien in Mesophyllzellen von behandelten Tomatenblättern wiesen im Gegensatz zur unbehandelten Kontrolle eine kugelförmige Struktur auf (Bild 7d).

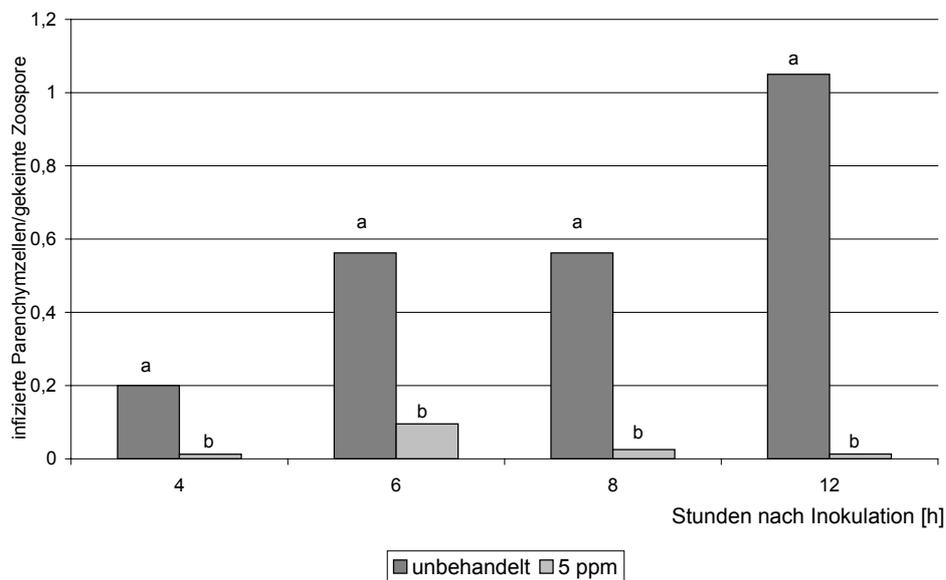


Abb. 6: Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Ausbreitung von *Phytophthora infestans* im Palisadenparenchym von Tomatenpflanzen nach protektiver Applikation (5 ppm a.i.) vier, sechs, acht und 12 Stunden nach der Inokulation (n = 4 x 20 Zoosporen; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb einer Säulengruppe nach Mann-Whitney Rank Sum Test bei $p \leq 0,05$).

3.3.3 Ausbreitung im Blattgewebe nach kurativer Applikation

Der Einfluß von 'Iprovalicarb' nach kurativer Spritzapplikation (5 und 10 ppm a.i.) fünf und 10 Stunden nach Inokulation auf die Ausbreitung von *Phytophthora infestans* wurde untersucht. Dafür wurde die Anzahl befallener Zellen sowohl in der Epidermis als auch im Mesophyll 24 Stunden nach Wirkstoffapplikation erfaßt. Die Auswertung erfolgte an vier Blattscheiben, in denen der Infektionsverlauf von jeweils 20 Zoosporen bewertet wurde.

3.3.3.1 Wachstum in der Epidermis

Innerhalb von fünf Stunden gelang es jeder Zoospore, mindestens eine Epidermiszelle zu befallen. 24 Stunden später hatten schon 50 % der Zoosporen auf unbehandelten Tomatenpflanzen zwei Epidermiszellen befallen (Abb. 7).

Eine 'Iprovalicarb'-Behandlung mit einer Aufwandmenge von 5 ppm a.i. fünf Stunden nach der Inokulation verhinderte die weitere Ausbreitung des Pathogens in der Epidermis. Der Pilz war nicht in der Lage, aus der Epidermiszelle, die er vor der Behandlung mit 'Iprovalicarb' besiedelt hatte, herauszuwachsen.

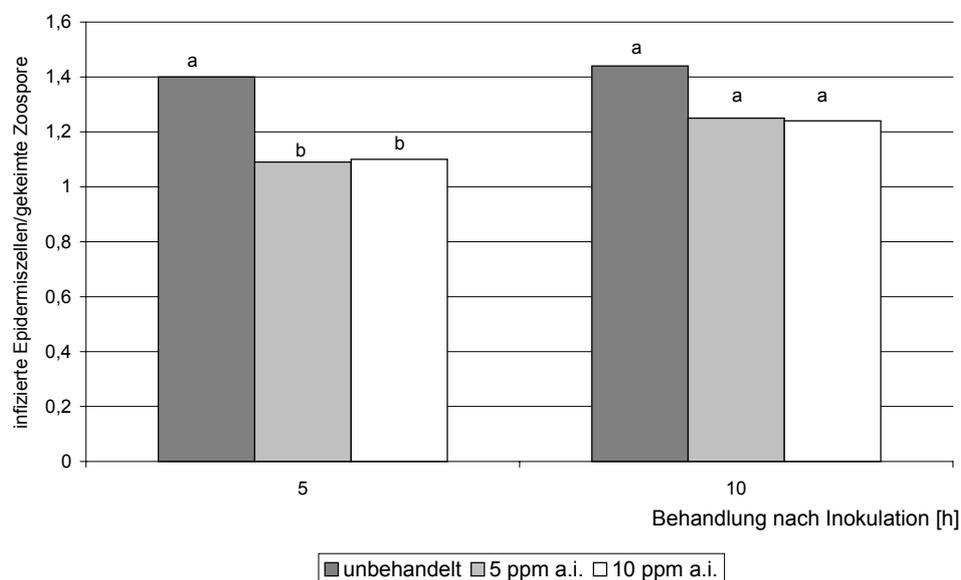


Abb. 7: Wirkung von 'Iprovalicarb' (5 und 10 ppm a.i.) nach kurativer Spritzapplikation fünf und 10 Stunden nach Inokulation auf die Entwicklung von *Phytophthora infestans* in der Epidermis von Tomatenblättern (n = 5 x 20 Zoosporen; Auswertung 24 Stunden nach Wirkstoffapplikation, verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in einer Säulengruppe nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

10 Stunden nach der Inokulation hatten 30 % der Zoosporen schon zwei Epidermiszellen auf unbehandelten Pflanzen befallen. 'Iprovalicarb' unterdrückte eine weitere Ausbreitung des Pathogens in der Epidermis. 24 Stunden nach der Inokulation war dieselbe Anzahl an Epidermiszellen infiziert wie vor der kurativen Behandlung, während auf unbehandelten Pflanzen zu diesem Zeitpunkt 50 % der Zoosporen zwei Epidermiszellen besiedelt hatten. Die Anzahl infizierter Epidermiszellen auf 'Iprovalicarb'-behandelten Pflanzen im Vergleich zu denen auf unbehandelten Pflanzen ließ sich jedoch nicht statistisch absichern.

3.3.3.2 Wachstum im Mesophyll

Fünf Stunden nach Inokulation hatten 50 % der Zoosporen eine Palisadenparenchymzelle infiziert. 24 Stunden später hatte auf unbehandelten Pflanzen jede Zoospore mindestens drei Palisadenparenchymzellen befallen. Zu diesem Zeitpunkt gelang es 25 % der Zoosporen eine Schwammparenchymzelle zu besiedeln (Tab. 9, Abb. 8).

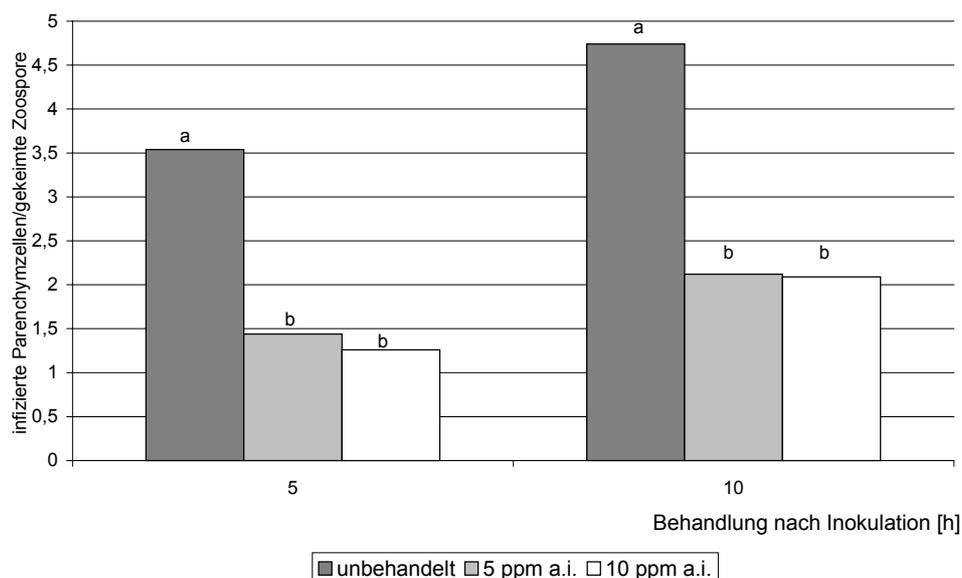


Abb. 8: Wirkung von 'Iprovalicarb' (5 und 10 ppm a.i.) nach kurativer Spritzapplikation fünf und 10 Stunden nach Inokulation auf die Entwicklung von *Phytophthora infestans* im Palisadenparenchym von Tomatenblättern (n = 5 x 20 Zoosporen; Auswertung 24 Stunden nach Wirkstoffapplikation, verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede in einer Säulengruppe nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

Erfolgte fünf Stunden nach der Inokulation eine 'Iprovalicarb'-Behandlung mit 5 ppm a.i., wurde die Ausbreitung von *Phytophthora infestans* im Palisadenparenchym reduziert. Nur noch 50 % der Zoosporen gelang es, bis 24 Stunden nach der Inokulation durchschnittlich zwei Palisadenparenchymzellen zu befallen. Eine weitere Ausbreitung des Pilzes in das Schwammparenchym wurde unter Wirkstoffeinfluß nicht beobachtet (Tab. 9).

Wurde die Wirkstoffapplikation (5 und 10 ppm a.i.) erst 10 Stunden nach der Inokulation durchgeführt, so besaß 'Iprovalicarb' trotz fortgeschrittener Entwicklung des Pilzes im Blattgewebe eine effektive Wirkung auf die Ausbreitung des Pathogens. Auf 'Iprovalicarb'-behandelten Pflanzen hatte jede Zoospore 24 Stunden nach der Inokulation zwei Palisadenparenchymzellen befallen, während auf unbehandelten Blättern jede Zoospore mindestens vier Palisadenparenchymzellen besiedelt hatte.

Ein Vordringen des Pathogens in das Schwammparenchym in Gegenwart von 'Iprovalicarb' wurde nicht beobachtet. Im Vergleich dazu hatte auf unbehandelten Pflanzen 24 Stunden nach der Inokulation jede Zoospore eine Schwammparenchymzelle befallen (Tab. 9).

Tab. 9: Wirkung von 'Iprovalicarb' (5 und 10 ppm a.i.) nach kurativer Spritzapplikation fünf und 10 Stunden nach Inokulation auf die Ausbreitung von *Phytophthora infestans* im Schwammparenchym von Tomatenblättern (n = 5 x 20 Zoosporen; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$).

Behandlung	Befallene Schwammparenchymzellen/ gekeimte Zoospore in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der kurativen Wirkstoffapplikation	
	5 hpi	10 hpi
unbehandelt	0,24 a	1 a
5 ppm a.i.	0 a	0 b
10 ppm a.i.	0 a	0 b

3.3.4 Einfluß der Applikationsbedingungen auf die Wirkung von 'Iprovalicarb'

Die Wirkung von 'Iprovalicarb' ist sehr stark von der Luftfeuchtigkeit zum Applikationszeitpunkt abhängig. Der Einfluß unterschiedlicher Applikationsbedingungen auf die Wirkung von 'Iprovalicarb' auf *Phytophthora infestans* an Tomatenpflanzen wurde untersucht. Der Wirkstoff wurde für beide Varianten in einer Aufwandmenge von 5 ppm a.i. auf die Tomatenblätter aufgetragen. Anschließend wurde ein Teil der mit 'Iprovalicarb' benetzten Blätter sofort für 24 Stunden in eine transparente Feuchtschale gelegt, während der andere Teil der Blätter erst 24 Stunden nach der Wirkstoffapplikation in Feuchtekammern überführt wurde, so dass der Spritzbelag antrocknen konnte. Der Einfluß von 'Iprovalicarb' in Abhängigkeit von den Applikationsbedingungen auf die Wirkung von *Phytophthora infestans* wurde auf die Appressorienbildung, Penetration, Primärvesikelbildung und die Anzahl infizierter Zellen sowohl in der Epidermis als auch im Mesophyll pro gekeimter Zoospore 16 Stunden nach Inokulation untersucht. Die Entwicklung von jeweils 20 Zoosporen auf vier Blattscheiben wurde pro Variante bewertet.

3.3.4.1 Entwicklung der Appressorien

Auf unbehandelten Tomatenblättern bildeten alle Zoosporen innerhalb von 16 Stunden ein Appressorium aus (Abb. 9). Erfolgte vor der Inokulation eine 'Iprovalicarb'-Applikation der Tomatenblätter, die erst 24 Stunden später in eine Feuchtekammer überführt wurden, entwickelten 65 % der Zoosporen ein Appressorium. Im Vergleich dazu bildeten weniger als 20 % der Zoosporen ein Appressorium aus, die auf Tomatenblättern gekeimt waren, die sofort nach Wirkstoffapplikation in eine Feuchtekammer gelegt wurden.

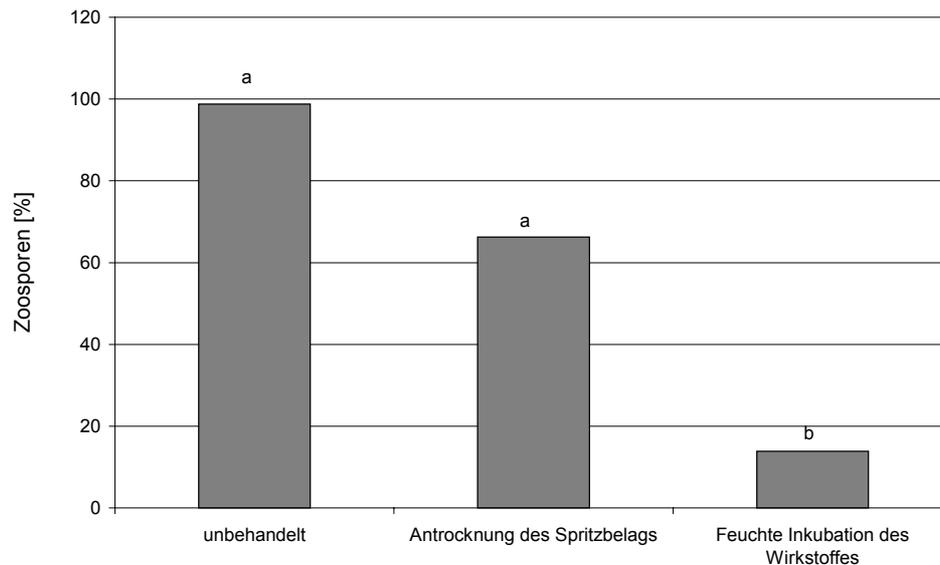


Abb. 9: Einfluß der Applikationsbedingungen auf die Wirkung von 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.) auf die Appressorienbildung von *Phytophthora infestans* auf Tomatenblättern, 16 Stunden nach der Inokulation (n = 4 x 20 Zoosporen; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

3.3.4.2 Penetration und Primärvesikelbildung

Auf unbehandelten Tomatenblättern penetrierten innerhalb von 16 Stunden alle Zoosporen in eine Epidermiszelle und bildeten ein Primärvesikel aus (Abb. 10 und 11).

Entwickelten sich die Zoosporen auf Tomatenblättern mit angetrocknetem Spritzbelag, penetrierten 70 % eine Epidermiszelle. Immerhin 60 % der gekeimten Zoosporen waren in der Lage, ein Primärvesikel zu bilden. Die Penetration des Pilzes in Tomatenblätter, die nach der 'Iprovalicarb'-Behandlung direkt in eine Feuchtekammer überführt wurden, war wesentlich deutlicher gehemmt und ließ sich statistisch absichern. Nur noch 10 % der Zoosporen gelang ein Penetrationserfolg, während die Ausbildung eines Primärvesikels vollständig unterbunden wurde.

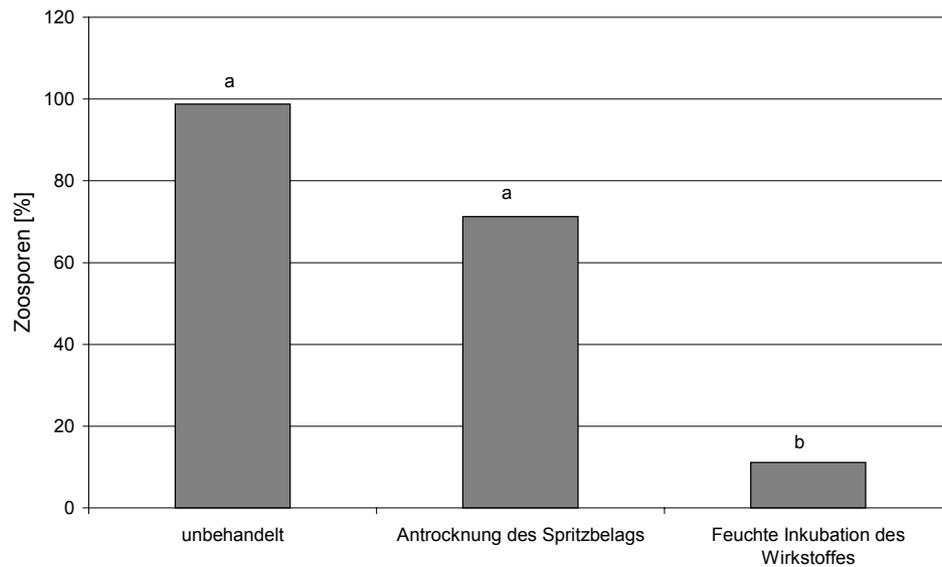


Abb. 10: Einfluß der Applikationsbedingungen auf die Wirkung von 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.) auf die Penetration von *Phytophthora infestans* in Tomatenblättern 16 Stunden nach der Inokulation (n = 4 x 20 Zoosporen; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Tukey bei $p \leq 0,05$).

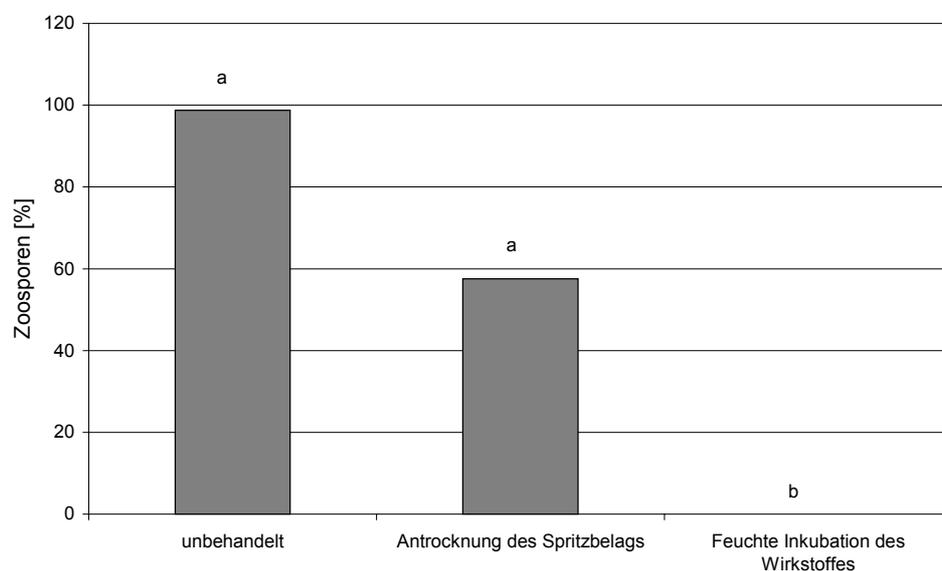


Abb. 11: Einfluß der Applikationsbedingungen auf die Wirkung von 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.) auf die Primärvesikelbildung von *Phytophthora infestans* in Tomatenblättern 16 Stunden nach der Inokulation (n = 4 x 20 Zoosporen; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$).

3.3.4.3 Ausbreitung in der Epidermis

Jede Zoospore war in der Lage, 16 Stunden nach der Inokulation mehr als eine Epidermiszelle auf unbehandelten Tomatenblättern zu befallen (Abb. 12).

Erfolgte die Überführung der Tomatenblätter in eine Feuchtekammer erst 24 Stunden nach einer 'Iprovalicarb'-Applikation, befiel jede Zoospore höchstens eine Epidermiszelle. Wurden die Tomatenblätter nach der Wirkstoffapplikation direkt in eine Feuchtekammer gelegt, befiel nur noch jede zehnte Zoospore eine Epidermiszelle.

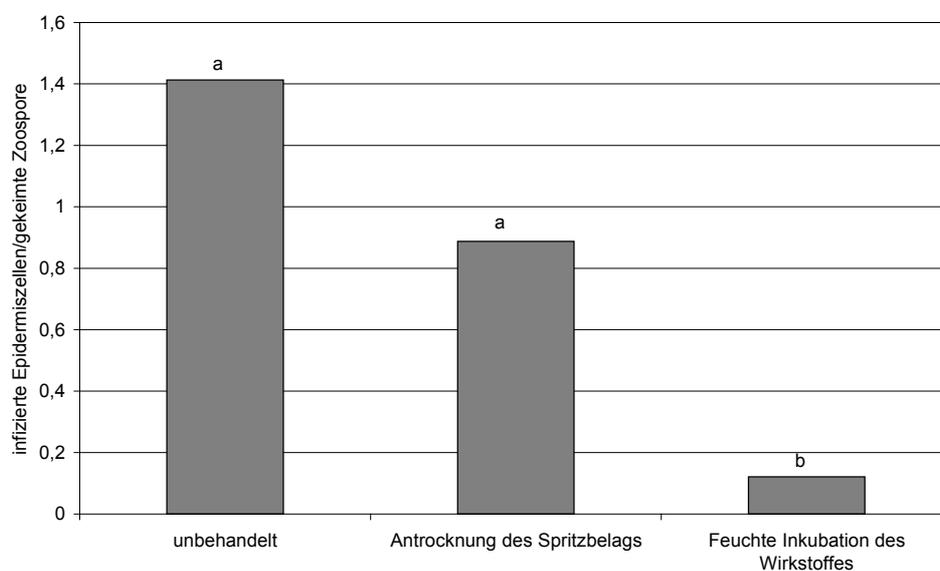


Abb. 12: Einfluß der der Applikationsbedingungen auf die Wirkung von 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.) auf die Ausbreitung von *Phytophthora infestans* in der Epidermis von Tomatenblättern 16 Stunden nach der Inokulation (n = 4 x 20 Zoosporen; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$).

3.3.4.4 Ausbreitung im Mesophyll

Auf unbehandelten Tomatenblättern befiel innerhalb von 16 Stunden jede gekeimte Zoospore nach Durchwachsen der Epidermis durchschnittlich zwei Palisadenparenchymzellen (Abb. 13). Ein weiteres Tiefenwachstum in das Schwammparenchym gelang nur jeder zehnten gekeimten Zoospore (Abb. 14).

Wurden die mit 'Iprovalicarb'-behandelten Tomatenblätter erst 24 Stunden nach der Applikation in eine Feuchtekammer überführt, wurde die Besiedlung des Palisadenparenchyms um ein Drittel reduziert. Ein weiteres Vordringen des Pilzes in das Schwammparenchym wurde selten beobachtet.

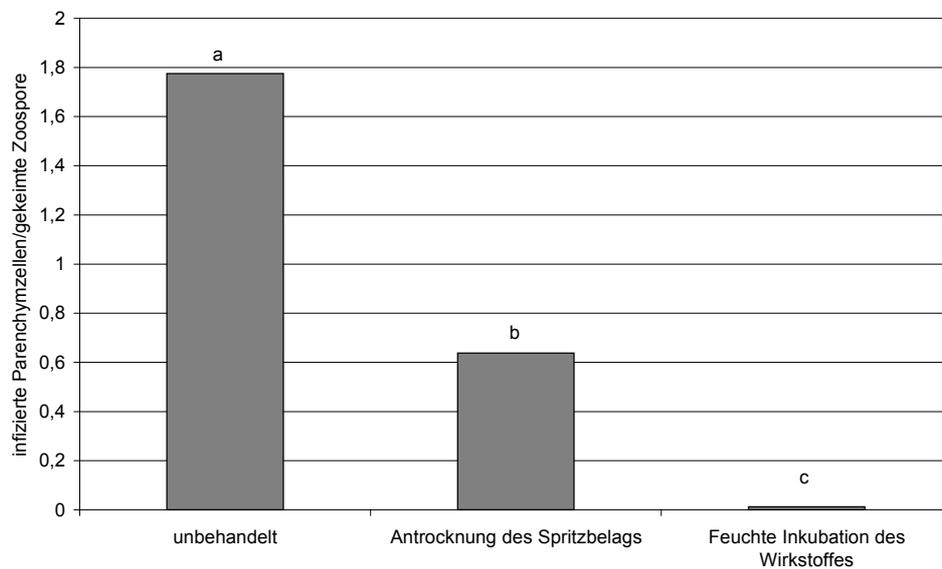


Abb. 13: Einfluß der Applikationsbedingungen auf die Wirkung von 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.) auf die Ausbreitung von *Phytophthora infestans* im Palisadenparenchym von Tomatenblättern 16 Stunden nach der Inokulation (n = 4 x 20 Zoosporen; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$).

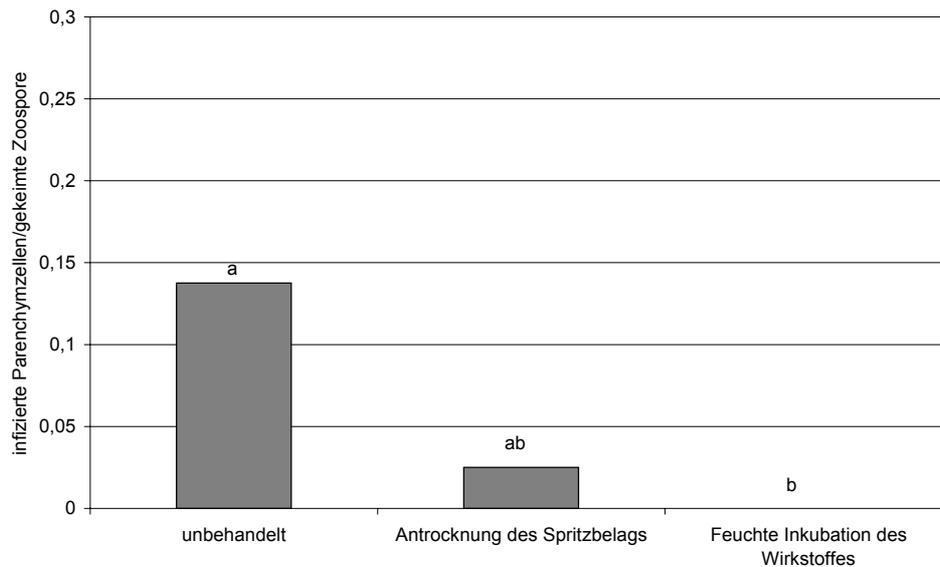


Abb. 14: Einfluß der Applikationsbedingungen auf die Wirkung von 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.) auf die Ausbreitung von *Phytophthora infestans* im Schwammparenchym von Tomatenblättern 16 Stunden nach der Inokulation (n = 4 x 20 Zoosporen; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$).

Wesentlich wirksamer konnte das Vordringen des Pathogens in diese Blattgewebeschnitten durch eine protektive Spritzapplikation mit 'Iprovalicarb' und direktes Überführen der besetzten Tomatenblätter in eine Feuchtekammer unterdrückt werden. Der Pilz war weder in der Lage das Palisaden- noch das Schwammparenchym zu besiedeln.

3.4 Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Struktur von *Phytophthora infestans*

3.4.1 Morphologische Veränderungen des Myzels

Zur Beschreibung von morphologischen Veränderungen durch 'Iprovalicarb' wurden lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurde 'Iprovalicarb' in letalen und subletalen Konzentrationen eingesetzt. Es wurden 50 Hyphenabschnitte von Myzel der unbehandelten Kontrolle und der 'Iprovalicarb'-Variante untersucht.

Phytophthora infestans bildete überwiegend flauschiges, unseptiertes Luftmyzel, das aus dünnen und glattwandigen Hyphen bestand (Bild 8a). Die Hyphenenden waren entweder schmal auslaufend (Bild 8b) oder globulär verdickt.

In einer Zeitreihe wurde der Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Entwicklung des Myzels von *Phytophthora infestans* untersucht. Schon drei Stunden nach Zugabe der fungiziden Substanz in einer letalen Konzentration von 10 ppm a.i. zu gesundem Myzel des Pathogens wurde eine Verdickung und anschließende Lyse der Hyphenspitzen beobachtet (Bild 8c). Bereits nach 12 Stunden traten an den Hyphen untypische Wachstumserscheinungen auf, wie z.B. Verästelungen (Bild 8d) oder die Bildung von kugelförmigen Strukturen (Bild 8e). In einigen Fällen waren diese Wuchsanomalien von einer Lyse der Hyphenwand begleitet. Diese Veränderungen wurden an neugebildeten und nicht an bestehenden Strukturen beobachtet.

Auch in Gegenwart subletaler 'Iprovalicarb'-Konzentration (0,3 ppm a.i.), waren deutliche morphologische Veränderungen am Myzel zu erkennen. An 40 % der untersuchten Hyphenabschnitte kam es zu partiellen Einschnürungen, so dass sie das auffällige Aussehen einer Perlschnur erhielten (Bild 9a). Eine Differenzierung zu Sporangien wurde nicht beobachtet, obwohl an fast allen Hyphenspitzen globuläre Anschwellungen auftraten (Bild 9b). Weiterhin zeigte sich, dass 'Iprovalicarb' nicht nur eine partielle Verdickung der Hyphen und -spitzen von *Phytophthora infestans* bewirkte, sondern, wie auch bei *in planta* Untersuchungen, bei 60 % der verdickten Hyphenabschnitte eine Auflösung der Hyphenwand in diesen Bereichen verursachte. An diesen Stellen kam es häufig zu einem Austreten von Zellinhalt (Bild 9c).

3.4.2 Einfluß auf Monosaccharide in der pilzlichen Zellwand

Die Markierung verschiedener Bausteine in der Zellwand von *Phytophthora infestans* sollte den Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Struktur der Zellwand verdeutlichen. Da die Zellwand zu einem großen Anteil aus Monosacchariden besteht, wurden diese mit Hilfe spezifisch bindender Fluorochrome markiert.

Der Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Nachweisbarkeit von Monosacchariden in der pilzlichen Zellwand erfolgte mit Hilfe von Lectinen. Sie sind in der Lage, spezifisch Zuckerkomponenten zu erkennen und an diese zu binden. Für den Nachweis von Zuckerkomponenten in der Zellwand von *Phytophthora infestans* wurden drei Lectine aufgrund ihres Vorkommens in der Oomycetenzellwand mit Bindungsaffinitäten für verschiedene Zucker ausgewählt. Das Lectin Concanavalin A bindet mit abnehmender Bindungsaffinität an α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin. An β -D-Galaktose und α -D-Galaktose bindet mit abnehmender Affinität Agglutinin RCA₁₂₀ (RCA). Das Wheat Germ Agglutinin (WGA) bindet an β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₃ und β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₂N-Acetylneuraminsäure mit abnehmender Bindungsstabilität.

Die Nachweisbarkeit dieser Zucker in der pilzlichen Zellwand wurde an 50 gekeimten Zoosporen zum Zeitpunkt des Zoosporenschlupfes und 3,5 Stunden nach Zoosporenschlupf der unbehandelten und Fungizid-behandelten Variante untersucht. Der Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Nachweisbarkeit der Monosaccharide in den Zellwänden von 50 gekeimten Sporangien wurde nach 24-stündiger Entwicklung in 'Iprovalicarb'-haltigem oder -freiem Medium untersucht. Der Zuckernachweis in den Zellwänden von Hyphen wurde an 50 Hyphenabschnitten von 12 Tage altem Myzel, das sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem oder -freiem Agar entwickelt hatte, durchgeführt.

3.4.2.1 Von Zoosporen und Keimschläuchen

Mit Hilfe des Lectins Concanavalin A, das mit abnehmender Spezifität an α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin bindet, ließen sich sowohl Sporangien als auch gerade schlüpfende Zoosporen sehr deutlich anfärben (Bild 10a-d). Obwohl Zoosporen das einzige Entwicklungsstadium von *Phytophthora infestans* darstellen, das keine Zellwand aufweist, ließ sich in der Begrenzungsschicht zwischen Cytoplasma und Schlupfmedium eine deutliche Markierung erkennen, die zum Zeitpunkt des beginnenden Zoosporenschlupfes noch sehr schwach war, aber noch während des Austretens aus dem Sporangium intensiver wurde. Trennte sich die Zoospore von dem Sporangium und bewegte sich mit den Geißeln im Schlupfmedium, so war die Randmarkierung der Zoospore noch deutlicher zu erkennen (Bild 11a). Zum Zeitpunkt der Encystierung, ungefähr zwei Stunden nach dem Zoosporenschlupf, warf die Zoospore ihre Geißeln ab, und mit Hilfe von Concanavalin A konnte eine zweischichtige Zellwand markiert werden (Bild 11b).

Zoosporen, die in Gegenwart des Wirkstoffes schlüpften, zeigten keine Veränderungen hinsichtlich des Zuckernachweises durch Concanavalin A.

Die Ausbildung eines Keimschlauches war mit einer Veränderung der Zuckerkomponenten in der pilzlichen Zellwand, die sich durch das Lectin Concanavalin A markieren ließen, verbunden. Lediglich die Ansatzstelle des Keimschlauches an der encystierten Zoospore und ein sehr kleiner Bereich an der Spitze eines kurzen Keimschlauches zeigten bei 75 % der gekeimten Zoosporen eine intensive Fluoreszenz, während die übrigen Zellwandbereiche wesentlich weniger fluoreszierten (Bild 11c). Mit zunehmendem Längenwachstum des Keimschlauches ließen sich die Zuckerkomponenten α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin mit abnehmender Bindungsspezifität zuerst schwach, dann aber immer deutlicher in der Zellwand im unteren Teil aller Keimschläuche nachweisen (Bild 11d).

Unter dem Einfluß von 'Iprovalicarb' gewachsene Keimschläuche zeigten eine Veränderung hinsichtlich des Nachweises der Zucker α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin in der pilzlichen Zellwand. Bildete eine encystierte Zoospore in Gegenwart der fungiziden Substanz (0,2 ppm a.i.) einen Keimschlauch aus, wurde beobachtet, dass die Markierung der Zucker im Bereich der Zellwand des Keimschlauches bei 20 % der gekeimten Zoosporen unterbrochen war (Bild 12a). 70 % der gekeimten Zoosporen lagerten das Fluorochrom-markierte Lectin nur an der Keimschlauchspitze und an der Ansatzstelle des Keimschlauches an (Bild 12b). Weiterhin traten Zoosporen auf, deren Keimschlauchzellwand das Fluorochrom nur sehr schwach anlagerten, während im Keimschlauchlumen eine intensive Fluoreszenz beobachtet wurde. Diese ist auf eine partielle Lyse der Keimschlauchzellwand, durch die das Fluorochrom in das Lumen des Keimschlauches eintreten konnte, zurückzuführen (Bild 12c).

Eine Markierung der Zellwände mit Hilfe des Agglutinins RCA₁₂₀, das an β -D-Galaktose und α -D-Galaktose mit abnehmender Spezifität bindet, wurde an gekeimten Zoosporen durchgeführt, die sich in 'Iprovalicarb'-freiem oder -haltigem Kulturmedium entwickelten. In äußerst seltenen Fällen ließ sich der Ansatzbereich des Keimschlauches gekeimter Zoosporen, die sich in Leitungswasser entwickelt hatten, anfärben. Der größte Teil der Zoosporen lagerte das Fluorochrom-markierte Lectin weder im Bereich des Keimschlauches, noch in der encystierten Zoospore an. Auch in Zoosporen, die in Gegenwart von 'Iprovalicarb' (0,3 ppm a.i.) keimten, war ein Nachweis von β -D-Galaktose und α -D-Galaktose mit Agglutinin RCA₁₂₀ nicht möglich.

Die Zellwände von Keimschläuchen von *Phytophthora infestans* ließen sich durch Wheat Germ Agglutinin, das mit abnehmender Spezifität an β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₃ und β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₂N-Acetylneuraminsäure bindet, markieren. Es wurde beobachtet, dass sich an Zoosporen, die in Leitungswasser keimten, das Fluorochrom-markierte Lectin im gesamten Bereich der Zellwand des Keimschlauches anlagerte (Bild 13a und b). Auch in den Zellwänden von Keimschläuchen, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' (0,4 ppm a.i.) entwickelten, war eine Markierung der Zucker β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₃ und β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₂N-Acetylneuraminsäure möglich (Bild 13c und d). 'Iprovalicarb' hatte keinen Einfluß auf den Nachweis der Zucker β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₃ und β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₂N-Acetylneuraminsäure durch Wheat Germ Agglutinin.

3.4.2.2 Von Sporangien

Eine Markierung von α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin mit Concanavalin A zeigte eine zweifache Begrenzungsschicht um die Sporangien (Bild 14a). Nach 24-stündiger Inkubation der Sporangien bei 18°C entwickelte sich ein Keimschlauch, der zuerst nur an der Ansatzstelle am Sporangium eine Markierung mit Hilfe von Concanavalin A zeigte (Bild 14b), die sich im Laufe der weiteren Entwicklung über den gesamten Keimschlauch erstreckte.

Erfolgte die Keimung der Sporangien in Anwesenheit von 'Iprovalicarb' (0,6 ppm a.i.), so wurde häufig die Akkumulation des Fluorochrom-markierten Lectins im Inneren der kurzen Keimschläuche beobachtet. Diese war auf eine partielle Lyse der Keimschlauchzellwand zurückzuführen (Bild 14c und d).

Auch der Nachweis von β -D-Galaktose und α -D-Galaktose mit dem Agglutinin RCA₁₂₀ in den Sporangienzellwänden des Pathogens 24 Stunden nach der Keimung zeigte eine zweischichtige Umrandung des Sporangiums, die somit nicht nur aus α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin bestand (Bild 15a). Mit der Ausbildung eines Keimschlauches wurde die Fluoreszenz um das Sporangium schwächer (Bild 15b). In der Zellwand des Keimschlauches ließ sich nur sehr wenig β -D-Galaktose und α -D-Galaktose nachweisen. Entwickelte sich an der Spitze des Keimschlauches ein neues Sporangium, so wurde dieses durch das Agglutinin RCA₁₂₀ wieder sehr stark markiert.

Erfolgte die Keimung des Pathogens in Anwesenheit von 'Iprovalicarb' (1 ppm a.i.), so bildeten nur 20 % der Sporangien einen Keimschlauch, der im unteren Bereich durch das Lectin markiert wurde (Bild 15c). Dieser Keimschlauch war wesentlich kürzer und wies Deformationen auf, im Gegensatz zu denjenigen, die sich in Anwesenheit von Leitungswasser entwickelt hatten. Anstelle eines Keimschlauches bildeten 40 % der Sporangien eine kugelförmige Struktur direkt am Sporangium aus, die mit Hilfe von Agglutinin RCA₁₂₀ markiert wurde (Bild 15d).

Die Monosaccharide β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₃ und β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₂ N-Acetylneuraminsäure ließen sich mit Hilfe von Wheat Germ Agglutinin nicht in den Zellwänden von gekeimten Sporangien nachweisen, die sich in 'Iprovalicarb'-freiem oder -haltigem Kulturmedium entwickelt hatten.

3.4.2.3 Von Myzel

Weiterhin wurden die Zellwände von Myzel von *Phytophthora infestans* auf das Vorkommen der Zucker α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin mit Hilfe von Concanavalin A untersucht. Die durch Concanavalin A markierbaren Zucker ließen sich in allen Zellwänden der 50 Hyphenabschnitte von *Phytophthora infestans* als geschlossene Schicht um das Hyphenlumen nachweisen. Auch in neugebildeten Hyphenspitzen war eine Markierung dieser Zucker möglich (Bild 16a und b). Eine deutlich fluoreszierende Schicht umhüllte das Myzel.

Entwickelte sich das Myzel des Pathogens auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar, so wurde eine Veränderung hinsichtlich der Zellwandmarkierung mit Concanavalin A beobachtet. Myzel, das aufgrund der 'Iprovalicarb'-Behandlung ein perlschnurartiges Aussehen besaß, zeigte keine geschlossene, homogen fluoreszierende Lumenbegrenzung, sondern nur eine sehr schwache Anlagerung des Lectins (Bild 16c und d). Weiterhin wurde bei fast allen untersuchten Hyphenabschnitten im Hyphenlumen fluoreszierendes Material nachgewiesen. Auch neugebildete Myzelspitzen zeigten im Hyphenlumen eine deutliche Akkumulation des mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelten Lectins (Bild 16e und f). Die an mehr als 60 % der Hyphenabschnitte durch 'Iprovalicarb' hervorgerufene Zellwandlyse könnte für das Eindringen des Fluorochroms in das Hyphenlumen verantwortlich sein.

In den Zellwänden von Myzel von *Phytophthora infestans* ließen sich mit Hilfe von Agglutinin RCA₁₂₀ keine β -D-Galaktose und α -D-Galaktose nachweisen. Eine Markierung dieser Monosaccharide mit dem Lectin war in den Zellwänden von Hyphen ebenfalls nicht möglich, unabhängig davon ob sie sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem oder -freiem Agar entwickelt hatten.

Auch β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₃ und β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₂N-Acetylneuraminsäure wurden mit Hilfe von Wheat Germ Agglutinin nicht in den Zellwänden von Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem oder -freiem Agar entwickelt hatten, nachgewiesen.

3.4.3 Einfluß auf Polysaccharide in der pilzlichen Zellwand

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 'Iprovalicarb' einen Einfluß auf die Nachweisbarkeit von α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin in den Zellwänden von Keimschläuchen und Hyphen besaß, wurde auch untersucht, inwieweit eine Wirkung auf die Polysaccharide in der Zellwand vorlag. Zur Sichtbarmachung der Polysaccharide wurde Kongorot verwendet, das unter anderem an Cellulose bindet. Darüber hinaus markiert Kongorot auch Amyloide, die Polysaccharide enthalten. Die Untersuchungen wurden an 50 gekeimten

Zoosporen sowie 50 Hyphenabschnitten von 12 Tage altem Myzel der unbehandelten und Fungizid-behandelten Variante durchgeführt.

3.4.3.1 Von Zoosporen und Keimschläuchen

Encystierte Zoosporen und deren Keimschläuche, die sich in Leitungswasser entwickelt hatten, zeigten unabhängig von ihrem Entwicklungsstadium eine homogene Anlagerung von Kongorot (Bild 17a und b). Auch das Septum, das sich in längeren Keimschläuchen im oberen Drittel des Keimschlauches befindet, lagerte den Farbstoff an (Bild 17c und d).

‘Iprovalicarb‘ hatte einen Einfluß auf die Anfärbbarkeit der Polysaccharide in der Zellwandregion des Keimschlauches. Bei 70 % der untersuchten gekeimten Zoosporen wurde eine Unterbrechung in der Anlagerung des Farbstoffes an einigen Stellen im Bereich der Zellwand beobachtet (Bild 18a und b). Die Akkumulation des Fluorochroms im Zoosporen- und Keimschlauchinneren aufgrund partieller Lyse der Keimschlauchzellwand wurde bei 90 % der gekeimten Zoosporen unter Wirkstoffeinfluß beobachtet (Bild 18c und d).

3.4.3.2 Von Myzel

Alle Hyphen, die sich auf Wirkstoff-freiem Medium entwickelten, lagerten Kongorot in einer homogenen, dünnen Schicht um das Hyphenlumen an (Bild 19a und b). Die Färbung der Hyphenzellwand erschien homogen um die ganze Hyphe. Auch in neugebildetem Myzel lagerte sich der Farbstoff als geschlossene Hülle um die Hyphenspitzen. In den Randbereichen der Hyphe erkannte man deutlich eine verstärkte Fluoreszenz, die darauf zurückzuführen war, dass in diesem Bereich mehrere fluoreszierende Schichten übereinanderlagen.

Entwickelten sich die Hyphen auf ‘Iprovalicarb‘-haltigem Agar, änderte sich die Anfärbbarkeit der Hyphenzellwände. Die Anlagerung des Farbstoffes erfolgte bei 60 % der Hyphen nicht mehr in einer gleichmäßigen Schicht, sondern wurde an einigen Stellen im Bereich der Zellwand unterbrochen (Bild 19c und d). Weiterhin wurde beobachtet, dass der Farbstoff an Hyphenspitzen, die eine deutliche Auflösung der Zellwand zeigten, in das Hyphenlumen eindrang und dort Strukturen anfärbte (Bild 19e und f).

3.4.4 Einfluß auf den Cellulose-Gehalt in der pilzlichen Zellwand

Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass ‘Iprovalicarb‘ einen Einfluß auf die Anfärbbarkeit der Polysaccharide in den pilzlichen Zellwänden hatte. Der Polysaccharidgehalt in den Zellwänden von Oomyceten besteht zu einem großen Teil aus Cellulose. Um eine quantitative Aussage hinsichtlich des Cellulosegehalts in der Hyphenzellwand machen zu

können, wurde eine Enzymgold-Markierungsmethode angewandt. Dafür wurde eine Cellulase an Goldpartikel konjugiert. Bei dieser Cellulase handelte es sich um eine 1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glukan-4-Glukano-Hydrolase, die an das Ende einer Cellulose-Glukan-Kette bindet. Die Anzahl der Goldpartikel wurde an jeweils 60 verschiedenen Zellwandbereichen quantitativ erfaßt.

Die Zellwände von Hyphen, die sich auf Fungizid-freiem Agar entwickelten, wiesen eine deutliche Goldmarkierung der Cellulose auf (Bild 20a). Hyphen, die auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar gewachsen waren, zeigten eine höhere Markierungsdichte für Cellulose (Tab. 10; Bild 20b). Im Mittel war die spezifische Markierungsdichte für Cellulose in den Zellwänden von Hyphen, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' entwickelt hatten, um 18 % höher im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle. Besonders auffällig war die Akkumulation der Goldpartikel in einigen Zellwandbereichen. An diesen Hyphenquerschnitten wurden zusätzlich Ausstülpungen der äußeren Zellwandschicht beobachtet, von denen sich Vesikel abtrennten. Im Gegensatz dazu lagerten sich die Goldpartikel der unbehandelten Variante regelmäßiger an die Zellwand an, die eine deutliche, plane Abschlußschicht aufgelagert hatte. Eine Akkumulation der Goldpartikel trat nicht in dem Maße wie in der 'Iprovalicarb'-Variante auf. Beide Spezifitätskontrollen zeigten keine Markierung der Cellulose in den Zellwänden durch Goldpartikel.

Weiterhin wurde ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Zellwanddicke zwischen den Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem oder -freiem Agar entwickelt hatten, ermittelt. Die Zellwände der Hyphen, die in Gegenwart von 'Iprovalicarb' gewachsen waren, waren bis zu 60 % dicker als die der unbehandelten Variante.

Aufgrund der deutlich dickeren Zellwände der Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten, war die Markierungsdichte für Cellulose über die Gesamtfläche der Zellwand höher im Vergleich zu der unbehandelten Variante.

Tab. 10: Markierungsdichte für Cellulose in den Zellwänden und relative Zellwanddicke von 12 Tage alten Hyphen von *Phytophthora infestans*, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem oder freiem Agar entwickelt hatten (die Anzahl der Goldpartikel und die relative Zellwandbreite wurden an 60 Zellwandbereichen von mehreren Hyphenquerschnitten gemessen; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Mann-Whitney Rank Sum Test $p \leq 0,05$ (Goldpartikel) und nach t-Test $p \leq 0,05$ (relative Zellwanddicke)).

Variante	Goldpartikel/cm ² Zellwand [%]	relative Zellwanddicke [%]
unbehandelt	100 b	100 b
'Iprovalicarb' 0,3 ppm a.i.	118 a	160 a

3.4.5 Veränderungen von Cytoskelettkomponenten

Das Cytoskelett ist ein komplexes Geflecht aus Proteinfilamenten, das sich durch das gesamte Cytoplasma hindurch erstreckt. Seine Hauptbestandteile sind Actin und Tubulin, die an verschiedenen Vorgängen in der Zelle beteiligt sind. Die Actinfilamente spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Cytoplasmaströmung und Signaltransduktion, während man den Mikrotubuli eine bedeutende Rolle bei der Ausrichtung der Cellulose-Mikrofibrillen in der pflanzlichen Zellwand zuschreibt. Die beiden Cytoskelettelemente wurden an jeweils 50 Hyphenabschnitten von 12 Tage altem Myzel der unbehandelten und Fungizid-behandelten Variante untersucht.

3.4.5.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli werden aus Tubulin-Untereinheiten zusammgebaut. Durch den Einbau Tetramethylrhodamin-markierten Tubulins ist eine Sichtbarmachung dieser Strukturen möglich. In Myzel von *Phytophthora infestans* wiesen die Mikrotubuli zwei verschiedene Strukturen auf. In Hyphen wurde das Auftreten sowohl globulärer als auch filamentöser Mikrotubuli beobachtet, dabei bildeten die filamentösen zwischen den globulären ein Maschenwerk aus (Bild 21a-d).

Eine 'Iprovalicarb'-Behandlung bewirkte Veränderungen in der Struktur und Anordnung der Mikrotubuli. Entwickelte sich *Phytophthora infestans* auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar, so wurde in 90 % der bonitierten Hyphenabschnitte überwiegend das Auftreten von dickeren, längeren Mikrotubuli-Filamenten beobachtet (Bild 22a-b). Globuläre Strukturen wie in unbehandelten Hyphen waren nicht mehr sichtbar. Stattdessen fluoreszierten im Hyphenlumen groß

flächigere Plaques, die durch die dickeren, filamentösen Mikrotubuli in Verbindung standen (Bild 22c-d).

3.4.5.2 Actin

Die Actinelemente des Cytoskeletts wurden mit Hilfe von Fluorochrom-markiertem Phalloidin angefärbt, das vor allem an polymerisiertes Actin bindet, so dass im Cytoskelett integriertes Actin deutlich fluoreszierte, während depolymerisiertes, frei im Cytoplasma vorliegendes Actin nicht markiert wurde.

Die Actinelemente lagen in den Hyphen sowohl als globuläre als auch als filamentöse Formen vor (Bild 23a). Die filamentösen stellten zwischen den globulären Strukturen eine Verbindung her (Bild 23b).

Es traten Unterschiede in der Struktur und in der Anfärbbarkeit des Actin-Cytoskeletts zwischen Hyphen, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' und denen, die sich auf Fungizid-freiem Nährmedium entwickelt hatten, auf. Bei 60 % der untersuchten Hyphenabschnitte wurde beobachtet, dass die globulären Strukturen des Actins durch kurze, linienförmige ersetzt wurden (Bild 23c-d). Eine Verbindung dieser Elemente durch filamentöse wurde nicht beobachtet. Weiterhin ließ sich das Actin-Cytoskelett in Hyphen, die aufgrund der 'Iprovalicarb'-Behandlung ein perlschnurartiges Aussehen zeigten, nicht durch Fluorochrom-markiertes Phalloidin markieren (Bild 23e und f). In diesem Bereich konnten weder globuläre noch filamentöse Strukturen des Actins nachgewiesen werden.

3.4.6 Einfluß auf die Mitochondrienvitalität

In Zoosporen, die in Leitungswasser keimten, waren zahlreiche Mitochondrien vorhanden. Ihre Gestalt war rund oder linienförmig (Bild 24a-b). Im unteren, stoffwechselaktiveren Bereich des Keimschlauches waren vor allem die linienförmigen Mitochondrien sehr zahlreich vertreten. Es wurden jeweils 50 gekeimte Zoosporen und 50 Hyphenabschnitte der unbehandelten und der 'Iprovalicarb'-behandelten Variante ausgewertet.

Unterschiede in der Größe und der Struktur der Mitochondrien waren durch eine Fungizidbehandlung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nicht zu beobachten (Bild 24c und d).

In Hyphen wiesen die Mitochondrien eine runde Form auf. Wie bei den gekeimten Zoosporen war auch in diesem Entwicklungsstadium kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl, Größe und Struktur der Mitochondrien bei Myzel, das sich auf Fungizid-freiem Agar entwickelt hatte, im Vergleich zu Myzel der unbehandelten Kontrolle zu beobachten.

3.5 Vergleichende Untersuchungen zur Wirksamkeit ausgewählter Fungizide gegenüber *Phytophthora infestans in vitro*

Die Wirkung von 'Iprovalicarb' in *in vitro*-Untersuchungen wurde mit der von anderen Fungiziden verglichen. Als Vergleichswirkstoffe dienten 'Azoxystrobin', 'Propamocarb', 'Metalaxyl' und 'Dimethomorph' aus den chemischen Stoffklassen der Strobilurine, Carbamate, Phenylamide und Zimtsäurederivate. Der Einfluß dieser Fungizide auf die Zoosporenkeimung und das radiale Myzelwachstum wurden untersucht und mit den Ergebnissen von 'Iprovalicarb' verglichen. Pro Variante wurden viermal 50 gekeimte Zoosporen bewertet.

3.5.1 Frühe Entwicklungsstadien

Die Wirkung verschiedener Fungizide auf die Keimung von enzystierten Zoosporen eines Ein-Zoospor-Isolats von *Phytophthora infestans* war unterschiedlich (Tab. 11).

'Propamocarb' hemmte auch bei hohen Konzentrationen die Zoosporenkeimung von *Phytophthora infestans* nur geringfügig. Der Wirkstoff 'Azoxystrobin' verhinderte ab einer Konzentration von 0,2 ppm a.i. die Keimung der Zoosporen. 'Metalaxyl' reduzierte die Keimung der Zoosporen erst bei einer Konzentration von 50 ppm a.i. um 50 %. 'Dimethomorph' wirkte bei einer niedrigen Konzentration von 0,3 ppm a.i. stark keimungshemmend, während 'Iprovalicarb' die Zoosporenkeimung von *Phytophthora infestans* bei 0,4 ppm a.i. vollständig hemmte.

Tab. 11: Wirkung verschiedener Fungizide auf die Zoosporenkeimung von *Phytophthora infestans* (Auswertung 3,5 Stunden nach der Keimung; n = 4 x 50 Zoosporen; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb eines Fungizids nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$; n.g. = nicht getestet).

Wirkstoffkonzentration [ppm] a.i.	Gekeimte Zoosporen [%]				
	'Propamocarb'	'Azoxystrobin'	'Metalaxyl'	'Dimethomorph'	'Iprovalicarb'
0,01	100 a	50 a	100 a	100 a	100 a
0,1	100 a	10 b	100 a	71 a	97 a
0,2	100 a	0 c	100 a	17 b	85 b
0,3	100 a	n.g.	100 a	0 c	20 c
0,4	100 a	n.g.	100 a	n.g.	0 d
0,5	100 a	n.g.	100 a	n.g.	n.g.
1,0	100 a	n.g.	98 a	n.g.	n.g.
10,0	84 a	n.g.	95 a	n.g.	n.g.
50,0	85 a	n.g.	41 b	n.g.	n.g.
100,0	82 a	n.g.	52 b	n.g.	n.g.
200,0	n.g.	n.g.	36 b	n.g.	n.g.

'Propamocarb' zeigte keinen Einfluß auf die Länge der Keimschläuche. Sogar bei sehr hohen Konzentrationen von 100 ppm a.i. hatten die Keimschläuche dieselbe Länge wie in der unbehandelten Kontrolle (Tab. 12). Im Vergleich dazu hatte 'Azoxystrobin' einen Einfluß auf das Keimschlauchlängenwachstum. Bei einer Konzentration von 0,01 ppm a.i. waren die Keimschläuche im Gegensatz zur Kontrolle um 40 % kürzer. Die Wirkung von 'Metalaxyl' auf die Keimschlauchlänge ist vernachlässigbar gering. Bei der höchsten getesteten Konzentration bildeten die gekeimten Zoosporen Keimschläuche aus, deren Länge 90 % der Kontrolle entsprach. Die Wirkung von 'Dimethomorph' auf das Keimschlauchwachstum war nicht so deutlich wie die keimungshemmende Wirkung. Die wenigen in Gegenwart von 'Dimethomorph' gekeimten Zoosporen bildeten Keimschläuche aus, deren Länge 70 % der Kontrolle entsprach. Zoosporen, die sich in Anwesenheit von 'Iprovalicarb' (0,3 ppm a.i.) entwickelt hatten, besaßen einen Keimschlauch, dessen Länge 20 % der Kontrolle entsprach.

Tab. 12: Wirkung verschiedener Fungizide auf das Keimschlauchlängenwachstum von *Phytophthora infestans* (Auswertung 3,5 Stunden nach der Keimung; n = 4 x 50 Zoosporen; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb eines Fungizids nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$; n.g. = nicht getestet).

Wirkstoffkonzentration [ppm] a.i.	Keimschlauchlänge [%]				
	'Propamocarb'	'Azoxystrobin'	'Metalaxyl'	'Dimethomorph'	'Iprovalicarb'
0,01	100	60 a	104 a	100 a	100 a
0,1	100	20 b	105 a	85 a	103 a
0,2	100	0 c	100 a	71 b	86 b
0,3	98	n.g.	110 a	0 c	20 c
0,4	98	n.g.	100 a	n.g.	0 d
0,5	100	n.g.	98 a	n.g.	n.g.
1,0	96	n.g.	95 a	n.g.	n.g.
10,0	102	n.g.	91 a	n.g.	n.g.
50,0	100	n.g.	86 b	n.g.	n.g.
100,0	100	n.g.	87 b	n.g.	n.g.
200,0	n.g.	n.g.	90 a	n.g.	n.g.

3.5.2 Entwicklung von Myzel

Der Einfluß verschiedener Fungizide auf das radiale Myzelwachstum von *Phytophthora infestans* nach 12-tägigem Wachstum auf Fungizid-freiem oder -haltigem Agar wurde untersucht (Tab. 13).

'Propamocarb' reduzierte das radiale Myzelwachstum um 50 % erst bei einer Konzentration von 10 ppm a.i.. 'Metalaxyl' hemmte bei 10 ppm a.i. das Wachstum des Pathogens um mehr als 60 %. 'Azoxystrobin' und 'Dimethomorph' bewirkten eine vollständige Hemmung des Myzelwachstums bei 1,0 ppm a.i.. 'Iprovalicarb' unterdrückte bei einer Konzentration von 0,4 ppm a.i. die radiale Ausbreitung des Pilzes auf der Platte vollständig.

Tab. 13: Wirkung verschiedener Fungizide auf das radiale Myzelwachstum von *Phytophthora infestans* (Auswertung 12 Tage nach der Überimpfung; n = 7; verschiedene Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede innerhalb eines Fungizids nach Student-Newman-Keuls bei $p \leq 0,05$; n.g. = nicht getestet).

Wirkstoffkonzentration [ppm] a.i.	Radiales Myzelwachstum [%]				
	'Propamocarb'	'Azoxystrobin'	'Metalaxyl'	'Dimethomorph'	'Iprovalicarb'
0,01	100 a	93 a	100 a	100 a	100 a
0,05	100 a	90 a	100 a	99 a	98 a
0,1	100 a	52 b	99 a	97 b	91 b
0,2	100 a	45 b	99 a	57 c	59 c
0,3	100 a	30 bc	100 a	27 d	9 d
0,4	100 a	20 c	98 a	12 e	0 e
0,5	100 a	9 d	96 a	12 e	n.g.
1,0	85 b	0 d	96 a	0 f	n.g.
5,0	58 c	n.g.	77 b	n.g.	n.g.
10,0	50 d	n.g.	35 c	n.g.	n.g.
50,0	38 e	n.g.	14 d	n.g.	n.g.
100,0	40 e	n.g.	8 e	n.g.	n.g.
1000,0	15 f	n.g.	0 e	n.g.	n.g.

3.5.3 Vergleich der Wirkungsmechanismen von 'Iprovalicarb' und 'Dimethomorph'

Zur genaueren Charakterisierung der Wirkung von 'Dimethomorph' und 'Iprovalicarb' wurden sowohl die morphologischen als auch die strukturellen Veränderungen, die durch das jeweilige Fungizid hervorgerufen wurden, mikroskopisch untersucht. Die Untersuchungen wurden an 50 Hyphenabschnitten von Myzel bzw. 20 Hyphenquerschnitten von *Phytophthora infestans* durchgeführt, das 12 Tage auf Fungizid-freiem oder -haltigem Agar gewachsen war.

3.5.3.1 Morphologische Veränderungen an Myzel von *Phytophthora infestans*

Myzel von *Phytophthora infestans*, das auf 'Dimethomorph'-haltigem Gemüsesaftagar gewachsen war, zeigte ähnliche morphologische Veränderungen wie Myzel, das sich auf 'Ipro

valicarb'-haltigem Agar entwickelt hatte. Beide Wirkstoffe bewirkten eine partielle Einschnürung der Hyphen, die dadurch ein perlschnurartiges Aussehen erhielten (Bild 25b und c). Diese wurde sowohl bei 'Iprovalicarb' als auch bei 'Dimethomorph' zusätzlich an den Hyphenspitzen beobachtet (Bild 25d). Weiterhin bewirkte 'Dimethomorph' wie 'Iprovalicarb' ein Auflösen der Hyphenwände, wodurch Cytoplasma aus dem Hyphenlumen austrat.

In einer Zeitreihe wurde der Einfluß von 'Dimethomorph' auf die Entwicklung des Myzels von *Phytophthora infestans* untersucht. Es zeigte sich, dass 24 Stunden nach Zugabe einer letalen 'Dimethomorph'-Konzentration von 1 ppm a.i. häufig eine Lyse von Hyphenspitzen auftrat (Bild 26a). Wurde die 'Dimethomorph'-Konzentration auf 10 ppm a.i. erhöht, so traten die Auflösungserscheinungen der Hyphenwände schon nach fünf Stunden auf (Bild 26b und c). Bei dieser Wirkstoffkonzentration wurden sehr häufig untypische Wachstumsanomalien, wie z.B. Ausbildung von kugeligen Strukturen (Bild 26d), vornehmlich an Hyphenspitzen beobachtet, die auch nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung auftraten.

3.5.3.2 Strukturelle Veränderungen an Myzel von *Phytophthora infestans*

Sowohl 'Iprovalicarb' als auch 'Dimethomorph' bewirkten ähnliche morphologische Veränderungen an Myzel von *Phytophthora infestans*. Da gezeigt werden konnte, dass 'Iprovalicarb' verändernd in die Zuckerzusammensetzung der pilzlichen Zellwand und in die Anordnung des Cytoskeletts eingreift, wurden diese Strukturen auch an Myzel untersucht, das sich auf 'Dimethomorph'-haltigem Agar entwickelt hatte.

Monosaccharide

Die Anlagerung von Concanavalin A, das mit abnehmender Spezifität an α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin bindet, in den Zellwänden von *Phytophthora infestans* wurde nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung verändert. Während das Fluorochrommarkierte Lectin Concanavalin A bei unbehandeltem Myzel eine geschlossene Schicht um das Hyphenlumen bildete, war diese bei Myzel, das sich auf einer subletalen 'Iprovalicarb'-Konzentration entwickelt hatte, unterbrochen. Dies wurde bei Myzel, das sich auf 'Dimethomorph'-haltigem Agar entwickelte, nicht beobachtet. Das Lectin lagerte sich gleichmäßig an alle untersuchten Hyphenabschnitte und bildete eine geschlossene Schicht um das Lumen (Bild 27a und b). Diese homogene Anlagerung des Lectins wurde sowohl an Hyphen als auch an Hyphenspitzen beobachtet (Bild 27c und d). Häufig sammelte sich im Hyphenlumen von Myzel, das sich auf 'Dimethomorph'-haltigem Agar ausgebildet hatte, das Fluorochrommarkierte Lectin an. Die Akkumulation des Farbstoffes war wie bei 'Iprovalicarb'-behandeltem Myzel auf eine partielle Auflösung der Hyphenzellwände zurückzuführen, die damit dem Farbstoff den Eintritt in das Hypheninnere ermöglichte.

Polysaccharide

Weiterhin wurde die Anordnung von Polysacchariden in der pilzlichen Zellwand nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung mit der nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung verglichen. Mit Hilfe von Kongorot ließen sich die Polysaccharide in der Zellwand von unbehandeltem Myzel als geschlossene Hülle nachweisen. Eine 'Iprovalicarb'-Behandlung führte zu Unterbrechungen in der homogenen Anlagerung des Zuckers. Eine 'Dimethomorph'-Behandlung wirkte sich jedoch nicht verändernd auf die Anlagerung des Farbstoffes um die Hyphen aus (Bild 28a und b). Auch um neugebildete Hyphenspitzen lagerte sich eine fluoreszierende Schicht ohne Unterbrechungen an (Bild 28c und d).

Cellulose

Anhand einer Enzymgold-Markierung wurde in den Zellwänden von Hyphen Cellulose nachgewiesen. Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten, lagerten ca. 20 % mehr Goldpartikel pro Quadratzentimeter Zellwandfläche an im Vergleich zur unbehandelten Variante (Bild 29a und b).

Tab. 14: Markierungsdichte für Cellulose in den Zellwänden und relative Zellwanddicke von 12 Tage alten Hyphen von *Phytophthora infestans*, die sich auf Fungizid-haltigem- oder freiem Agar entwickelt hatten (die Anzahl der Goldpartikel und die relative Zellwandbreite wurde an vier verschiedenen Zellwandbereichen an 20 Hyphenquerschnitten gemessen; unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen Signifikanz nach Dunn's bei $p \leq 0,05$ (Goldpartikel) und nach Tukey bei $p \leq 0,05$ (relative Zellwanddicke)).

Variante	Goldpartikel/cm ² Zellwand	relative Zellwanddicke
	[%]	[%]
unbehandelt	100 b	100 b
'Iprovalicarb' (0,3 ppm a.i.)	118 a	160 a
'Dimethomorph' (0,5 ppm a.i.)	106 a	176 a

Nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung entsprach die Markierungsdichte für Cellulose der in unbehandeltem Myzel (Tab. 14; Bild 29c). Eine Akkumulation von Goldpartikeln in einigen Zellwandbereichen und Ausstülpungen der äußeren Zellwandschicht, die nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung beobachtet wurden, traten nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung nicht auf.

Weiterhin wurde die Zellwandbreite der Hyphen ermittelt. Während nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung die Zellwandbreite um 60 % zunahm, wurde bei Hyphen, die sich in Gegenwart von 'Dimethomorph' entwickelt hatten, eine Zunahme der Zellwandbreite um ca. 80 % ermittelt. Aufgrund der deutlich dickeren Zellwände der Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem oder 'Dimethomorph'-haltigem Agar entwickelt hatten, war die absolute Markierungsdichte für Cellulose über die Gesamtfläche der Zellwand höher im Vergleich zu der der unbehandelten Variante.

Mikrotubuli

Mit Hilfe von Tetramethylrhodamin-markiertem Tubulin konnte gezeigt werden, dass 'Iprovalicarb' die Struktur und Anordnung der Mikrotubuli im Cytoskelett beeinflusste. Die Ausbildung von globulären Strukturen der Mikrotubuli wurde durch 'Iprovalicarb' vollständig aufgehoben und durch dickere, filamentöse Strukturen ersetzt. 'Dimethomorph' zeigte keinen Einfluß auf diese Cytoskelettelemente. Weder die globulären noch die filamentösen Strukturen, die die globulären untereinander verbanden, veränderten ihre Form oder wurden durch andere ersetzt (Bild 30a-d).

Actin

Wie auch die Mikrotubuli veränderte sich nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung die Struktur und Anordnung der Actinelemente. Filamentöse Actin-Strukturen wurden in Gegenwart von 'Iprovalicarb' nicht ausgebildet. Das Auftreten globulärer Actinelemente wurde nicht mehr beobachtet, stattdessen entwickelten sich kurze, linienförmige Strukturen. 'Dimethomorph' zeigte keinen Einfluß auf die Struktur und Anordnung des Actins. Wie in Hyphen der unbehandelten Kontrolle ließen sich globuläre Strukturen, die durch filamentöse miteinander verbunden waren, markieren.

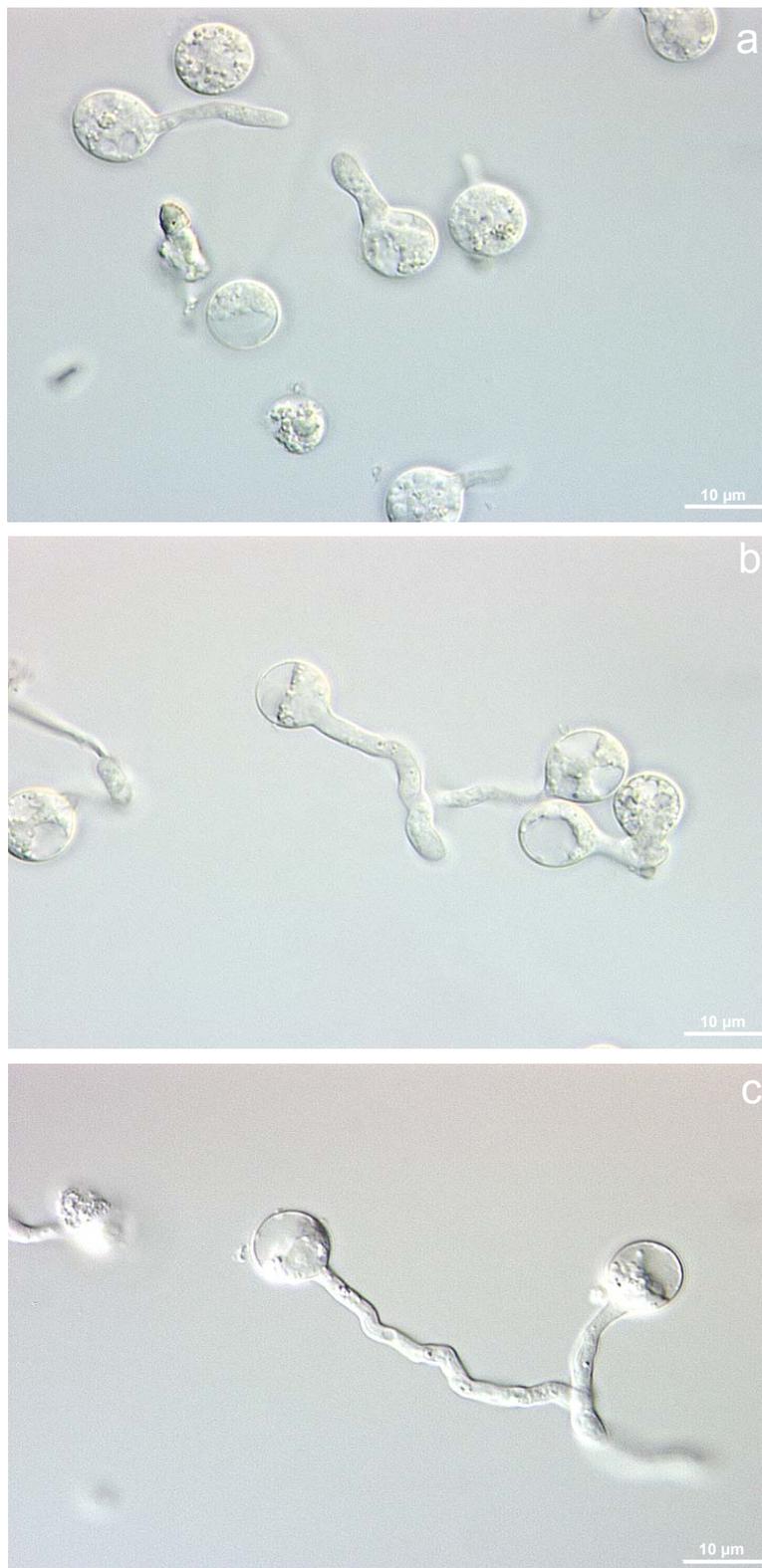


Bild 3: Durchschnittliche Keimschlauchlänge von Zoosporen von *Phytophthora infestans* nach unterschiedlichen Entwicklungszeiten in Leitungswasser:

- a 13 µm nach 45 Minuten
- b 30 µm nach 1 ½ Stunden
- c 43 µm nach 2 ¼ Stunden

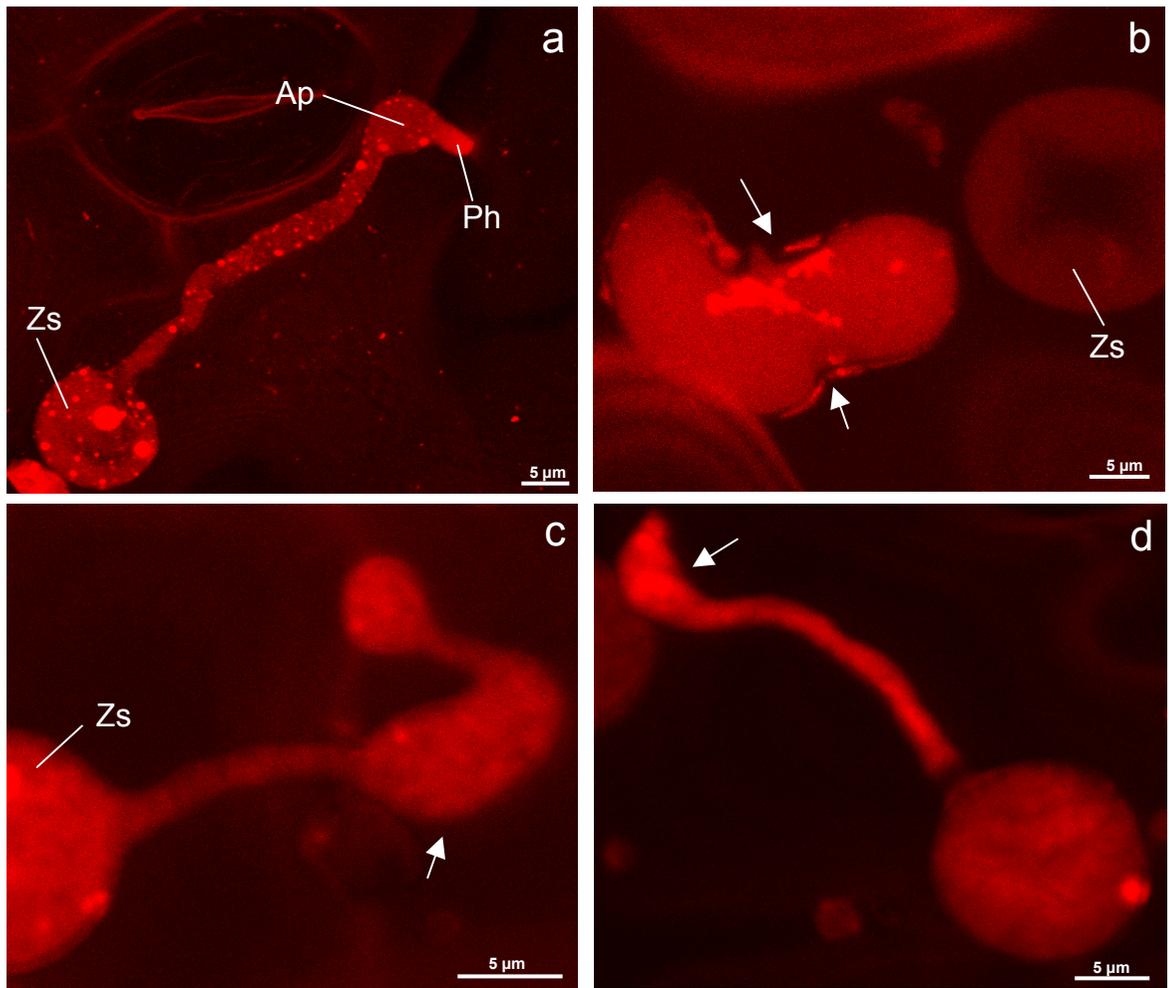


Bild 4: Frühe Entwicklungsstadien von *Phytophthora infestans* auf der Oberfläche von Tomatenblättern vier Stunden nach der Inokulation (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen; Säurefuchsinfärbung):

- a Gekeimte Zoospore (Zs) auf einem unbehandelten Tomatenblatt, die einen Keimschlauch von ca. 50 µm mit einem Appressorium (Ap) und einer kurzen Penetrationshyphe (Ph) gebildet hatte.
- b Partielle Auflösung der Zellwand (Pfeile) eines Keimschlauches, der sich auf einem 'Iprovalicarb'-behandelten Tomatenblatt (5 ppm a.i.) entwickelt hatte.
- c Partielle Verdickung des Keimschlauches (Pfeil), der sich auf einem 'Iprovalicarb'-behandelten Tomatenblatt (5 ppm a.i.) entwickelt hatte.
- d Deformiertes Appressorium (Pfeil), das sich auf einem 'Iprovalicarb'-behandelten Tomatenblatt (5 ppm a.i.) entwickelt hatte.

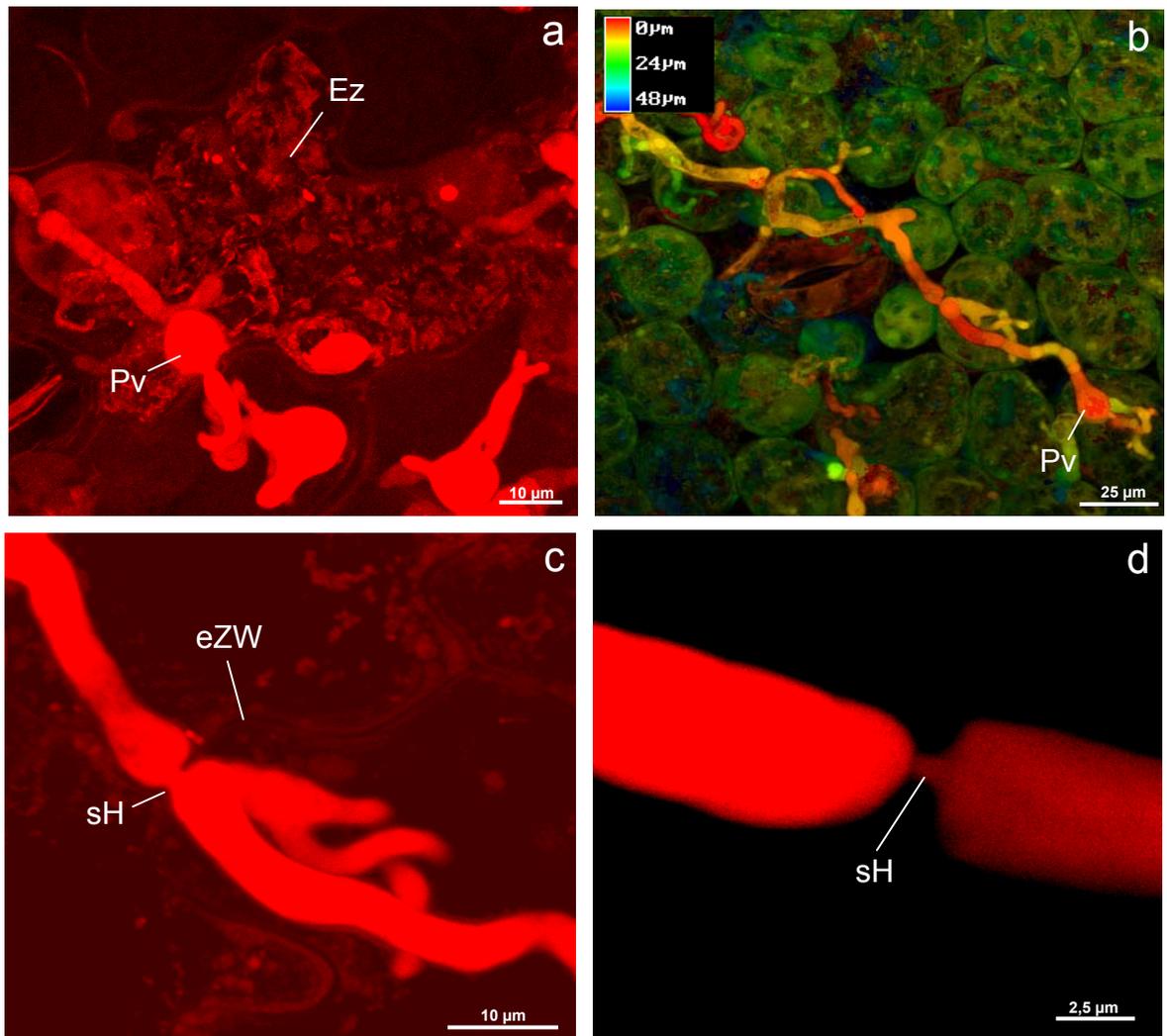


Bild 5: Entwicklung von *Phytophthora infestans* in der Epidermis bis 24 Stunden nach der Inokulation in einem unbehandelten Tomatenblatt (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen; Bild **b** zeigt eine topographische Darstellung, in der die Farben die räumliche Lage der Strukturen festlegen; Säurefuchsinfärbung):

- a** Eindringen in die Epidermiszelle (Ez) und Bildung eines Primärvesikels (Pv), sowie Weiterwachstum in tiefere Gewebeschichten.
- b** Horizontale Ausbreitung des Pathogens in der Epidermis.
- c, d** Schmale Hypha (sH) penetriert epidermale Zellwand (eZW).

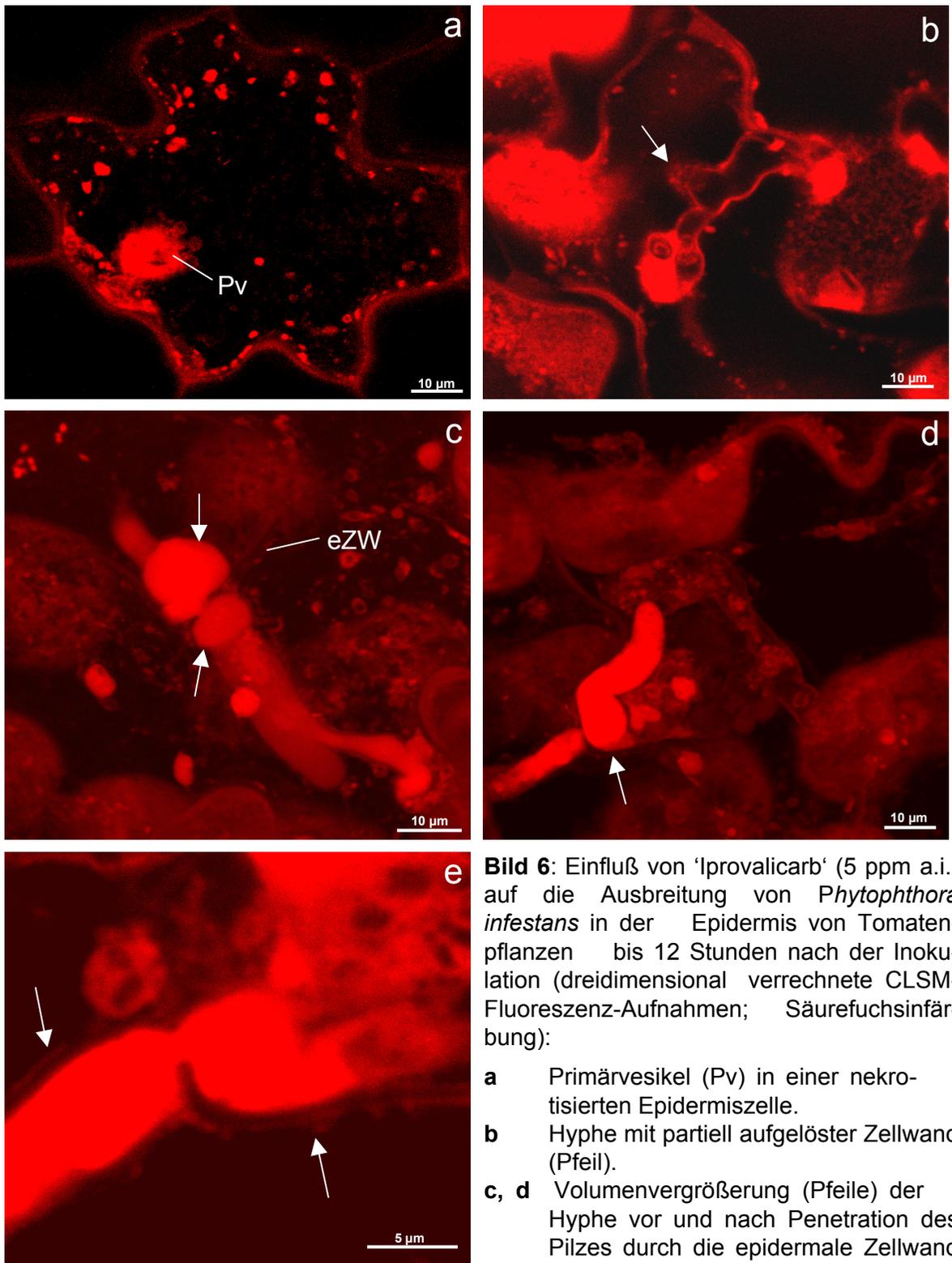


Bild 6: Einfluß von 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.) auf die Ausbreitung von *Phytophthora infestans* in der Epidermis von Tomatenpflanzen bis 12 Stunden nach der Inokulation (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen; Säurefuchsinfärbung):

- a** Primärvesikel (Pv) in einer nekrotisierten Epidermiszelle.
- b** Hyphe mit partiell aufgelöster Zellwand (Pfeil).
- c, d** Volumenvergrößerung (Pfeile) der Hyphe vor und nach Penetration des Pilzes durch die epidermale Zellwand (eZW).
- e** Anlagerung einer partiell unterbrochenen Schicht um die Hyphe (Pfeile).

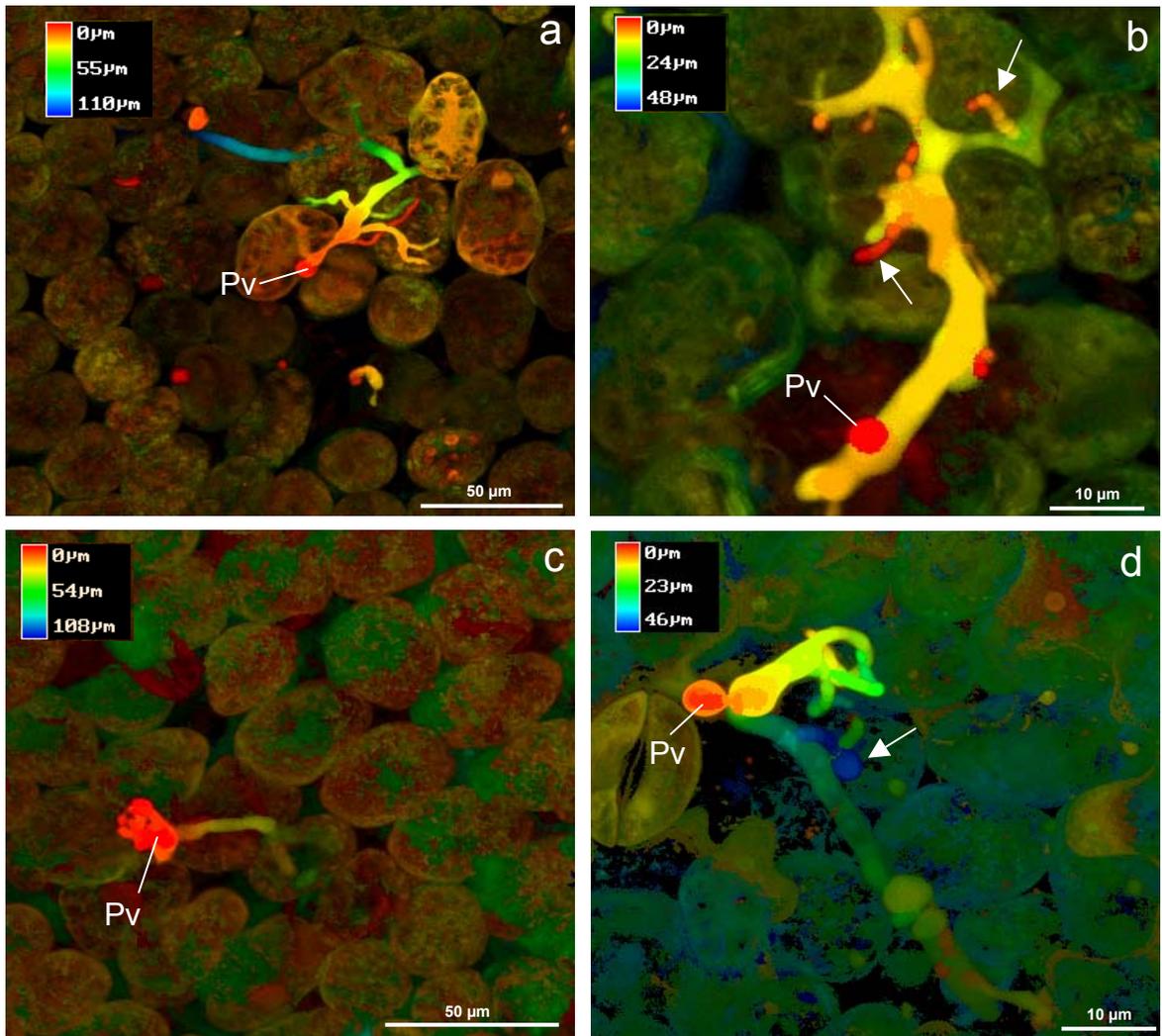
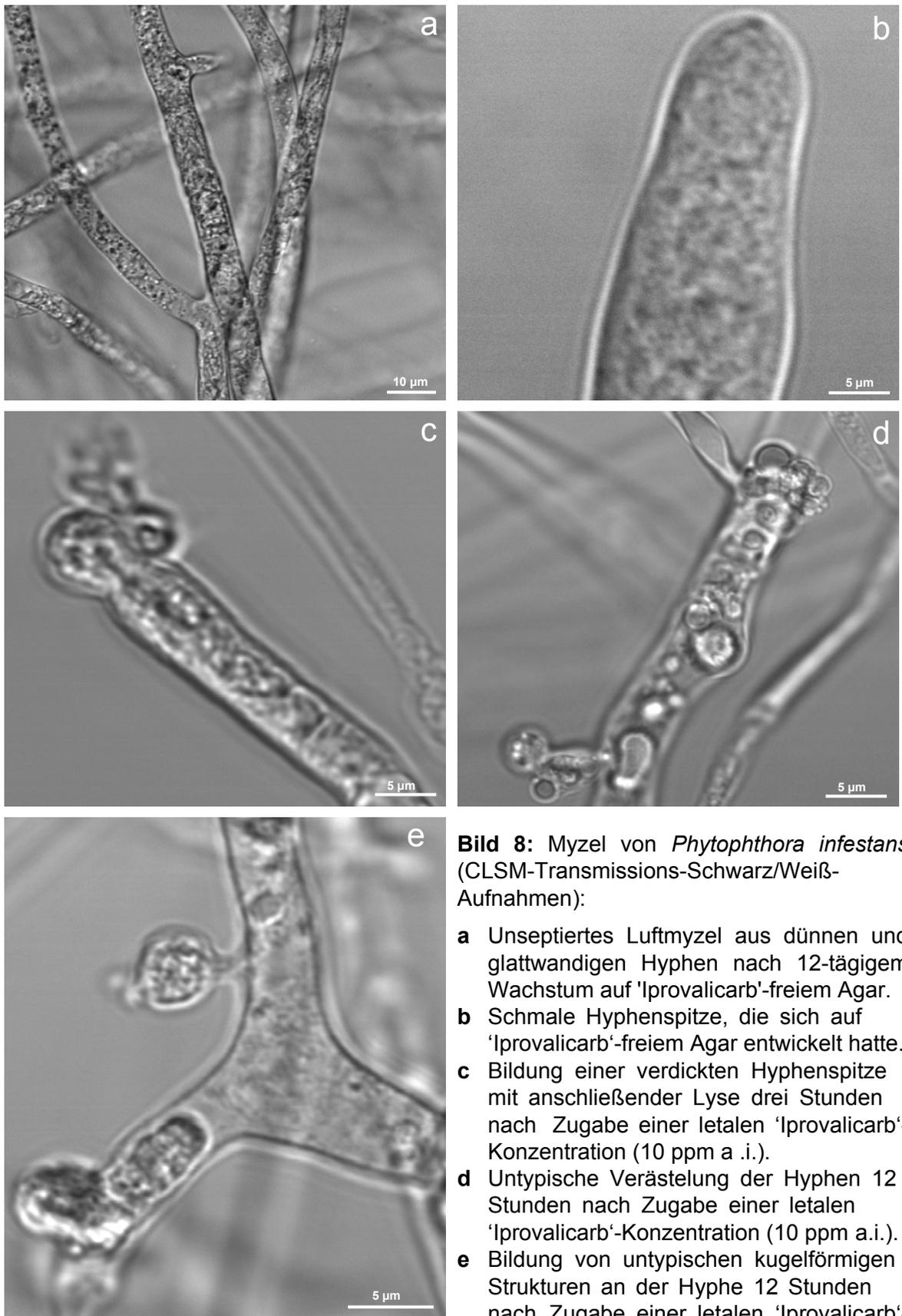


Bild 7: Besiedlung tieferer Gewebeschichten durch *Phytophthora infestans* in unbehandelten und 'Iprovalicarb'-behandelten (5 ppm a.i.) Tomatenblättern (topographische Darstellungen, in der die Farben die räumliche Lage der Strukturen festlegen; Säurefuchsinfärbung):

- Durchwachsen der Epidermis und Ausbreitung im Mesophyll in unbehandelten Tomatenpflanzen. Befallene Mesophyllzellen zeigen eine stärkere Fluoreszenz als nicht befallene.
- Ausbildung von langen, schmalen Haustorien (Pfeile) in unbehandelten Tomatenpflanzen.
- Reduzierte Myzelentwicklung in 'Iprovalicarb'-behandelten Tomatenpflanzen.
- Ausbildung von globulären Haustorien (Pfeil) in Palisadenparenchymzellen in 'Iprovalicarb'-behandelten Tomatenpflanzen.



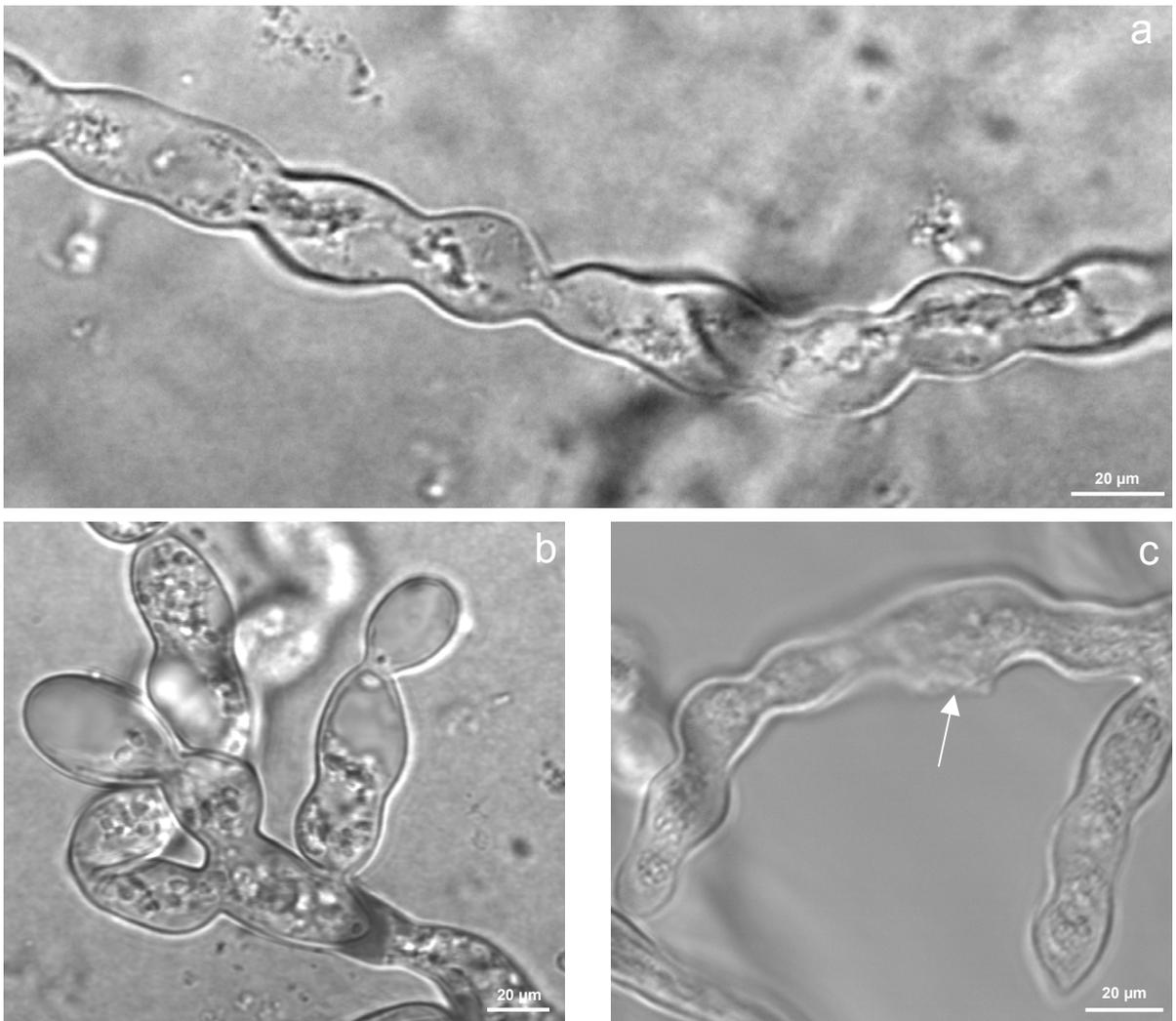


Bild 9: Morphologische Veränderungen an Myzel von *Phytophthora infestans* nach 12-tägiger Entwicklung auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar (0,3 ppm a.i.; CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahmen):

- a** Partiiell eingeschnürte Hyphe mit perlschnurartigem Aussehen.
- b** Globulär verdickte Hyphenspitzen.
- c** Lyse der Zellwand (Pfeil) an Hyphe mit perlschnurartigem Aussehen und Austreten von Cytoplasma.

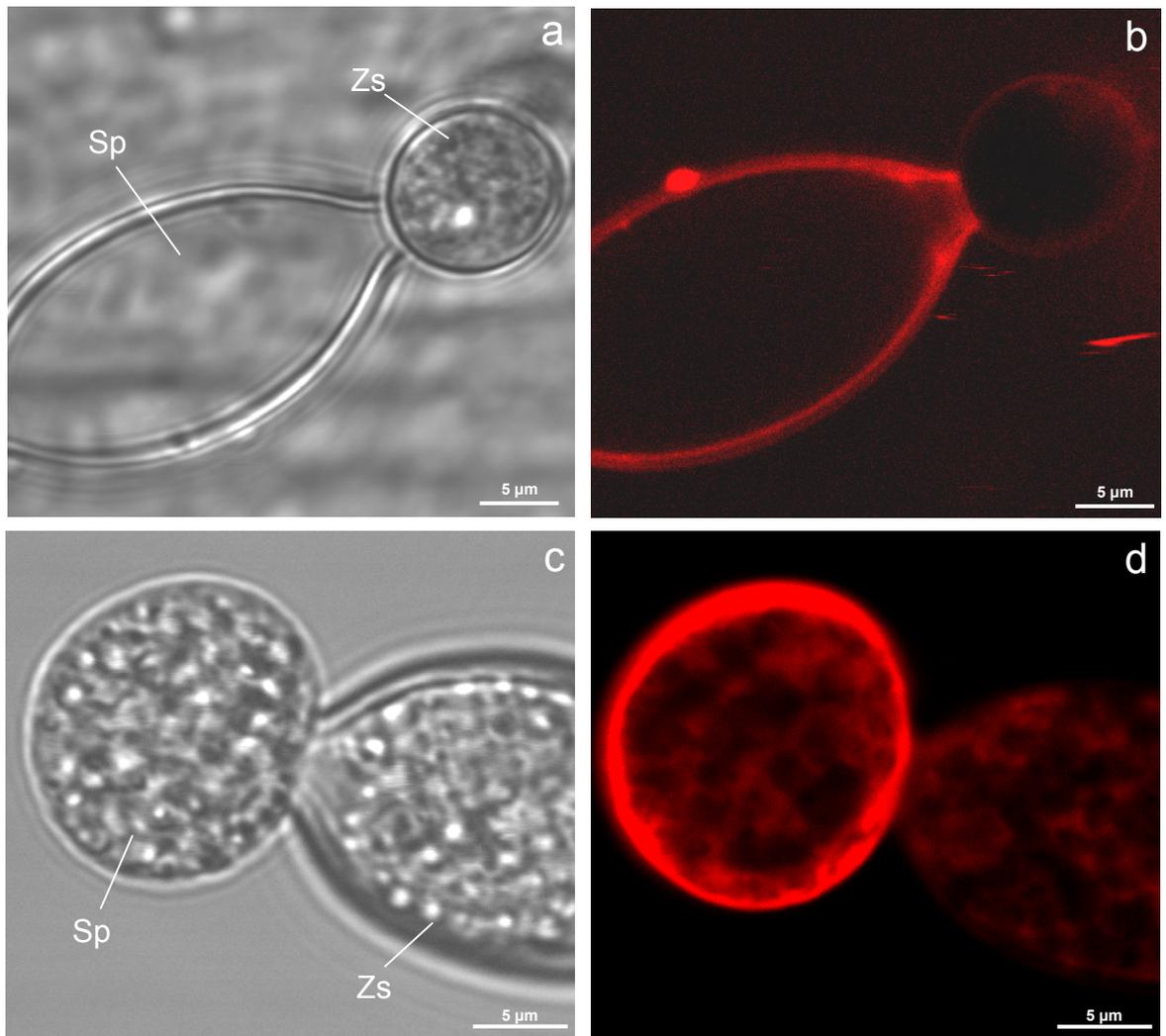


Bild 10: Nachweis von α -D-Mannose \geq α -D-Glucose \geq α -D-N-Acetylglucosamin in den Membranen von schlüpfenden Zoosporen (Zs) und Zellwänden von Sporangien (Sp) von *Phytophthora infestans* in Leitungswasser mit Hilfe von Texas Red[®] markiertem Concanavalin A:

- a Sporangium, das eine Zoospore entläßt (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme).
- b Deutliche Markierung des Sporangiums, während die Zoospore das Fluorochrommarkierte Concanavalin A schwach anlagerte (CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- c Sporangium, das Zoospore entläßt (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme).
- d Deutliche Markierung der Zoospore und schwache Markierung des Sporangiums (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).

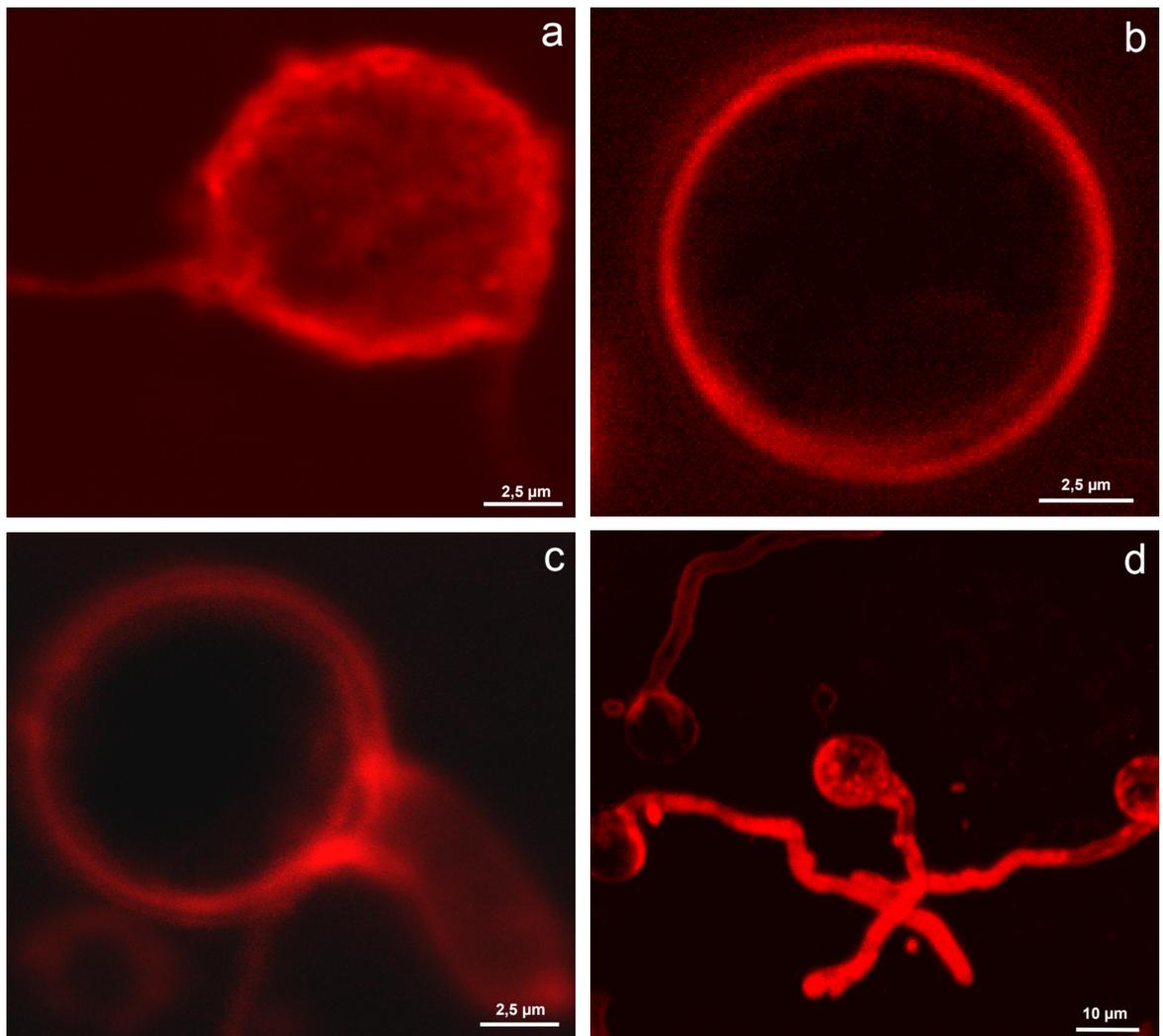


Bild 11: Nachweis von α -D-Mannose \geq α -D-Glucose \geq α -D-N-Acetylglucosamin in der Membran von mobilen Zoosporen und den Zellwänden von Cysten und Keimschläuchen von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von Texas Red[®] markiertem Concanavalin A nach 3,5-stündigem Wachstum in Leitungswasser:

- a** Deutliche Markierung der Zoospore (CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- b** Zweiseichtige Markierung der encystierten Zoospore (CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- c** Verstärkte Markierung an der Ansatzstelle des erst kurzen Keimschlauches an der Zoospore (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- d** Fluorochrom-markiertes Lectin lagerte sich als geschlossene Schicht vor allem in der unteren Hälfte des Keimschlauches an (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).

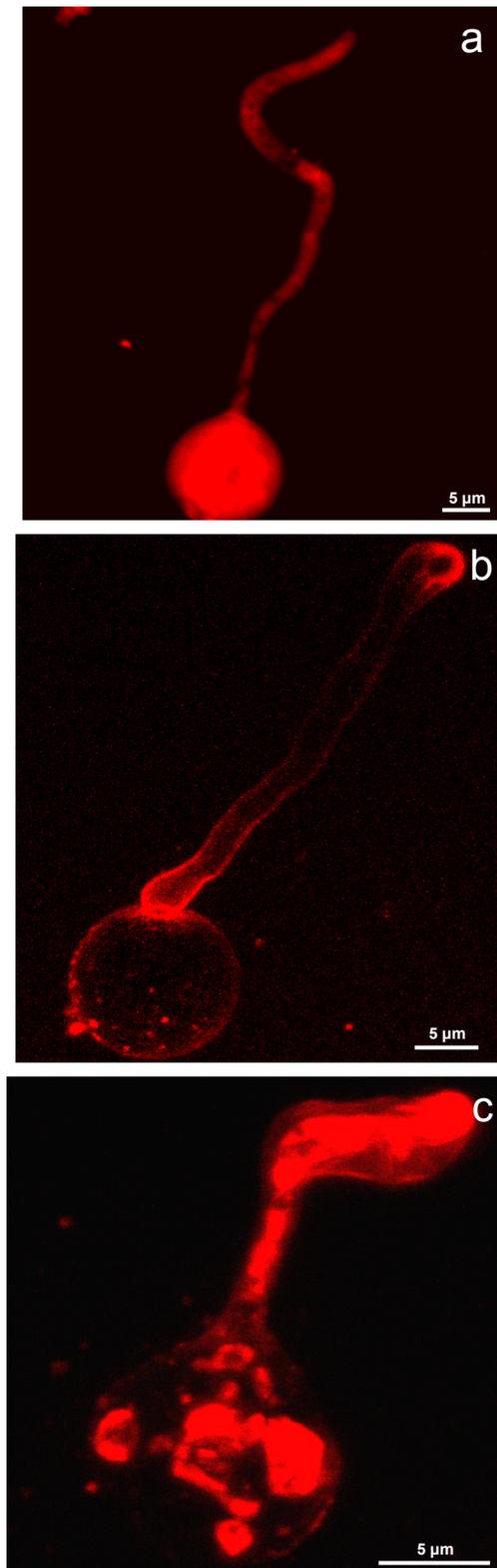


Bild 12: Nachweis von α -D-Mannose \geq α -D-Glucose \geq α -D-N-Acetylglucosamin in den Zellwänden von Cysten und Keimschläuchen von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von Texas Red® markiertem Concanavalin A nach 24-stündigem Wachstum in 'Iprovalicarb'-haltigem Kulturmedium (0,2 ppm a.i.; dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen):

- a** Anlagerung von Concanavalin A im Zellwandbereich des Keimschlauches partiell unterbrochen.
- b** Anlagerung von Concanavalin A nur an der Ansatzstelle des Keimschlauches und der Keimschlauchspitze.
- c** Intensive Fluoreszenz im Zoosporen- und Keimschlauch-Lumen durch das Eindringen von Concanavalin A.

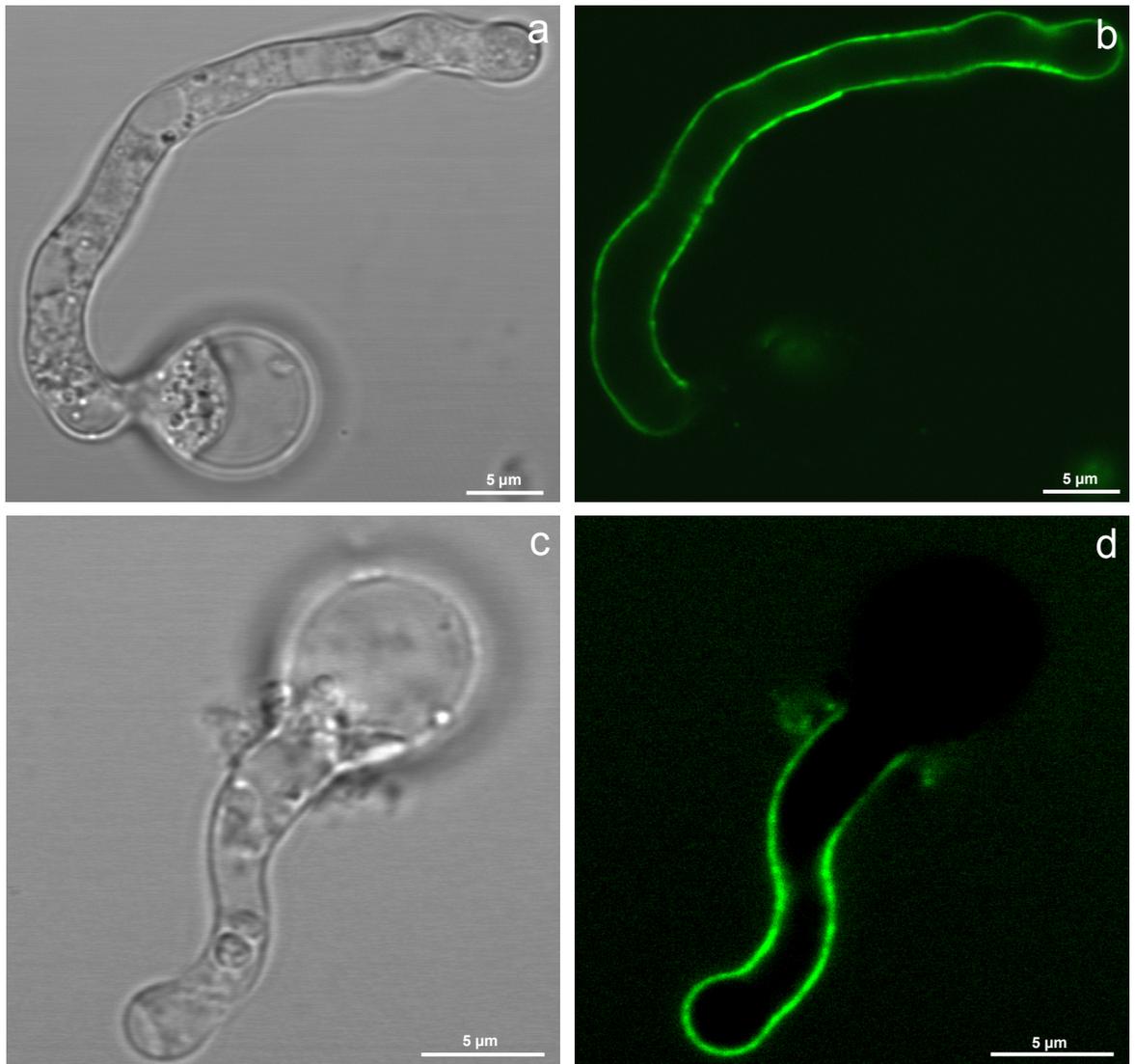


Bild 13: Nachweis von β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₃ \geq β -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)₂-N-Acetylneuraminsäure mit Oregon Green® 488 markiertem Wheat Germ Agglutinin (WGA) in den Zellwänden von Cysten und Keimschläuchen von *Phytophthora infestans* nach 3,5-stündigem Wachstum in 'Iprovalicarb'-freiem oder -haltigem Kulturmedium (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahmen und CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen):

- a In Leitungswasser gekeimte Zoospore.
- b Anlagerung von WGA in der Zellwandregion über den gesamten Keimschlauch.
- c Zoospore, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' (0,4 ppm a.i.) entwickelt hatte.
- d Anlagerung von WGA im gesamten Zellwandbereich des Keimschlauches, der sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' (0,4 ppm a.i.) entwickelt hatte.

Bild 14: Nachweis von α -D-Mannose \geq α -D-Glucose \geq α -D-N-Acetylglucosamin in den Zellwänden von Sporangien und deren Keimschläuchen von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von Texas Red[®] markiertem Concanavalin A nach 24-stündigem Wachstum in 'Iprovalicarb'-haltigem (0,6 ppm a.i.) oder -freiem Kulturmedium (CLSM-Transmissions-Schwarz /Weiß-Aufnahme und CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen):

- a Durch Concanavalin A Markierung einer zweifachen Begrenzungsschicht um ein Sporangium, das in Leitungswasser kultiviert wurde.
- b Die Ansatzstelle des Keimschlauches am Sporangium, das sich in Leitungswasser entwickelt hatte, zeigte eine deutlichere Markierung gegenüber anderen Bereichen.
- c Gekeimtes Sporangium, das in Anwesenheit von 'Iprovalicarb' einen kurzen Keimschlauch entwickelt hatte.
- d Akkumulation des Fluorochrom-markierten Concanavalin A im Lumen des Sporangiums und Keimschlauches in Gegenwart von 'Iprovalicarb'.

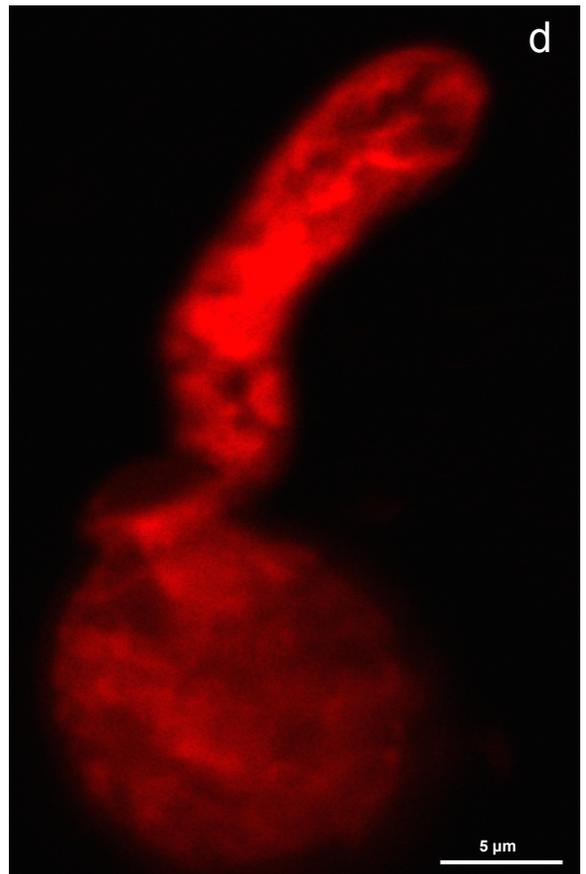
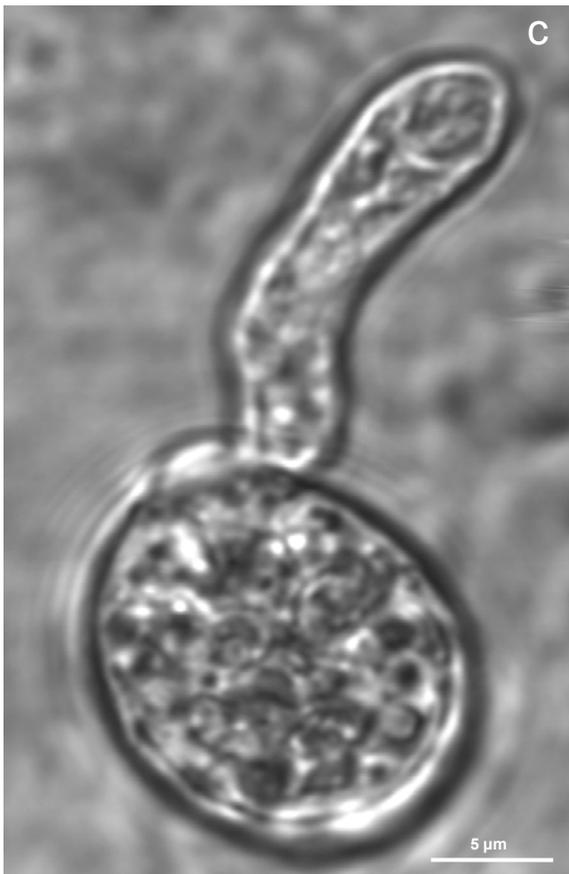
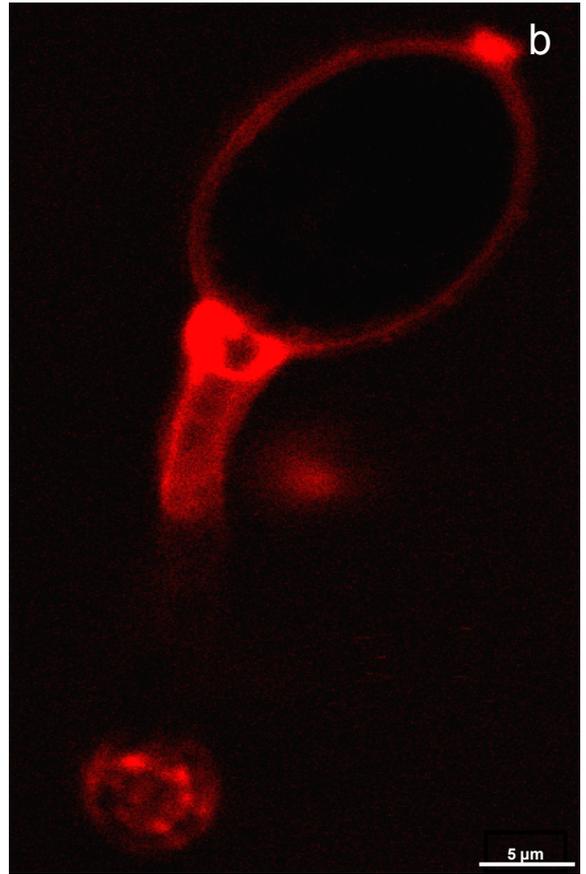
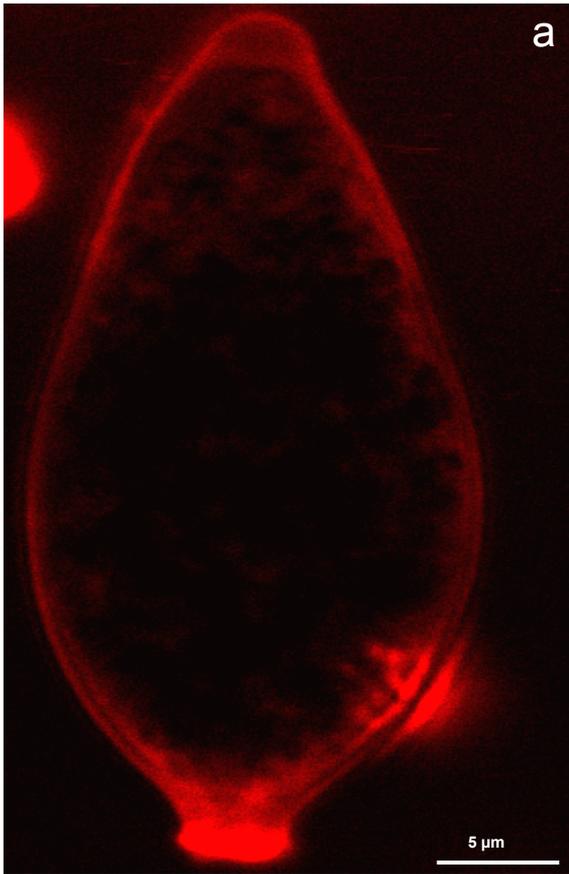


Bild 15: Nachweis von β -D-Galaktose \geq α -D-Galaktose in den Zellwänden von Sporangien und deren Keimschläuchen von *Phytophthora infestans* mit FITC markiertem Agglutinin RCA₁₂₀ nach 24-stündigem Wachstum in 'Iprovalicarb'-freiem oder -haltigem Kulturmedium (1 ppm a.i.; CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen):

- a Agglutinin RCA₁₂₀ lagerte sich in einer doppelten Schicht um die Sporangien, die in Leitungswasser kultiviert wurden.
- b In Leitungswasser gekeimtes Sporangium, das sowohl über den Keimschlauch eine schwache als auch am neugebildeten Sporangium an der Keimschlauchspitze eine starke Markierung zeigte.
- c In Gegenwart von 'Iprovalicarb' gekeimtes Sporangium, das eine Markierung in der Zellwandregion des wesentlich kürzeren Keimschlauches zeigte.
- d Sporangium, das in Gegenwart von 'Iprovalicarb' anstelle eines Keimschlauches eine kugelförmige Struktur gebildet hatte, die sich durch das Lectin deutlich markieren ließ.

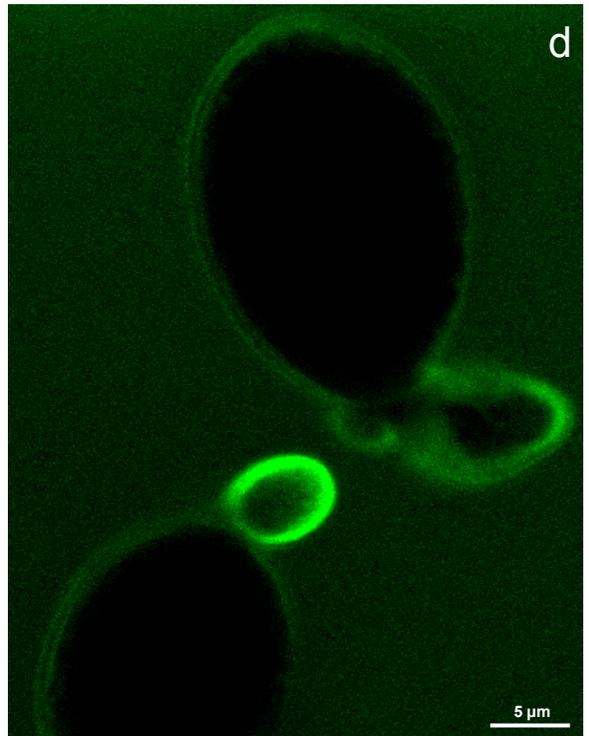
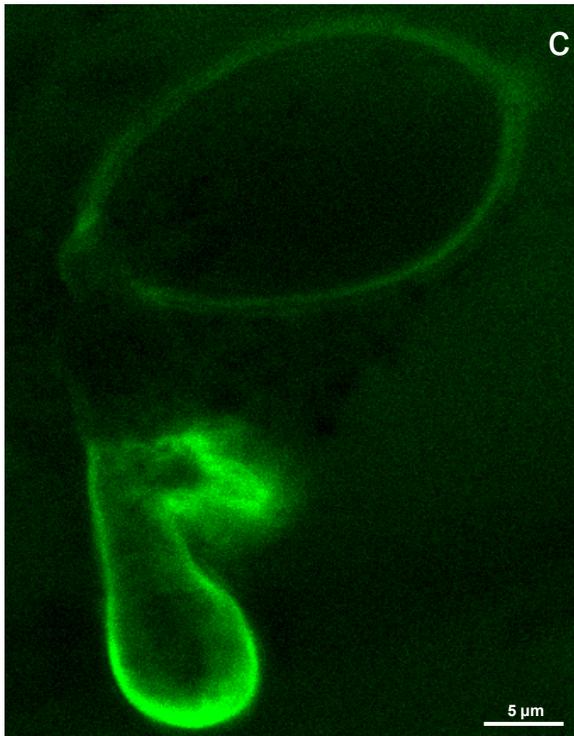
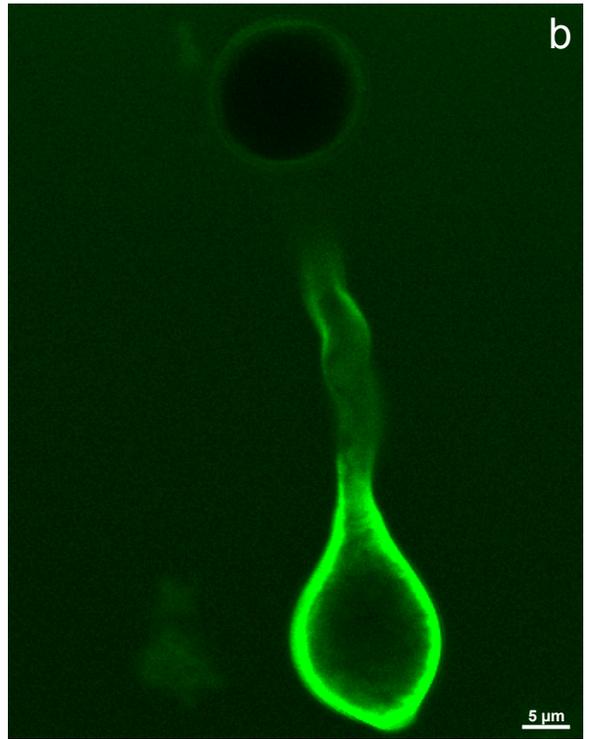
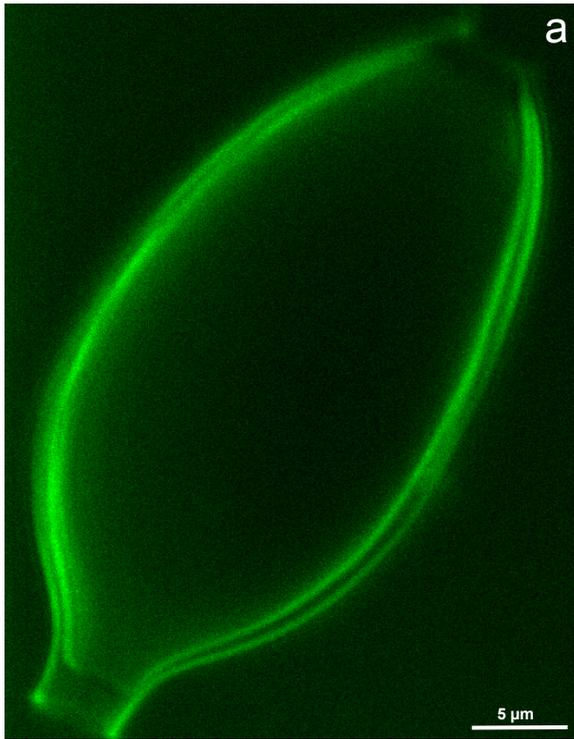
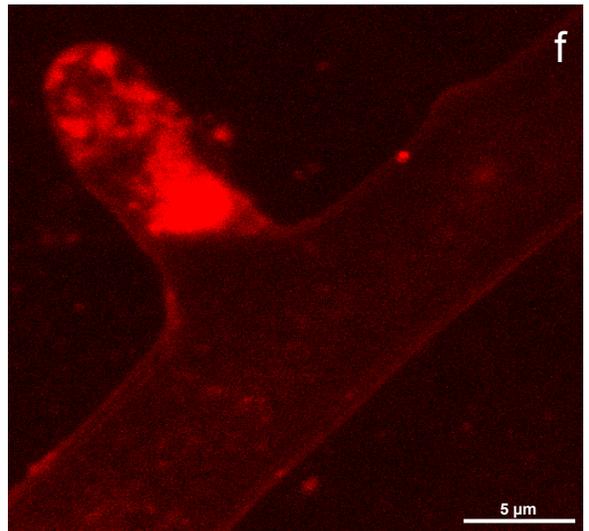
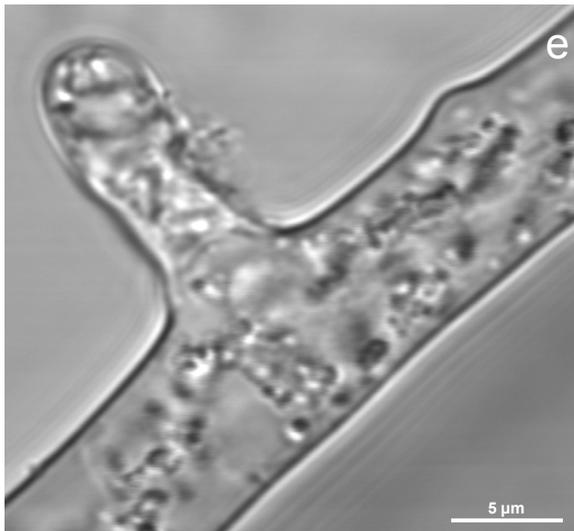
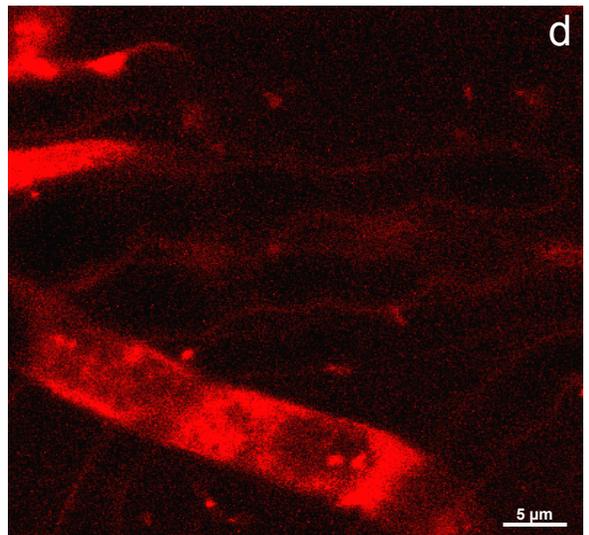
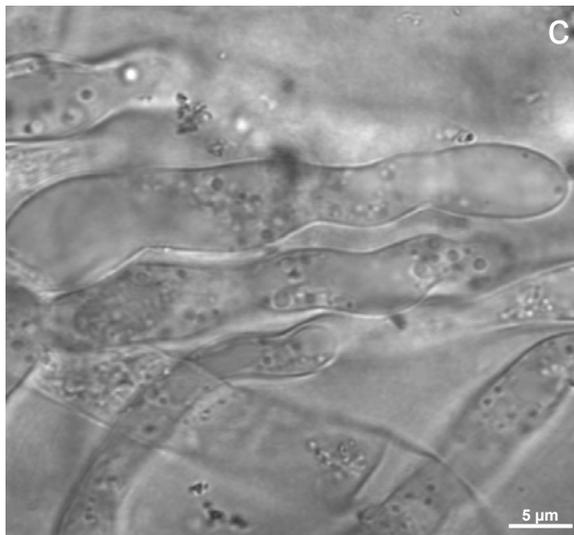
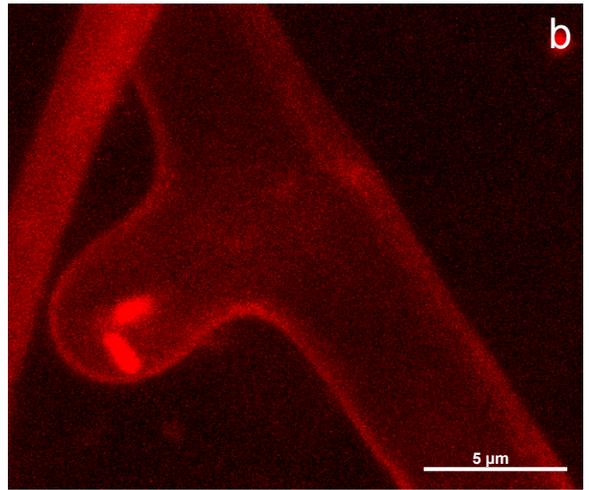
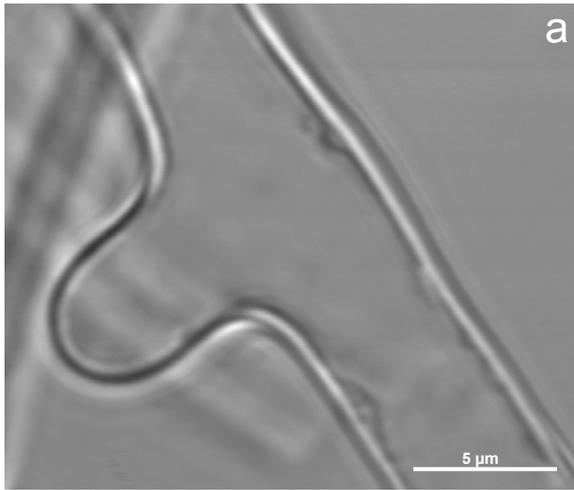


Bild 16: Nachweis von α -D-Mannose \geq α -D-Glucose \geq α -D-N-Acetylglucosamin in den Zellwänden von Hyphen von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von Texas Red® markiertem Concanavalin A nach 12-tägigem Wachstum auf 'Iprovalicarb'-haltigem oder -freiem Agar (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahmen und dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen):

- a** Hyphenspitze, die sich auf Fungizid-freiem Agar entwickelt hatte.
- b** Anlagerung des Lectins in einer geschlossenen Schicht um die Hyphe, die sich auf Fungizid-freiem Agar entwickelt hatte.
- c** Hyphenspitze mit perlschnurartiger Struktur, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' ausgebildet hatte.
- d** Schwache Anlagerung des Lectins im Zellwandbereich perlschnurartiger Hyphen, die sich in Anwesenheit von 'Iprovalicarb' entwickelt hatten.
- e** Neugebildete Hyphenspitze mit partieller Zellwandlyse durch die Wirkung von 'Iprovalicarb'.
- f** Akkumulation von Concanavalin A im Lumen von Hyphen, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' entwickelt hatten.



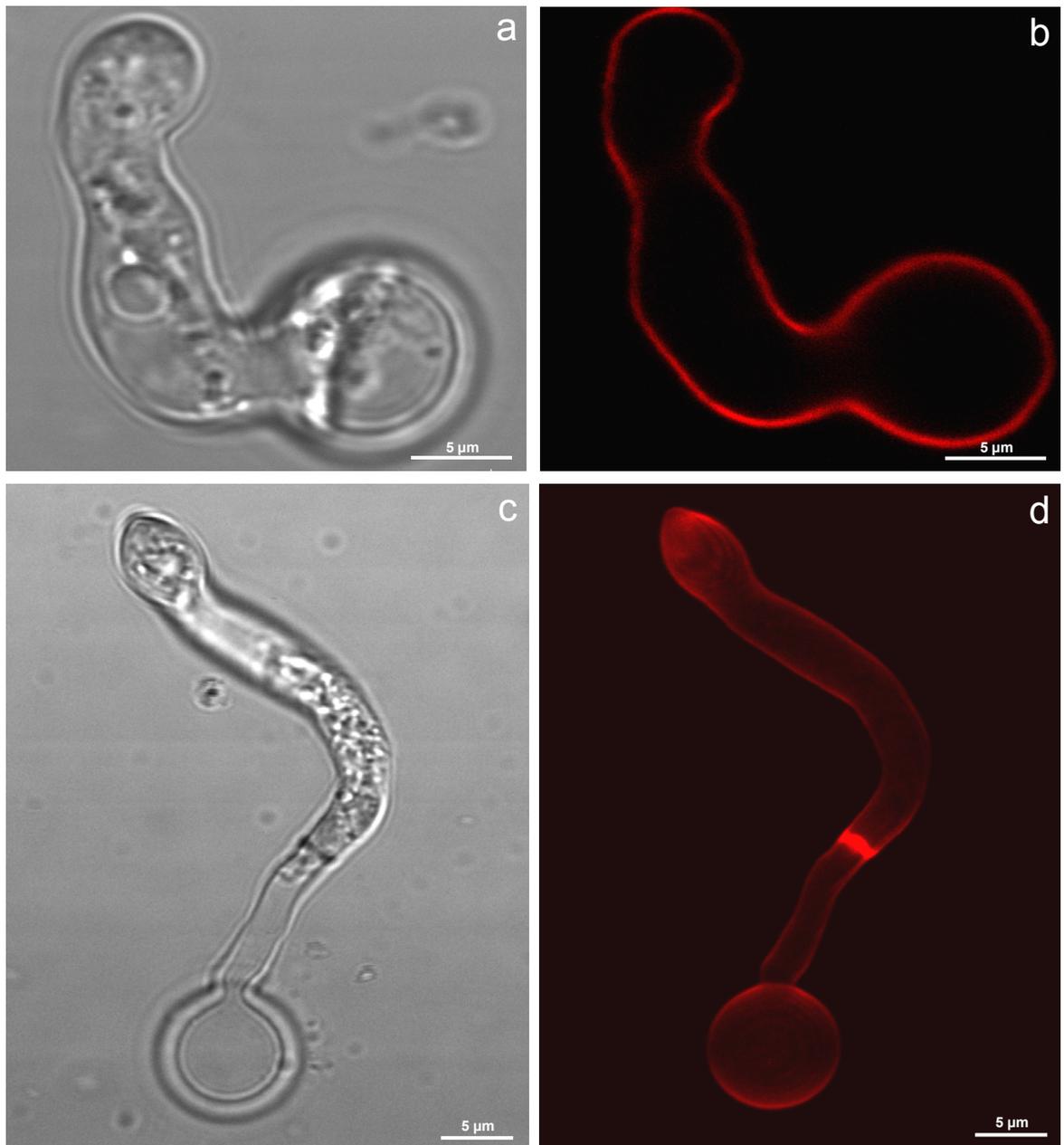


Bild 17: Markierung von Polysacchariden (unter anderem Cellulose) in den Zellwänden von encystierten Zoosporen und Keimschläuchen von *Phytophthora infestans* nach 3,5-stündigem Wachstum in Leitungswasser mit Hilfe von Kongorot:

- a Gekeimte Zoospore mit einem Keimschlauch von ca. 20 µm (CLSM-Transmissions-Schwarz /Weiß-Aufnahme).
- b Homogene Anlagerung des Farbstoffes in der Zellwandregion des Keimschlauches und der encystierten Zoospore (CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- c Gekeimte Zoospore mit einem Keimschlauch von ca. 50 µm (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme).
- d Homogene Anlagerung des Farbstoffes in der Zellwandregion des Keimschlauches und der encystierten Zoospore, sowie des Septums im oberen Drittel des Keimschlauches (dreidimensional verrechnete Fluoreszenz Aufnahme).

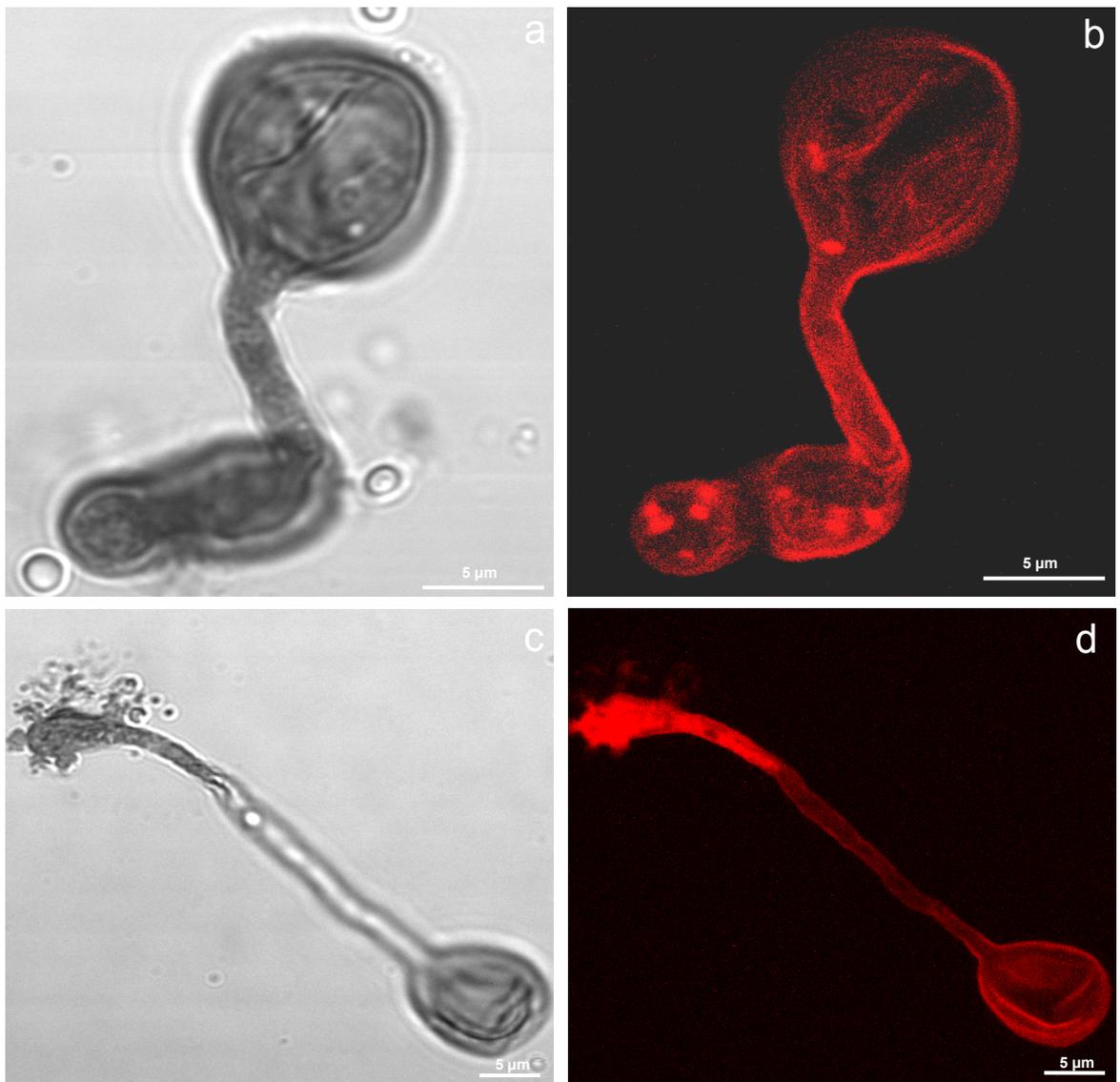
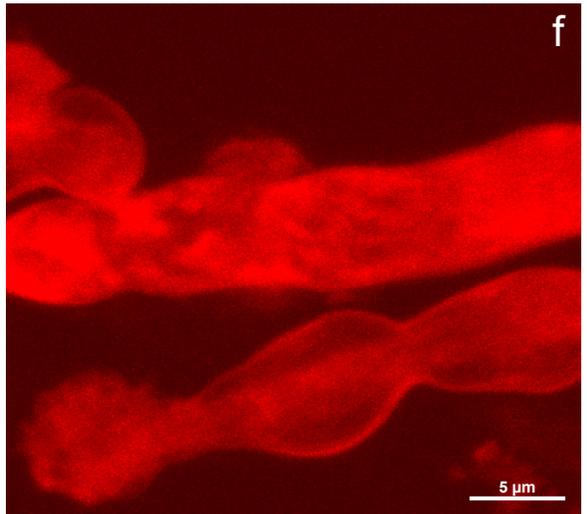
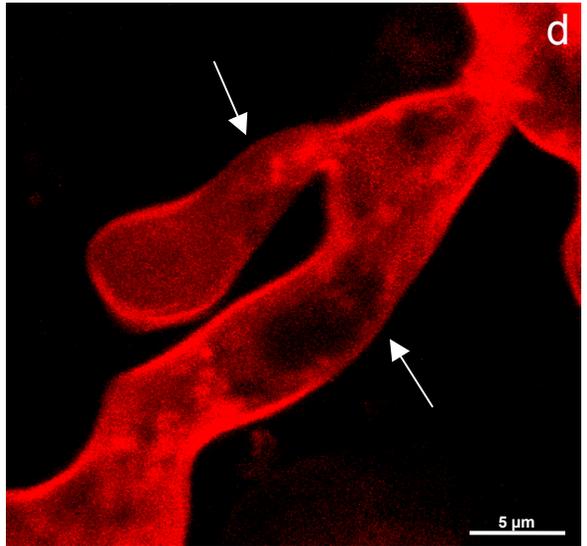
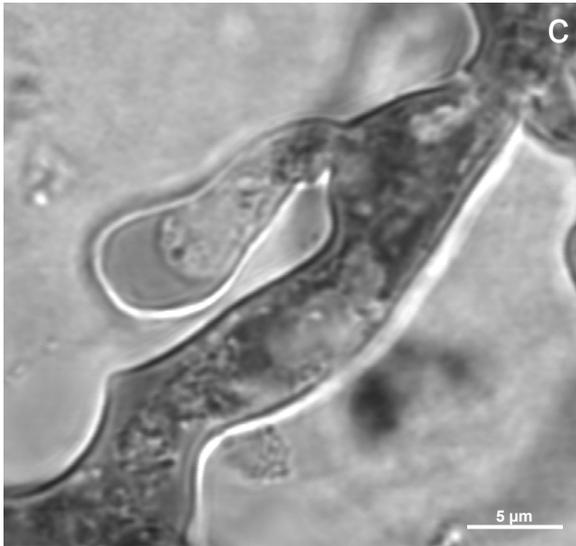
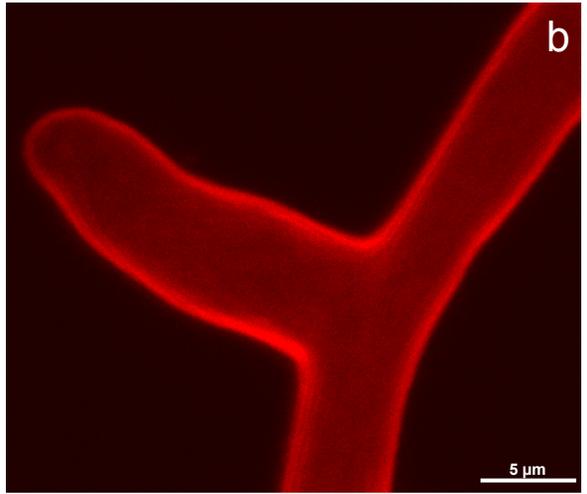
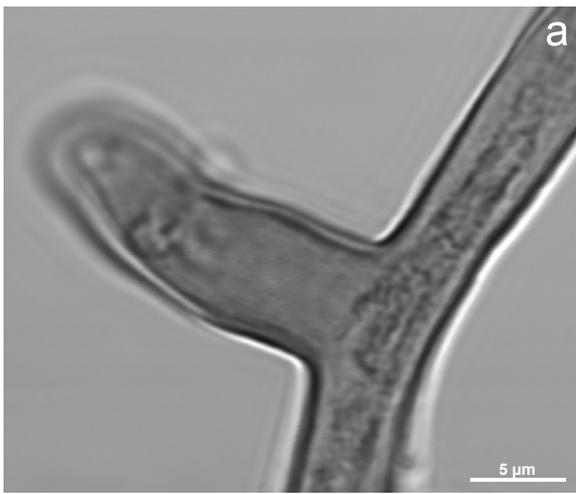


Bild 18: Markierung von Polysacchariden (unter anderem Cellulose) in den Zellwänden von encystierten Zoosporen und Keimschläuchen von *Phytophthora infestans* nach 3,5-stündiger Entwicklung in 'Iprovalicarb'-haltigem Kulturmedium (0,5 ppm a.i.) mit Hilfe von Kongorot (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahmen und dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen):

- a Gekeimte Zoospore mit einem Keimschlauch von 15 µm.
- b Anlagerung des Farbstoffes im Bereich der Zellwand partiell unterbrochen und Akkumulation des Farbstoffes im Pilzinnern.
- c Gekeimte Zoospore mit einem Keimschlauch von 40 µm, der an der Keimschlauchspitze eine verdickte Struktur mit partiell aufgelöster Zellwand zeigte.
- d Schwache Anlagerung des Farbstoffes um die encystierte Zoospore und in der Zellwandregion des Keimschlauches. Intensive Fluoreszenz im unteren Teil des Keimschlauches.

Bild 19: Markierung von Polysacchariden (unter anderem Cellulose) in den Hyphenzellwänden von *Phytophthora infestans* nach 12-tägigem Wachstum auf 'Iprovalicarb'-haltigem (0,3 ppm a.i.) oder -freiem Agar mit Hilfe von Kongorot (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahmen und dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen):

- a** Hyphenspitze mit einer glatten Oberfläche, die sich auf 'Iprovalicarb'-freiem Agar entwickelt hatte.
- b** Homogene Anlagerung des Farbstoffes in der Zellwandregion der Hyphenspitze, die sich auf 'Iprovalicarb'-freiem Agar entwickelt hatte.
- c** Hyphenspitze, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar gebildet hatte.
- d** Anlagerung des Farbstoffes war an einigen Stellen (Pfeile) im Zellwandbereich der Hyphenspitzen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten, unterbrochen.
- e** Hyphe, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatte, mit perlschnurartiger Struktur, deren Spitze eine Auflösung der Zellwand zeigte.
- f** Intensive Akkumulation des Farbstoffes im Hyphenlumen und schwache Anlagerung des Farbstoffes in der Zellwandregion von Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten.



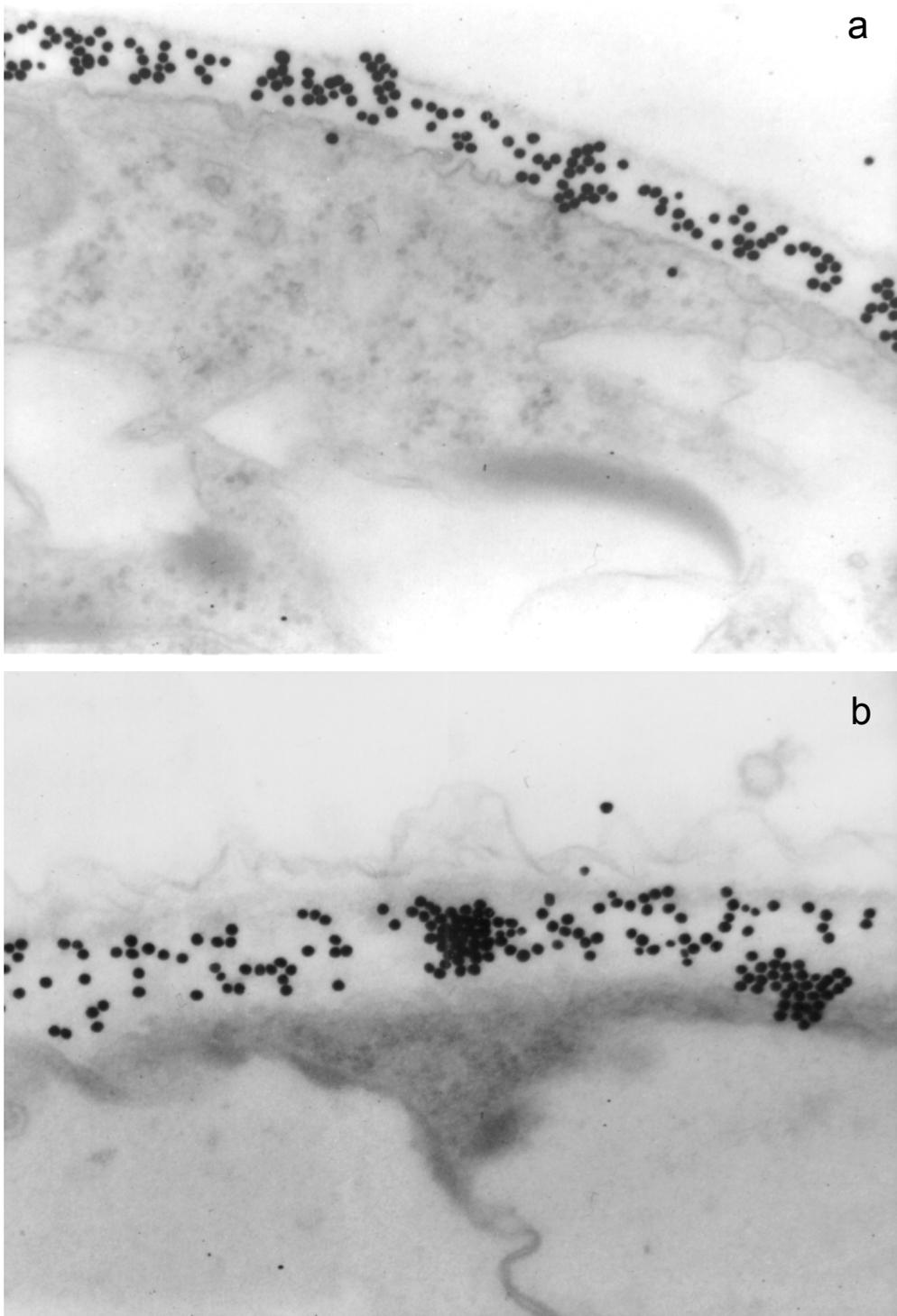


Bild 20: Nachweis von Cellulose mit Hilfe eines Cellulase-Gold-Komplexes in den Zellwänden von Hyphen von *Phytophthora infestans*, die sich auf 'lprovalicarb'-freiem (a, 0,3 ppm a.i.) oder -haltigem Agar (b) entwickelt hatten (50.000-fache Vergrößerung):

- a Überwiegend gleichmäßige Anlagerung der Goldpartikel.
- b Partiiell erhöhte spezifische Markierungsdichte für Cellulose in der verdickten Zellwand; Ausstülpungen der äußeren Zellwandschicht, von der sich Vesikel abtrennen.

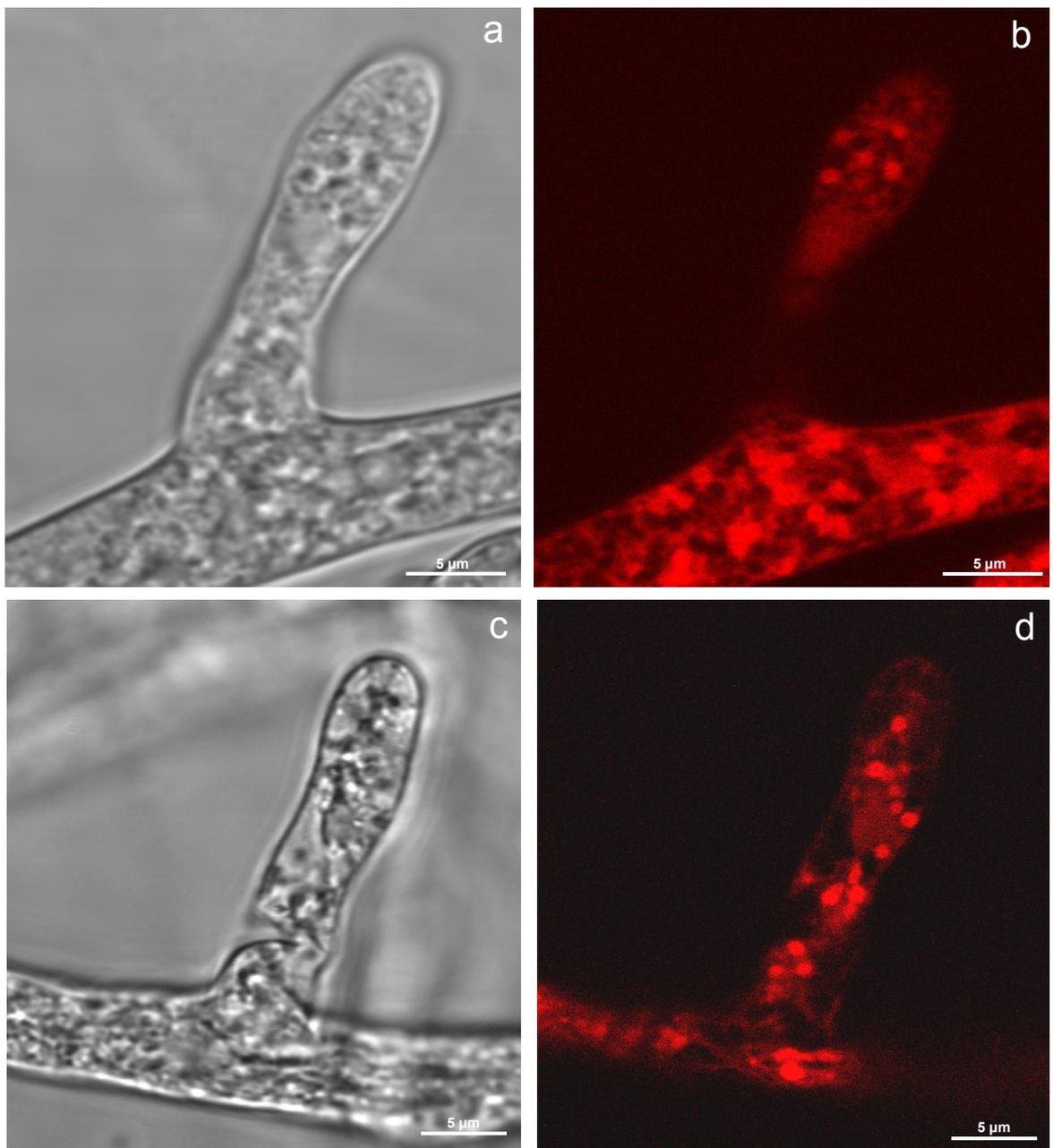


Bild 21: Markierung der Mikrotubuli in den Hyphen von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von Tetramethylrhodamin markiertem Tubulin nach 12-tägigem Wachstum auf Agar (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahmen und CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen):

a, c Neugebildete Hyphenspitze

b, d Globuläre Mikrotubulistrukturen, die durch filamentöse verbunden sind.

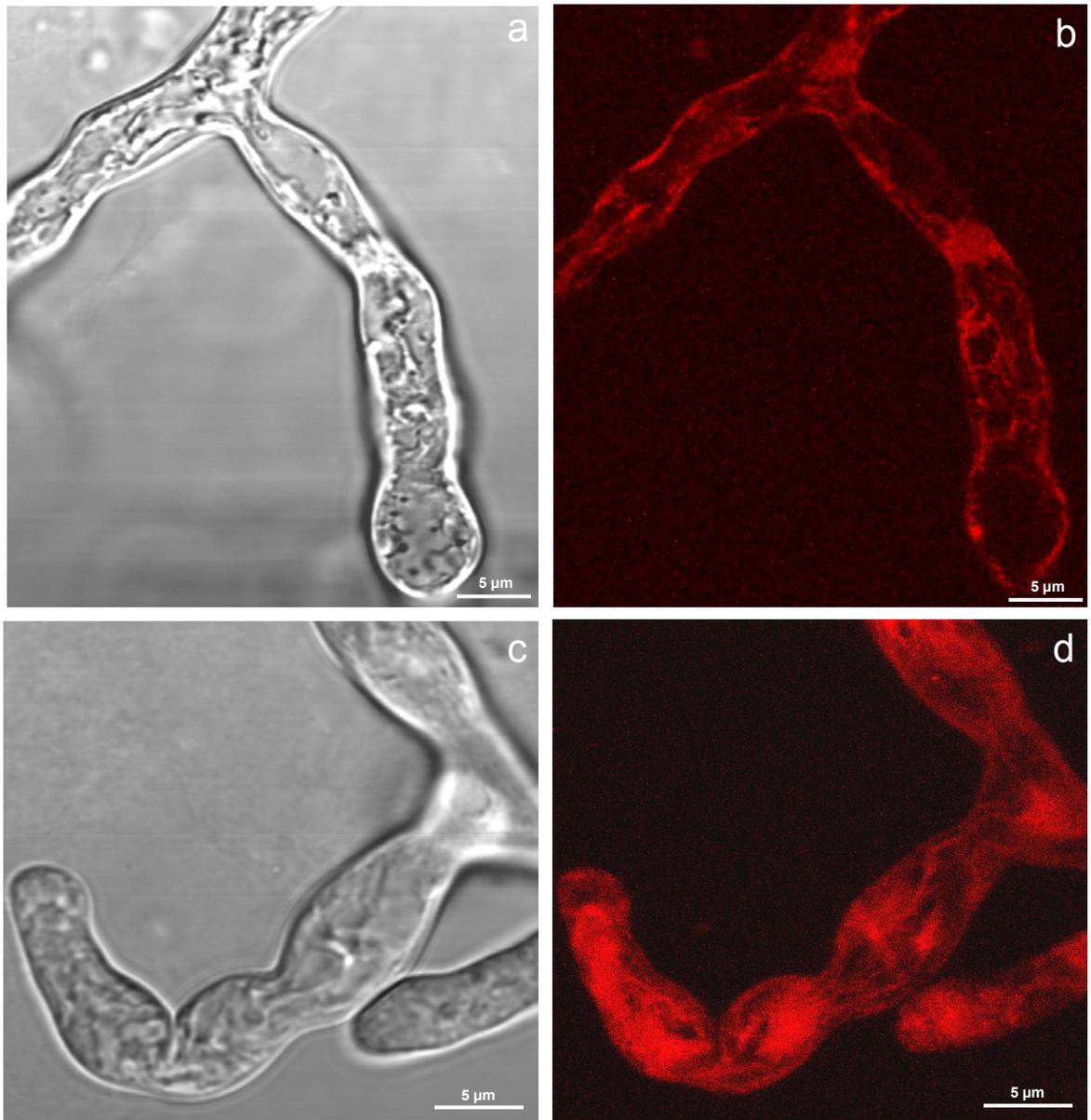


Bild 22: Markierung der Mikrotubuli in den Hyphen von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von Tetramethylrhodamin markiertem Tubulin nach 12-tägigem Wachstum auf 'Iprovali-carb'-haltigem Gemüsesaftagar (0,3 ppm a.i.):

- a Neugebildete Hyphenspitze (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme).
- b Auftreten von dicken, langen Mikrotubulifilamenten (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- c Neugebildete Hyphenspitze mit perlschnurartiger Struktur (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme).
- d Auftreten von dicken, langen Mikrotubulifilamenten und intensiv fluoreszierenden Plaques im Hyphenlumen (CLSM-Fluoreszenzaufnahme).

Bild 23: Markierung von Actin in den Hyphen von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von Fluorochrom markiertem Phalloidin nach 12-tägigem Wachstum auf 'Iprovalicarb'-haltigem (0,2 ppm a.i.) oder -freiem Agar:

- a** Globuläre Struktur von Actin in Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-freiem Agar entwickelt hatten (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- b** Globuläres Actin in den Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-freiem Agar entwickelt hatten, sind durch filamentöse Strukturen verbunden (CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- c** Schmale Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme).
- d** Kurze, verdickte Actinfilamente in den Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- e** Hyphen mit perlschnurartiger Struktur, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme).
- f** Actinelemente in perlschnurartigen Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten, waren nicht markierbar (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).

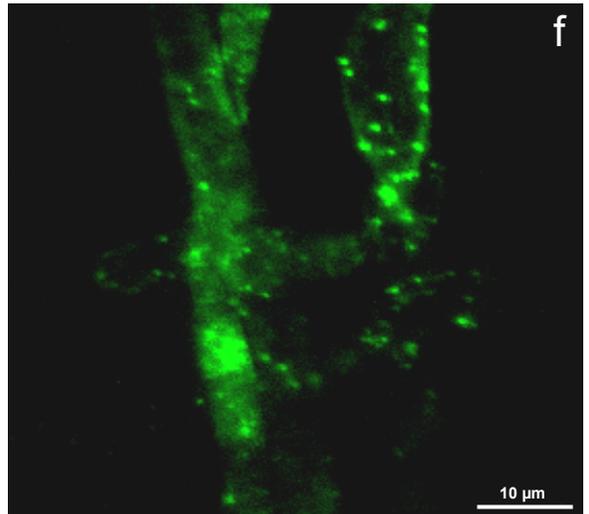
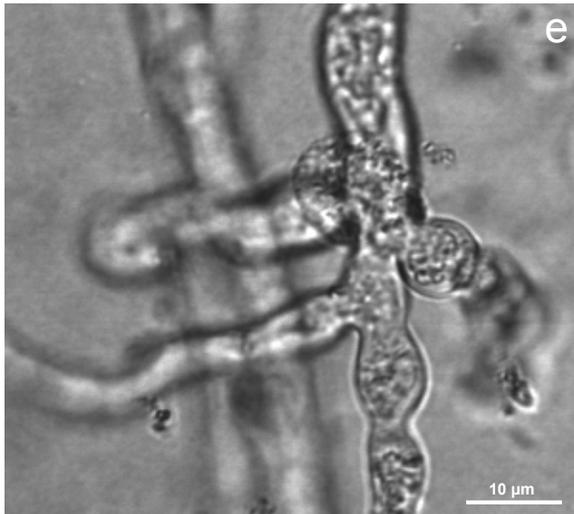
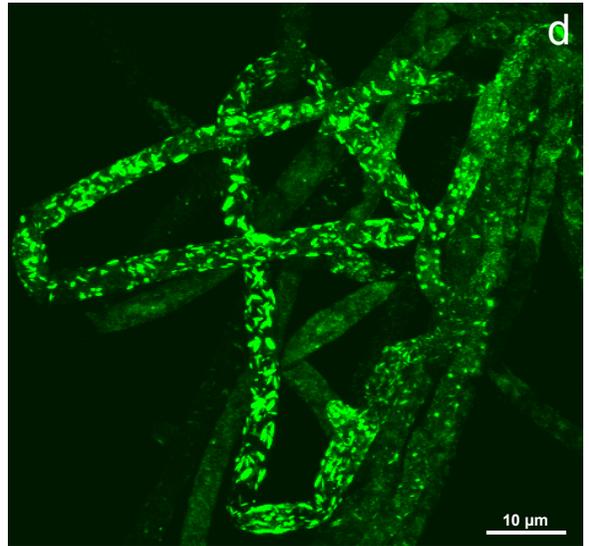
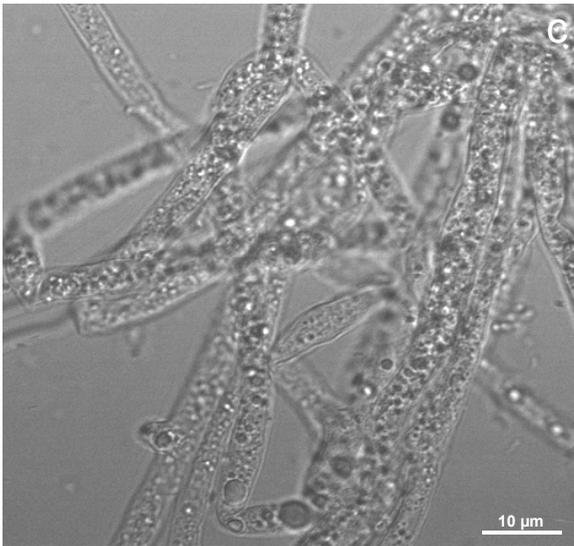
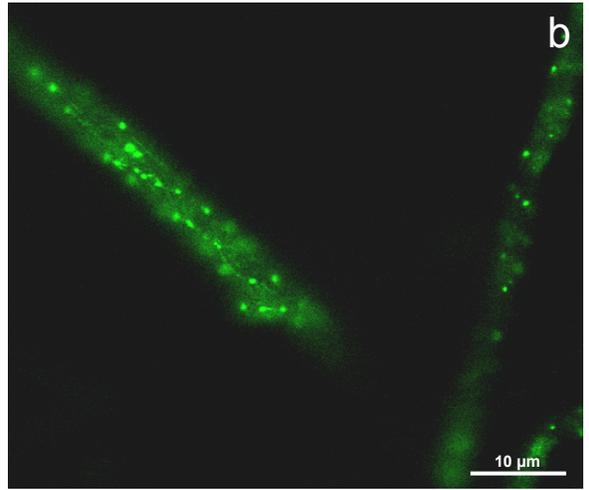
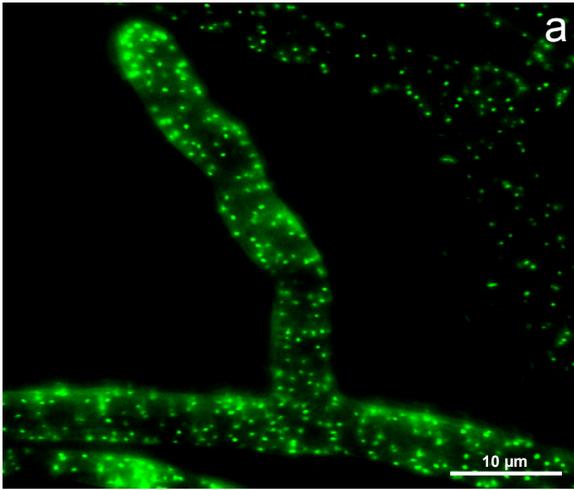
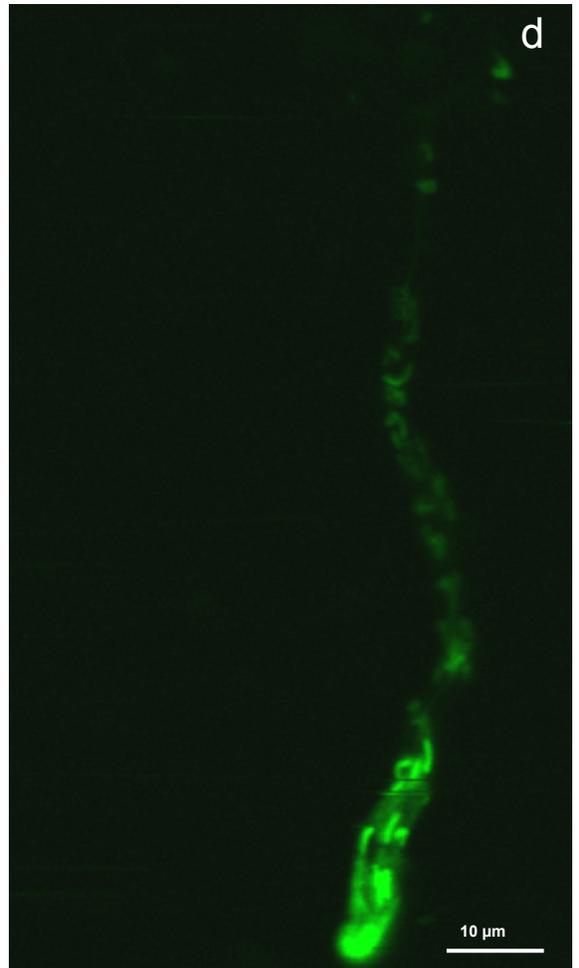
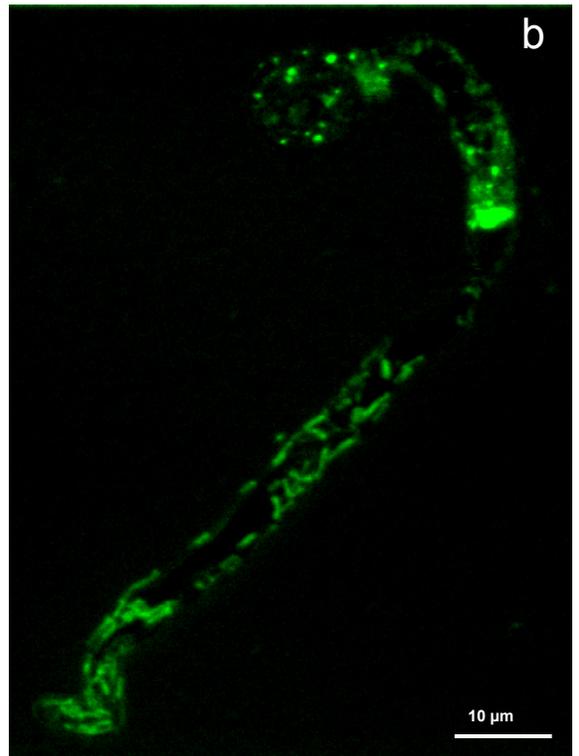


Bild 24: Markierung der Mitochondrien in gekeimten Zoosporen von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von DIOC₆ nach 24-stündigem Aufenthalt in 'Iprovalicarb'-freiem oder -haltigem Kulturmedium (0,2 ppm a.i.; CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahmen und CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen):

- a** Gekeimte Zoospore, die in Leitungswasser einen Keimschlauch von 50 µm entwickelt hatte.
- b** Gekeimte Zoospore, deren Mitochondrien eine runde oder linienförmige Struktur besitzen, wobei die linienförmigen überwiegend im stoffwechselaktiveren Bereich des Keimschlauches vertreten waren.
- c** Gekeimte Zoospore, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' entwickelt hatte.
- d** Gekeimte Zoospore, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' entwickelt hatte, deren Mitochondrien eine runde oder linienförmige Struktur zeigten.



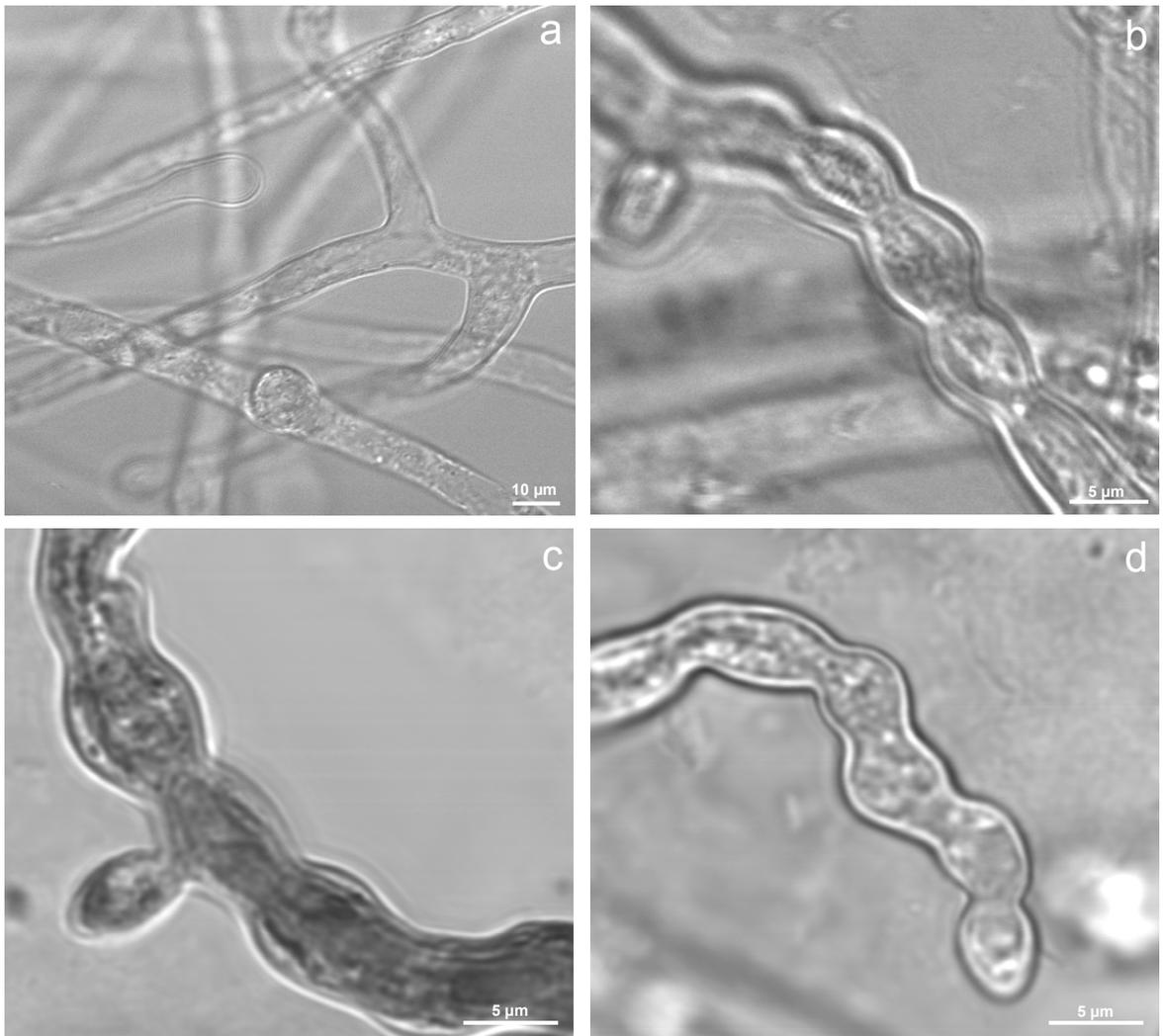


Bild 25: Zwölf Tage altes Myzel von *Phytophthora infestans*, das sich auf 'Iprovalicarb'-, 'Dimethomorph'-haltigem oder Fungizid-freiem Gemüsesaftagar entwickelt hatte (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahmen):

- a** Schmale Hyphen mit einer glatten Oberfläche, die sich auf Fungizid-freiem Agar entwickelt hatten.
- b** Hyphe mit einer perlschnurartigen Struktur, die sich auf 'Dimethomorph'-haltigem Agar entwickelt hatte (0,5 ppm a.i.).
- c** Hyphe mit einer perlschnurartigen Struktur, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatte (0,3 ppm a.i.).
- d** Hyphenspitze, die sich auf 'Dimethomorph'-haltigem Agar entwickelt hatte (0,5 ppm a.i.).

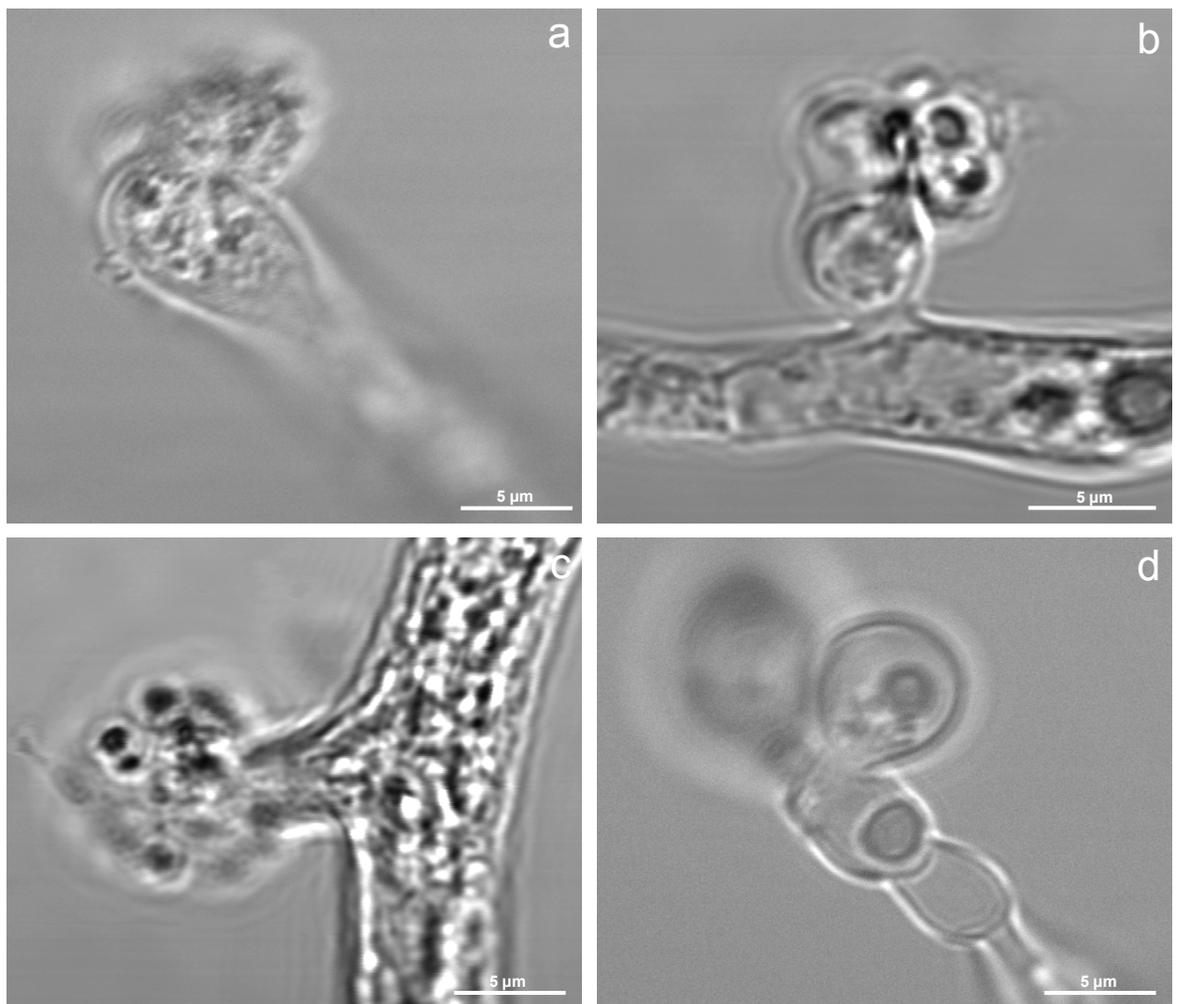


Bild 26: Morphologische Veränderungen der Hyphen von *Phytophthora infestans* nach Zugabe einer 'Dimethomorph'-haltigen Lösung (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme):

- a** Lyse der Zellwand an der Hyphenspitze 24 Stunden nach 'Dimethomorph'-Zugabe (1 ppm a.i.)
- b, c** Lyse der Zellwand fünf Stunden nach 'Dimethomorph'-Zugabe (10 ppm a.i.).
- d** Wachstumsanomalien an der Hyphenspitze 24 Stunden nach 'Dimethomorph'-Zugabe (10 ppm a.i.).

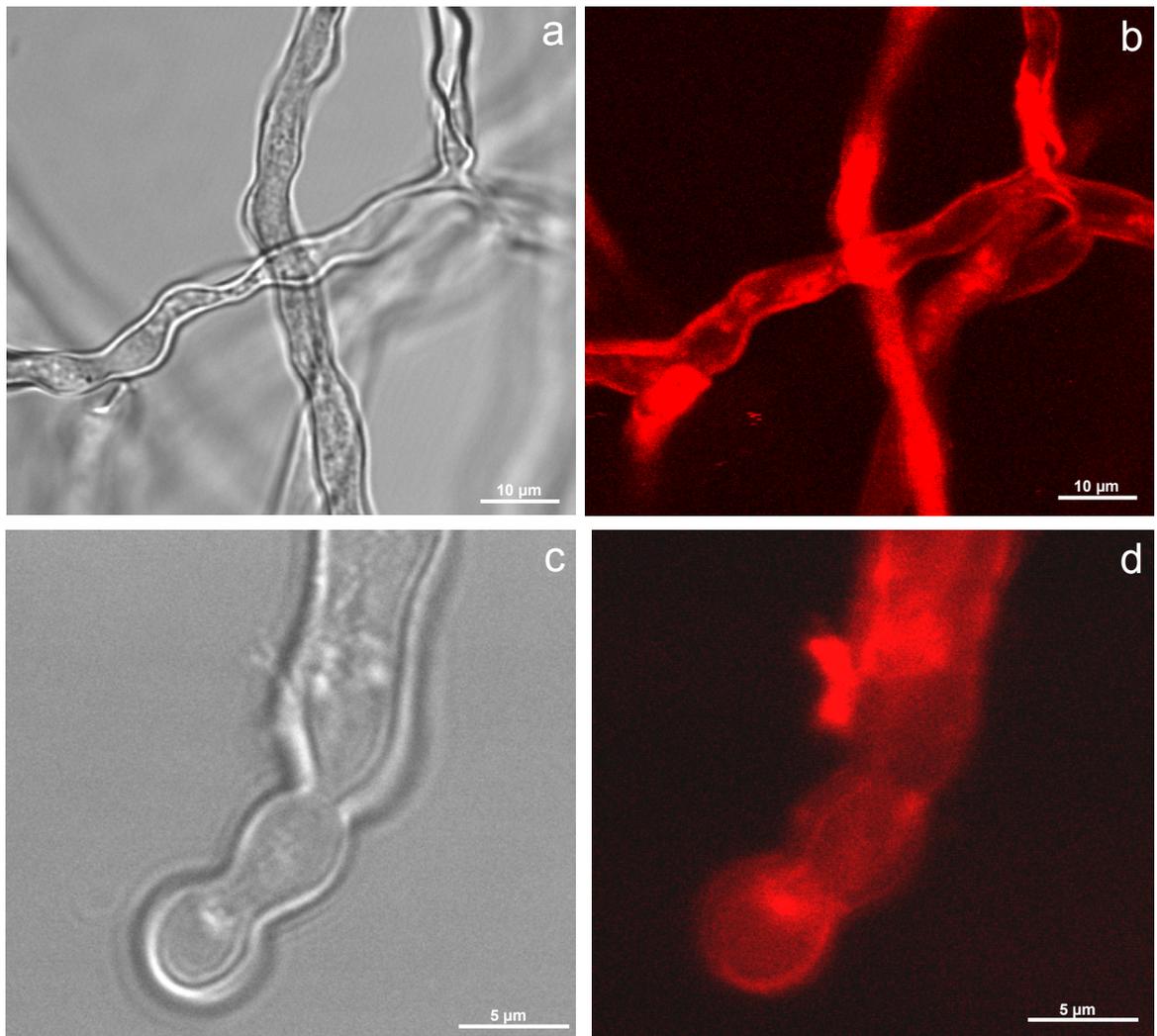


Bild 27: Nachweis von α -D-Mannose \geq α -D-Glucose \geq α -D-N-Acetylglucosamin in den Zellwänden von Hyphen von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von Texas Red® markiertem Concanavalin A nach 12-tägigem Wachstum auf 'Dimethomorph'-haltigem Agar (bis 0,5 ppm a.i.; CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahmen und dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen):

- a Hyphen mit partiell eingeschnürten Bereichen.
- b Homogene Anlagerung des Lectins im Bereich der Zellwandregionen und intensive Fluoreszenz im Hyphenlumen.
- c Hyphenspitze mit einer perlschnurartigen Struktur.
- d Homogene Anlagerung des Lectins im Bereich der Zellwandregion einer Hyphenspitze mit perlschnurartiger Struktur; intensive Fluoreszenz im Hyphenlumen.

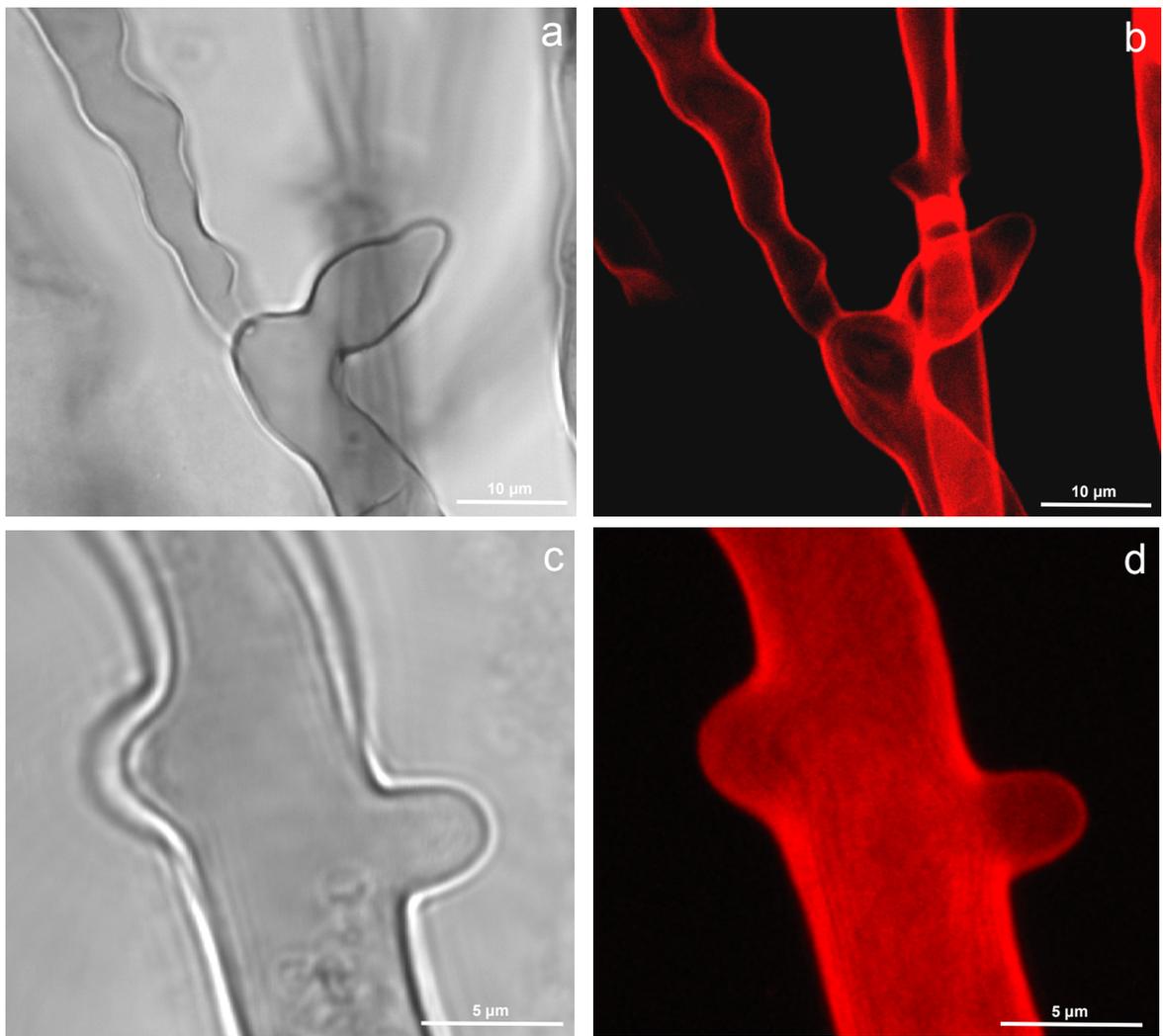


Bild 28: Markierung von Polysacchariden (unter anderem Cellulose) in den Hyphenzellwänden von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von Kongorot nach 12-tägigem Wachstum auf 'Dimethomorph'-haltigem Agar:

- a Hyphe mit teilweise perlschnurartiger Struktur (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme).
- b Homogene Anlagerung des Farbstoffes im Bereich der Zellwandregion um die gesamte Hyphe (CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- c Hyphe mit neugebildeten Hyphenspitzen (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme).
- d Homogene Anlagerung des Farbstoffes im Bereich der Zellwandregion um die gesamte Hyphe und die neugebildeten Hyphenspitzen (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).

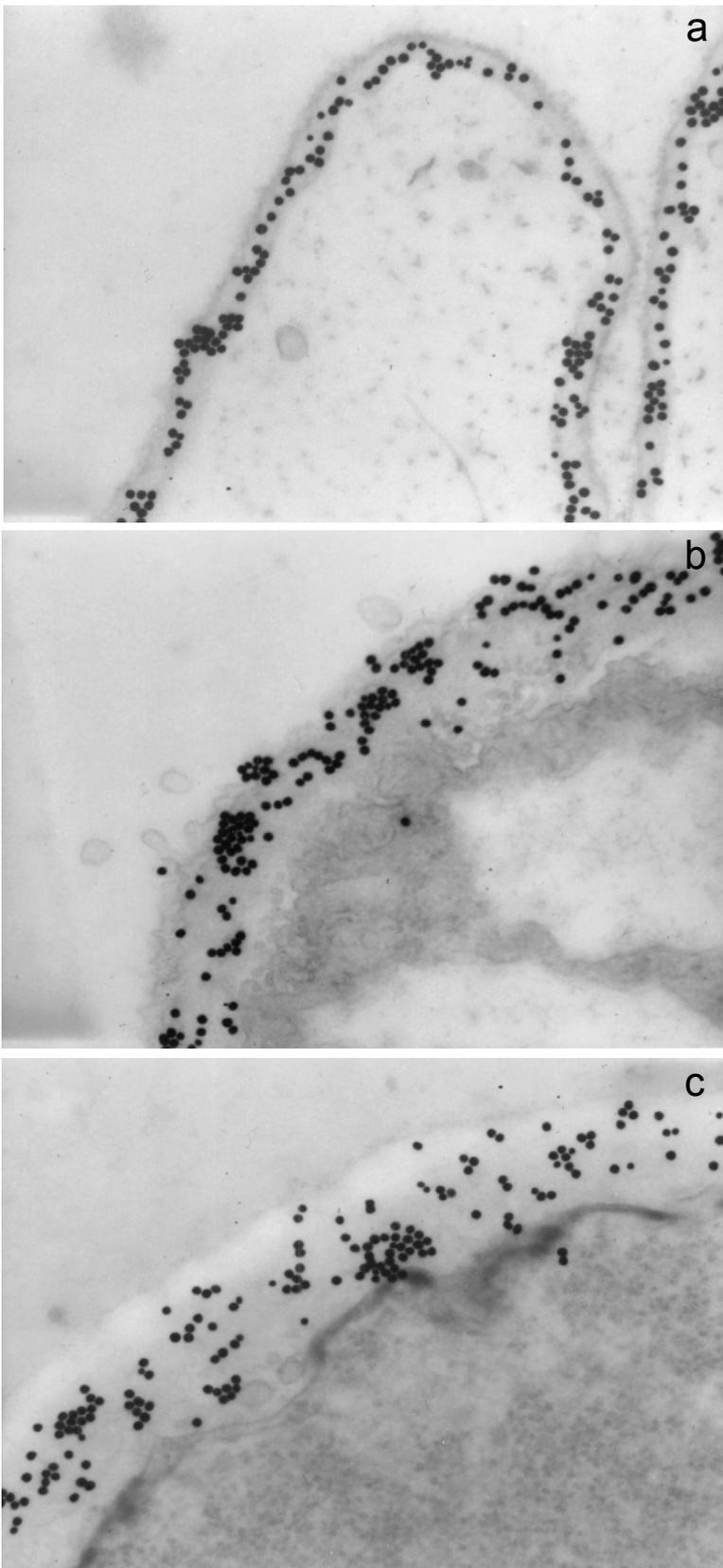


Bild 29: Nachweis von Cellulose mit Hilfe eines Cellulase-Goldkomplexes in den Zellwänden von Hyphen von *Phytophthora infestans*, die sich auf Fungizid-freiem (a), 'Iprovalicarb'-haltigem (b, 0,3 ppm a.i.) oder 'Dimethomorph'-haltigem (c, 0,5 ppm a.i.) Agar entwickelt hatten (50.000 fache Vergrößerung) :

- a Überwiegend gleichmäßige Anlagerung der Goldpartikel.
- b Partielle Akkumulation der Goldpartikel in der verdickten Zellwand; Ausstülpungen von der äußeren Zellwandschicht von der sich Vesikel abtrennen.
- c Überwiegend gleichmäßige Anlagerung der Goldpartikel in der verdickten Zellwand.

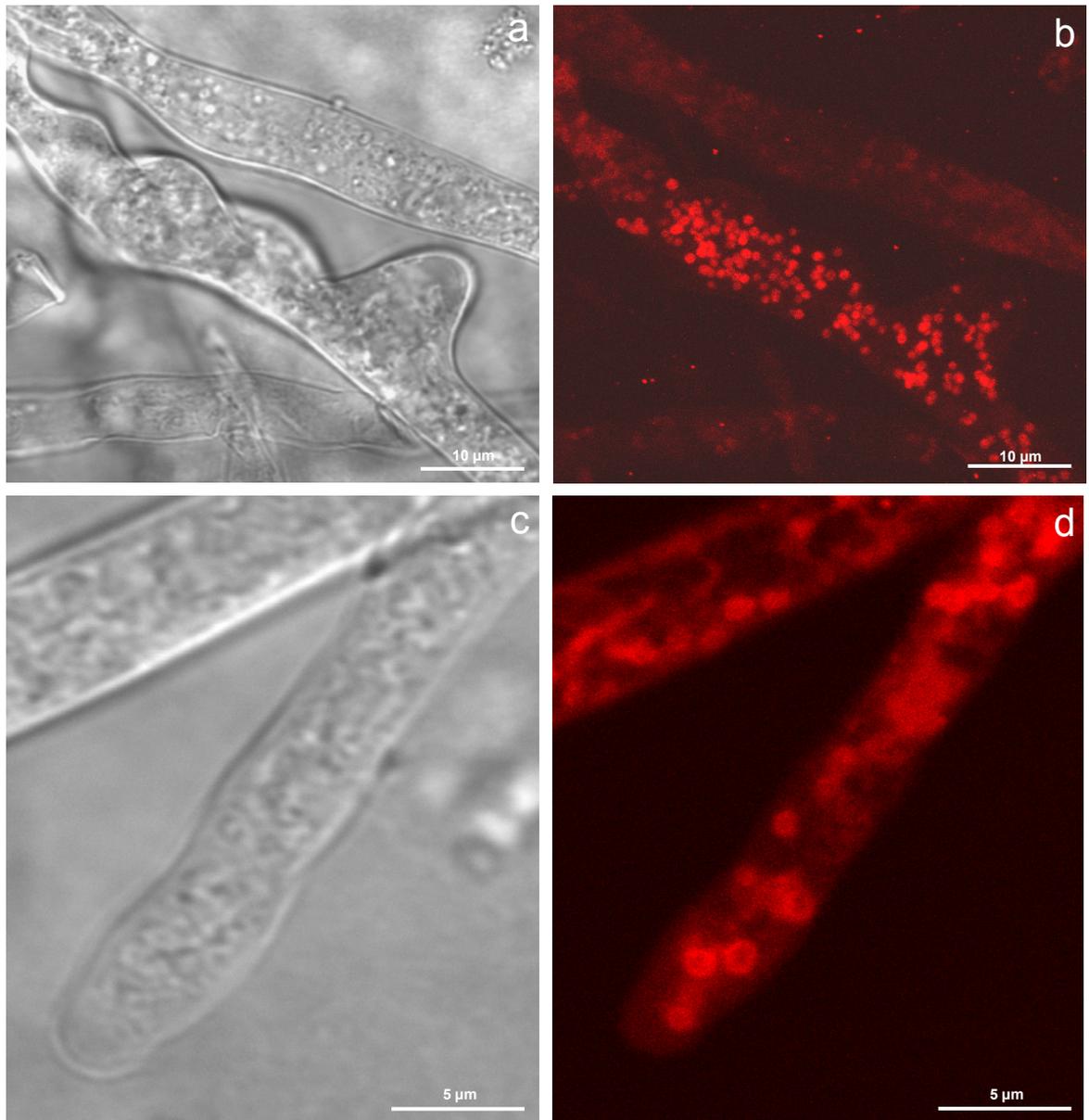


Bild 30: Markierung der Mikrotubuli in den Hyphen von *Phytophthora infestans* mit Hilfe von Tetramethylrhodamin markiertem Tubulin nach 12-tägigem Wachstum auf 'Dimethomorph'-haltigem Agar (0,3 ppm a.i.):

- a** Hyphe mit perlschnurartiger Struktur (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß Aufnahme).
- b** Globuläre und filamentöse Mikrotubuli-Strukturen in einer Hyphe mit perlschnurartigem Aussehen (dreidimensional verrechnete CLSM-Fluoreszenz-Aufnahme).
- c** Neugebildete Hyphenspitze (CLSM-Transmissions-Schwarz/Weiß-Aufnahme).
- d** Globuläre und filamentöse Mikrotubuli-Strukturen in einer Hyphenspitze (CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen).

4 Diskussion

Die Kenntnis der Wirkungsmechanismen von Fungiziden bietet die Chance, sie gezielt im Rahmen eines ausgewogenen Resistenzmanagements einzusetzen. 'Iprovalicarb' ist ein fungizider Wirkstoff aus der neuen chemischen Stoffklasse der Aminosäureamidcarbamate, wobei es sich bei der Aminosäure um Valin handelt. Der Wirkstoff findet Anwendung bei der Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten, die durch Oomyceten hervorgerufen werden. Ein Schwerpunkt liegt in der Anwendung gegen den Erreger des Falschen Mehltaus an Weinreben, der durch *Plasmopara viticola* verursacht wird. Darüber hinaus wird neben anderen Gattungen der Familie *Peronosporaceae* (*Peronospora spp.* und *Pseudoperonospora spp.*) auch *Phytophthora infestans* aus der Familie der *Pythiaceae* wirksam unterdrückt (DUTZMANN 1999). Eine Wirkung gegen *Pythium*-Arten wurde nicht beobachtet (STENZEL *et al.* 1998). Der Wirkstoff wird systemisch im apoplastischen Raum in der Pflanze verteilt (STÜBLER *et al.* 1999). 'Iprovalicarb' hat ein hervorragendes toxikologisches und ökologisches Profil, wird rasch metabolisiert und ist ungefährlich gegenüber Nützlingen (TIEMANN & PFLÜGER 1999, ANDERSON 1999). Ein direkter Einfluß von 'Iprovalicarb' auf die Respiration sowie den Nukleinsäure- und Lipidstoffwechsel von *Phytophthora infestans* wurde von STENZEL *et al.* (1998) nicht beschrieben.

'Iprovalicarb' besaß nach protektiver Applikation (< 10 ppm a.i.) einen deutlich reduzierenden Einfluß auf die Ausprägung von Schadsymptomen durch *Phytophthora infestans* an Tomatenpflanzen. Kurative Behandlungen (< 10 ppm a.i.) bis 10 Stunden nach der Inokulation unterdrückten die Ausbreitung des Pathogens, so dass die Blätter wenige Befallssymptome zeigten. Behandlungen, die zu späteren Zeitpunkten nach der Inokulation durchgeführt wurden, zeigten eine geringere Wirkung auf die Pilzentwicklung, die möglicherweise auf eine Verlagerung des Wirkstoffes im Blattgewebe und dem damit verbundenen Verdünnungseffekt zurückzuführen ist.

Für frühe Entwicklungsstadien von *Phytophthora infestans* war die Wahl des Kulturmediums in *in vitro*-Untersuchungen von Bedeutung. Zoosporen, die in demineralisiertem Wasser keimten, zeigten die niedrigste Keimungsrate. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit denen von BROEMBSSEN & DEACON (1996), die zeigten, dass eine Zoosporensuspension von *Phytophthora parasitica* mit destilliertem Wasser im Vergleich zu Leitungswasser eine Abnahme der Keimungsrate zur Folge hatte. Vorliegende Untersuchungen ergaben, dass eine wesentlich höhere Keimungsrate bei Zoosporen beobachtet wurde, die sich in Ringerlösung, einem isotonischen Kulturmedium, entwickelten. Ringerlösung enthält u.a. Calciumchlorid, wobei Calcium nach BROEMBSSEN & DEACON (1997) verschiedene Entwicklungsstadien von Zoosporen von *Phytophthora parasitica* beeinflusste. Sie beschreiben, dass die

Freilassung der Zoosporen aus Sporangien bei niedrigen Calciumkonzentrationen unterdrückt wurde, während die mobile Phase der Zoosporen verkürzt und die Encystierung und Keimung stimuliert wurde. Damit könnte man den stimulierenden Effekt der Ringerlösung auf die Keimungsrate der Zoosporen von *Phytophthora infestans* in der vorliegenden Arbeit erklären. Die Anwesenheit von Calcium bewirkt, dass die zellwandlosen, mobilen Zoosporen ihre Geißeln abwerfen, eine Zellwand aufbauen und anschließend einen Keimschlauch ausbilden.

HILL *et al.* (1998) beschrieben den Einfluß Calcium-absorbierender Substanzen auf Sporangien von *Phytophthora infestans*, der eine Veränderung der strukturellen Stabilität oder indirekt eine Veränderung intrazellulärer Prozesse zur Folge hatte. Auch REISSIG & KINNEY (1983), HAROLD & HAROLD (1986), JACKSON & HEATH (1989), DICKER & TURIAN (1990) schrieben Calcium eine wichtige Rolle bei der Regulation des Hyphenwachstums zu. ROBSON *et al.* (1991) beobachteten, dass ein Calcium-Einstrom aus dem umliegenden Medium essentiell für eine Hyphenverlängerung von *Fusarium graminearum* war. Sie führten die Bedeutung sowohl von exogen aufgenommenem als auch intrazellulärem Calcium darauf zurück, dass die Aktivität von Enzymen, die an der Synthese der Zellwand beteiligt sind, Calcium-abhängig ist.

'Iprovalicarb' wirkte sich schon in geringen Konzentrationen (0,3 ppm a.i.) hemmend auf die Keimungsrate und die Keimschlauchbildung von Zoosporen von *Phytophthora infestans* aus, die in Leitungswasser oder demineralisiertem Wasser kultiviert wurden. Entwickelten sich die Zoosporen in Ringerlösung, wurde erst bei wesentlich höheren 'Iprovalicarb'-Konzentrationen (10 ppm a.i.) ein keimungshemmender Effekt beobachtet. Das Ausbleiben der fungiziden Wirkung bei niedrigen Konzentrationen von 'Iprovalicarb' könnte durch das für den Pilz wesentlich günstigere osmotische Milieu und den stimulierenden Effekt der Ringerlösung auf den Zellwandaufbau erklärt werden. Die Tatsache, dass die fungizide Wirkung von 'Iprovalicarb' bei niedrigen Konzentrationen durch die Ringerlösung abgeschwächt wurde, könnte ein Hinweis dafür sein, dass 'Iprovalicarb' in die Zellwandstabilität eingreift.

In vitro-Untersuchungen an Keimschläuchen von *Phytophthora infestans* zeigten, dass in Gegenwart von 'Iprovalicarb' (0,5 ppm a.i.) eine Keimschlauchlänge von ca. 40 µm nicht überschritten wurde, unabhängig von der Länge des Keimschlauches zum Zeitpunkt der Fungizidapplikation. Für Zoosporen und encystierte Zoosporen von *Phytophthora palmivora* wurde gezeigt, dass sie impermeabel für Aminosäuren, Glucose und anorganische Phosphate sind und die Aufnahme dieser Metabolite erst nach Ausbildung eines Keimschlauches beobachtet wurde (PENINGTON *et al.* 1989). Dies könnte bedeuten, dass *Phytophthora infestans* erst bei einer Keimschlauchlänge von ca. 40 µm zusammen mit den Metaboliten

auch 'Iprovalicarb' aus dem umgebenden Medium aufnimmt, und erst zu diesem Zeitpunkt der fungizide Wirkstoff seine Wirkung auf die Zellwand entfalten kann. Frühere Entwicklungsstadien des Keimschlauches blieben unbeeinflusst von 'Iprovalicarb', da eine Stoffaufnahme aus dem umgebenden Medium der encystierten Zoosporen aufgrund eigener Energiereserven nicht notwendig war (BROEMSEN & DEACON 1996).

In planta-Untersuchungen zeigten, dass die fungizide Wirkung von 'Iprovalicarb' auf die Zoosporenkeimung und das Keimschlauchwachstum geringer ist als in *in vitro*-Untersuchungen. Der Pilz bildet auf Tomatenpflanzen wesentlich kürzere Keimschläuche als auf künstlichem Medium (GROHMANN & HOFFMANN 1988) und deckt wahrscheinlich seinen Nährstoffbedarf anhand gespeicherter Energievorräte aus der encystierten Zoospore (BROEMSON & DEACON 1996). SMOLKA & WOLF (1983) beschrieben ebenfalls ein Ausbleiben der hemmenden Wirkung auf den Keimungsprozess von *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* nach einer Behandlung mit den Triazolderivaten 'Bayleton' und 'Baytan'. Azole wirken hemmend auf die Sterol-Biosynthese im pilzlichen Metabolismus (BUCHENAUER 1978). COUTINHO *et al.* (1995) führten die geringe Wirkung der Triazolderivate auf den Keimungsprozess darauf zurück, dass der Pilz die notwendigen Sterole während der Initialphase der Entwicklung von den Sterolreserven aus der Konidie bezieht. Erst mit dem Penetrationsvorgang ist der Pilz gezwungen, seinen Nährstoffbedarf durch den Entzug von Stoffwechselmetaboliten aus der Pflanze zu decken. Zu diesem Zeitpunkt nimmt das Pathogen den fungiziden Wirkstoff möglicherweise erstmals verstärkt auf. Vereinzelt auftretende morphologische Veränderungen der Keimschläuche in den vorliegenden Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass der Wirkstoff mittels Diffusion auch schon von früheren Entwicklungsstadien des Pathogens aufgenommen wurde.

Die nachhaltigste Wirkung auf die Entwicklung von *Phytophthora infestans* hatte 'Iprovalicarb' in der Epidermis von Tomatenpflanzen. Der Aufbau eines intakten parasitischen Verhältnisses zwischen Pathogen und Wirtspflanzen, welches die Voraussetzung für die Nährstoffaufnahme und somit für das Überleben des ökologisch obligaten Parasiten ist (HOHL 1991, HEATH & SKALAMERA 1997), scheint unter dem Einfluß von 'Iprovalicarb' erschwert zu sein. Dem Pathogen war es nur selten möglich, unter Wirkstoffeinfluß aus der Epidermiszelle herauszuwachsen. TRIGIANO *et al.* (1984) und GROHMANN & HOFFMANN (1988) konnten zeigen, dass erst in den Epidermiszellen von 'Metalaxyl'-behandelten Pflanzen die Entwicklung von *Phytophthora*-Arten verhindert wurde. Auch 'Bayfidan' übte erst im Blattgewebe von Kaffeepflanzen eine hemmende Wirkung auf die Myzelausbreitung von *Hemileia vastatrix* aus. Der Wirkstoff verursachte ein Anschwellen der Hyphenstrukturen und ein Zerstören der Membranen und Zellwände von Infektionsstrukturen (COUTINHO *et al.* 1995).

Morphologische Veränderungen durch 'Iprovalicarb', wie das Anschwellen von pilzlichen Infektionsstrukturen und die Auflösung der Zellwand, die schon an Keimschläuchen auftraten, wurden an Hyphen von *Phytophthora infestans*, die sich im Blattgewebe entwickelten, noch deutlicher beobachtet. Dabei erschien besonders auffällig die Volumenvergrößerung der Hyphen kurz vor und nach Penetration der pflanzlichen Zellwand bei der Besiedlung des Blattgewebes. Der Prozess des apikalen Hyphenwachstums erfordert eine kontrollierte Ausdehnung der Zellwand, die anschließend so verändert werden muß, dass sie dem Turgor-Druck widersteht und die Form der Hyphe erhält (WESSELS 1993). Dies ist notwendig, da der Turgor neben den zellwanddegradierenden Enzymen die antreibende Kraft zur Penetration pflanzlicher Zellwände darstellt, durch die eine Ausbreitung des Pathogens in das Pflanzengewebe möglich ist (STRUCK *et al.* 1998). Appressorien von *Magnaporthe grisea* übten einen Turgor-Druck von acht Mega-Pascal zur Penetration der Wirtsoberfläche aus (MONEY & HOWARD 1996). In den vorliegenden Untersuchungen nahm der Druck des pilzlichen Cytoplasmas auf die Hyphenzellwand kurz vor Ausbildung der Penetrationshyphe durch die epidermale Pflanzenzellwand zu, so dass die aufgrund von 'Iprovalicarb' möglicherweise veränderte Zellwandstruktur diesem nachgeben mußte. Das zügig durch eine sehr dünne Penetrationshyphe nachfließende pilzliche Cytoplasma übte auf die neugebildete Hyphenzellwand wieder einen starken Druck aus, so dass diese sich ausdehnte. Die angeschwollene Struktur von den wenigen Haustorien, die in Mesophyllzellen gebildet wurden, deutet darauf hin, dass die Zellwand in ihrer Stabilität beeinträchtigt wurde.

Eine kurative Applikation mit 'Iprovalicarb' zeigte, dass eine Behandlung bis fünf Stunden nach Inokulation eine weitere Entwicklung des Pathogens verhindern konnte. Eine Behandlung zu einem späteren Zeitpunkt (10 hpi) reduzierte die pilzliche Entwicklung nur in sehr geringem Maße, da die Entwicklung des Pilzes zu weit fortgeschritten war. STÜBLER *et al.* (1999) zeigten, dass 24 Stunden nach einer Blattapplikation an Rebstöcken der 'Iprovalicarb'-Gehalt in der Blattfraktion um den Faktor größer zwei oberhalb der für eine 95 prozentige Hemmung im Blatt notwendigen Wirkstoffkonzentration lag. Da zum Zeitpunkt der Blattapplikation der Pilz aber schon bis ins Palisadenparenchym vorgedrungen war, war ein Aufhalten der Besiedlung durch den Pilz nur noch geringfügig möglich.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Wirkung von 'Iprovalicarb' in Abhängigkeit von den Applikationsbedingungen unterstützen die von STÜBLER *et al.* (1999). Sie beobachteten eine starke Abhängigkeit der Wirkstoffaufnahme von Temperatur und Feuchtigkeit (Luftfeuchte und Blattnässe). Unter mild-warmen und feuchten Bedingungen war die Aufnahme von 'Iprovalicarb' in das Pflanzengewebe verstärkt. Die Temperatur besitzt nach BAUR *et al.* (1997) einen bedeutenden Einfluß auf die Stoffbeweglichkeit in der Kutikula. Die Luftfeuchte bestimmt die Geschwindigkeit des Eintrocknens des Spritzbelags

und damit die Dauer, in der der gelöste Wirkstoff dem Konzentrationsgradienten folgend von der Pflanze durch Diffusion aufgenommen wird. In welchem Ausmaß Temperatur und Luftfeuchte die Wirkstoffaufnahme beeinflussen, hängt von den physiko-chemischen Eigenschaften des Wirkstoffes, der Grunddurchlässigkeit der Blattkutikula und der Formulierung des Wirkstoffes ab. Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass alle untersuchten Entwicklungsstadien des Pathogens wesentlich effektiver gehemmt wurden, wenn ein Antrocknen des Spritzbelags verhindert wurde. Eine Penetration in die Epidermiszelle wurde selten, während eine pilzliche Ausbreitung im Blattgewebe nicht mehr beobachtet wurde.

Die morphologischen Veränderungen der Hyphenstruktur in Tomatenpflanzen nach einer 'Iprovalicarb'-Applikation wurden anhand von *in vitro*-Experimenten genauer charakterisiert. Myzel von *Phytophthora infestans*, das sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Medium entwickelt hatte, zeigte Einschnürungen der Hyphen, so dass sie das auffällige Aussehen einer Perlschnur erhielten. Vergleichende Untersuchungen mit 'Dimethomorph' zeigten ebenfalls ein perlschnurartiges Aussehen der Hyphen, wie es KUHN *et al.* (1991) beschrieben. In Wachstumszonen von *Phytophthora infestans* beobachteten sie anormale Einwüchse der Zellwand, durch die es vereinzelt zur Bildung von falschen Septen kam. Die Lage der falschen Septen stimmte bei *Phytophthora infestans*, *Phytophthora erythroseptica* und *Phytophthora cactorum* mit den Einschnürungsstellen der Hyphen überein, die dem Myzel ein perlschnurartiges Aussehen verliehen. Auch ALI & REDDY (2000) beschrieben die Entstehung von vielen kondensierten, kürzeren und dickeren Zellen, die dem Myzel von *Phytophthora infestans* das Aussehen einer Perlenkette nach der Behandlung mit synthetischen Proteinen verliehen. Dabei handelte es sich unter anderem um Cecropine (CAVALLERIN *et al.* 1998) und Magainine (ZASLOFF 1987), die, wie 'Iprovalicarb', Valin-Reste besitzen. Cecropine sind in Bakterien möglicherweise für eine Veränderung der Membranintegrität verantwortlich (SHAI 1995), wodurch es zu einem Austreten von Cytoplasma und anschließendem Zelltod kommt (LOCKEY & OURTH 1996). Auch die Magainine verändern die Membran-Funktionen, wodurch die osmotische Balance des Organismus gestört wird (ZASLOFF 1987).

Das Auftreten von charakteristischen Hyphenanomalien durch Fungizidwirkung findet häufig seine Ursache in einer veränderten Zellwandstruktur (GROHMANN & HOFFMANN 1982, KUHN *et al.* 1991). 'Metalaxyl' verursacht bei verschiedenen *Phytophthora*-Arten eine Verminderung des Längenwachstums, eine Förderung des Breitenwachstums und eine Verstärkung der Zellwände (GROHMANN & HOFFMANN 1982). Prozesse der Zellwandbildung werden dabei weniger berührt, erfahren eher eine relative Intensivierung, die zu den beschriebenen Wandverdickungen führen. Möglicherweise sind die morphologischen Wachstumsanomalien auf eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den einzelnen

Wachstumsreaktionen zurückzuführen. Ein Grund dafür könnte die hemmende Wirkung von 'Metalaxyl' auf die ribosomale RNA-Synthese sein, die unter anderem von DAVIDSE *et al.* (1983) beschrieben wurde.

Für *Fusarium culmorum* wurde nach einer 'Tebuconazol'-Behandlung ein unregelmäßiges Anschwellen von Hyphen, deren starke Verzweigung und eine Zunahme der Zellwanddicke beobachtet (KANG *et al.* 2001). 'Tebuconazol' greift in den pilzlichen Metabolismus hauptsächlich durch die Hemmung der Ergosterol-Biosynthese ein (HEWITT 1998). Sterole sind Bestandteile der Membranen, deren Abnahme bzw. Akkumulation ihrer Intermediate durch eine Azolbehandlung in einer Zerstörung der Membranfunktionen resultiert. BUCHENAUER (1987) und FULLER *et al.* (1990) beobachteten nach einer Sterolbehandlung die Aktivierung der Chitin- und β -1,3-Glukan-Synthese, wodurch die Hyphenzellwände unregelmäßig verdickt wurden und die Hyphen ein anormales Wachstum zeigten.

DERCKS & BUCHENAUER (1987) beschrieben nach einer 'Aluminiumfosetyl'-Behandlung das Auftreten von verdickten Hyphenspitzen und ein Knoten-ähnliches Anschwellen entlang der Hyphen von *Phytophthora cactorum* und *Phytophthora capsici*, jedoch nicht für *Phytophthora infestans*. Für *Phytophthora cactorum* konnte eine Veränderung der Ionen-Austritte aufgrund einer veränderten Membranpermeabilität festgestellt werden. Bei beiden sensitiven *Phytophthora*-Arten wurde zusätzlich ein verstärkter Einbau von Glucose in die Cellulose-Zellwand-Fraktion beobachtet. Die Autoren führen die fungizide Wirkung auf einen Eingriff in physiologische Prozesse zurück, die entweder direkt oder indirekt an der Membran-Funktion und Zellwandsynthese beteiligt sind.

Eine morphologische Veränderung der Zellwand aufgrund einer Fungizidwirkung bedeutet jedoch nicht, dass die Zellwand das primäre Target darstellt. Oomyceten werden taxonomisch in das Reich der Chromista eingegliedert und unterscheiden sich damit von den Echten Pilzen (Fungi) und Pflanzen (BEAKES *et al.* 1998, CAVALIER-SMITH 1997). Die Eingliederung erfolgte aufgrund molekulargenetischer Untersuchungen sowie biochemischer und struktureller Charakteristika, wozu auch die Zusammensetzung der Zellwand zählt. Die Hauptbestandteile der Zellwand von *Phytophthora infestans* sind β -gebundene Glucose-Polymere (unter anderem Cellulose), die sowohl als lange Mikrofibrillen, als auch als amorphes Material vorliegen können (BARTNICKI-GARCIA & WANG 1983). Weiterhin sind in geringen Mengen Proteine, Lipide und andere Polysaccharide (unter anderem Mannose und Glucosamine) an ihrem Aufbau beteiligt. Die Zellwandstärke, -struktur und Anzahl der Schichten verändert sich während des Lebenszyklus von *Phytophthora infestans*. Während Zoosporen nur von einer Plasmamembran umgeben sind und keine Zellwand besitzen, sind Oosporen von einer mehrschichtigen Zellwand umlagert. FREYTAG & MENDGEN (1991),

LAPEYRIE & MENDGEN (1993) und HARDHAM (1985) nutzten den spezifischen Nachweis von Monosacchariden durch Lectine, der auch in der vorliegenden Arbeit die histochemische Differenzierung der Zellwand von *Phytophthora infestans* in einzelnen Entwicklungsstadien ermöglichte.

Mobile und encystierte Zoosporen sowie Myzel ließen sich mit Hilfe des Lectins Concanavalin A, das an α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin mit abnehmender Spezifität bindet, markieren. In Zoosporen und Myzel ließ sich weder Galaktose noch Chitin nachweisen. Lediglich in den Zellwänden neugebildeter Keimschläuche bis hin zum Septum war die Markierung von Chitin und in äußerst geringen Mengen von Galaktose möglich. HOHL und BALSIGER (1986) bestätigten in ihren Untersuchungen, dass Concanavalin A an Keimschläuche verschiedener *Phytophthora*-Arten bindet. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Sporangien von einer zweifachen Schicht umlagert, die sich mit Hilfe von Concanavalin A und Agglutinin RCA₁₂₀, das an Galaktose bindet, darstellen ließ. In den Keimschläuchen von Sporangien ließen sich α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin sowie Galaktose nachweisen.

Den deutlichsten Einfluß zeigte 'Iprovalicarb' auf die Anfärbbarkeit von α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin mit Hilfe von Concanavalin A in den Zellwänden von Keimschläuchen und Myzel. Die Veränderungen äußerten sich dadurch, dass die Zucker nicht mehr als geschlossene Schicht um das Pilzinnere sichtbar waren bzw. eine Markierung in diesem Bereich nur noch schwach möglich war.

Auch die Markierung von Polysacchariden in den Zellwänden von Keimschläuchen und Hyphen wurde durch eine 'Iprovalicarb'-Behandlung verändert. Während sich der Farbstoff in der unbehandelten Variante gleichmäßig und homogen um das Hyphenlumen anlagerte, erfolgte unter 'Iprovalicarb'-Einfluß eine schwächere bzw. nicht vollständige Anlagerung des Farbstoffes im Bereich der Zellwand. Die partielle Lyse der Zellwand und die damit häufig beobachtete Akkumulation der Fluoreszenzfarbstoffe im Hyphenlumen deutet jedoch darauf hin, dass die Zellwand in ihrer Integrität durch 'Iprovalicarb' sehr stark beeinträchtigt wurde. Anhand dieser Untersuchungen kann aber keine Aussage gemacht werden, inwieweit 'Iprovalicarb' in die Synthese dieser Zucker eingreift.

Der direkte Cellulosenachweis in den Zellwänden von *Phytophthora infestans* erfolgte mit Hilfe der Enzym-Gold-Markierung. Bei dem Enzym handelt es sich um eine 1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glukan-4-Glukano-Hydrolase von *Trichoderma reesei*, die an das Ende einer Cellulose-Glukan-Kette bindet (TEERI *et al.* 1997; WARREN 1997). Die spezifische Markierungsdichte für Cellulose war an Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten, um

18 % höher im Vergleich zu der der unbehandelten Kontrolle. Vereinzelt wurde in einigen Zellwandbereichen der 'Iprovalicarb'-Variante eine Akkumulation der Goldpartikel beobachtet. An diesen Hyphenquerschnitten traten zusätzlich Ausstülpungen der äußeren Zellwandschicht auf, von denen sich Vesikel abtrennten. Hyphen, die sich auf Fungizid-freiem Agar entwickelt hatten, lagerten die Goldpartikel regelmäßiger im Bereich der Zellwand an und hatten eine deutliche, plane Abschlusschicht gebildet. Dieses Ergebnis zeigt, dass 'Iprovalicarb' aufgrund der höheren spezifischen Markierungsdichte für Cellulose keinen inhibierenden Einfluß auf die Cellulose-Synthese besitzt, sondern einen stimulierenden Effekt auf diese ausübt. Die verstärkte Akkumulation der Goldpartikel in einigen Zellwandbereichen und die im Gesamtbild unregelmäßigere Anlagerung der Goldpartikel nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung deuten darauf hin, dass die Anordnung der Cellulose-Mikrofibrillen in der Zellwand gestört ist.

Weiterhin wurde eine Zunahme der Zellwandstärke von Hyphen, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' entwickelten, beobachtet. Dadurch war die absolute Markierungsdichte für Cellulose über die Gesamtfläche der Zellwand deutlich höher im Vergleich zu der von unbehandeltem Myzel. Eine Zunahme der Zellwandstärke aufgrund einer Fungizidwirkung wurde auch schon von anderen Autoren beschrieben, die die Ursache dafür häufig in einer intensiven Akkumulation von Glukanen in der Zellwand sehen (KANG *et al.* 2001, DERCKX & BUCHENAUER 1987, JIANG & GROSSMANN 1991 und GROHMANN & HOFFMANN 1982).

FÈVRE *et al.* (1990) beschrieben, dass nach einer Kongorot-Behandlung die Hyphen von *Saprolegnia* verdickte Zellwände aufwiesen. Kongorot verhinderte die Kristallisation der Glukan-Ketten zu Mikrofibrillen in *Acetobacter* (HAIGLER & BENZIMAN 1982) und in Algen (QUADER *et al.* 1983). FÈVRE *et al.* (1990) beschrieben, dass Kongorot-behandelte Hyphen verschiedene Kristallisationszustände der Cellulose aufwiesen. Sie beobachteten, dass kurze Mikrofibrillen in amorphem Material eingebettet waren, während in verdickten Zellwänden die Cellulose-Fraktion in einem amorphen Zustand vorlag. NODET *et al.* (1986) postulierten, dass in Gegenwart von Kongorot die Cellulose ihre charakteristische mikrofibrilläre Organisation verliert, stattdessen aber in signifikant höheren Mengen ohne jegliche Struktur synthetisiert wird.

Möglicherweise verursacht 'Iprovalicarb' ähnliche Veränderungen wie Kongorot in der Zellwandstruktur. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die Zellwandstärke nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung deutlich zunahm und aufgrund der erhöhten Markierungsdichte für Cellulose die Cellulose-Synthese durch 'Iprovalicarb' stimuliert wurde. Da die Zellwand nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung deutlich an Stabilität und Starrheit verloren hatte, schien die Architektur der Cellulose-Mikrofibrillen verändert zu sein. Dies könnte darauf zurückzuführen

sein, dass nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung mehrere kürzere Cellulose-Mikrofibrillen gebildet werden, die der Zellwand nicht dieselbe Stabilität verleihen wie lange Cellulose-Mikrofibrillen in der unbehandelten Variante. Zusätzlich könnte nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung auch die charakteristische mikrofibrilläre Struktur der kürzeren Cellulose-Fibrillen gestört sein. Dies würde bedeuten, dass die Cellulose-Mikrofibrillen aufgrund der fehlenden Vernetzung nicht in der Lage sind, ein stabiles Gerüst aufzubauen, das der Zellwand die notwendige Starrheit verleiht. Ein weiterer Grund für die erhöhte Elastizität der Zellwand könnte sein, dass die Polymere, die eine Verbindung zwischen den einzelnen Mikrofibrillen herstellen, eine höhere Viskosität besitzen. Möglicherweise handelt es sich bei den beobachteten Ausstülpungen und abgetrennten Vesikeln um Polymere, die aufgrund einer fehlenden Vernetzung mit den Cellulose-Mikrofibrillen nicht in die Zellwandstruktur eingeordnet werden können. Das deutet darauf hin, dass durch einen veränderten Kristallisationszustand der Cellulose-Mikrofibrillen und möglicherweise durch die Bildung von kürzeren Cellulose-Mikrofibrillen, die Stabilität der Zellwand deutlich verringert wird und durch deren erhöhte Elastizität Hyphenstrukturen ein angeschwollenes Aussehen zeigen können.

Die Bestandteile der Zellwand von Oomyceten, vor allem Cellulose, und deren Anordnung als Mikrofibrillen, zeigen Parallelitäten zur denen in Pflanzenzellen. In pflanzlichen Zellen schreibt man dem Cytoskelett, vor allem den Mikrotubuli, eine bedeutende Rolle bei der Ausrichtung der Cellulose-Mikrofibrillen in der Zellwand zu (DELMER 1987, SEAGULL 1990, WILLIAMSON 1991, CYR & PALEVITZ 1995, WYMER & LLYOD 1996, FISHER & CYR, 1998). Dies führt man darauf zurück, dass durch eine Behandlung der kortikalen Mikrotubuli mit Colchizin, einer Mikrotubuli-zerstörenden Chemikalie, eine geordnete Auflagerung der Cellulose-Mikrofibrillen nicht mehr möglich war (MOREJOHN 1991). Die Cytoskelett-Proteine wie Tubulin und Actin erscheinen als polymerisierte, lineare Elemente innerhalb der Zelle (KOBAYASHI *et al.* 1991). Ihr Vorkommen konnte in tierischen (HARTWIG & SHELVIN 1986, HEUSER & KIRCHNER 1980), pflanzlichen und pilzlichen Zellen nachgewiesen werden (HOCH *et al.* 1986, STEIGER & SCHLIWA 1987, KANBE *et al.* 1989). Bisher ist jedoch noch nicht bekannt, wie kortikale Mikrotubuli die Ausrichtung von Cellulose-Mikrofibrillen beeinflussen (FISHER & CYR 1998).

Die meisten Polysaccharide, die für den Aufbau der pflanzlichen Zellwand benötigt werden, werden im Golgi-Apparat produziert und durch Exocytose sezerniert (MARAS *et al.* 1997). Im Gegensatz dazu wird Cellulose erst in der Plasmamembran von einem Enzymkomplex, der Cellulose-Synthase, hergestellt (CHRISPEELS 1976, DELMER 1977, MACLACHLAN 1977). Dieser Enzymkomplex bildet rosettenartige Strukturen in der Plasmamembran (HERTH 1985, KIMURA *et al.* 1999), der mit einem Ende der Cellulose-Mikrofibrille verbunden ist (MUELLER & BROWN 1980, GIDDINGS *et al.* 1980, MUELLER & BROWN 1982, BROWN

1996). Die Orientierung neuer Mikrofibrillen wird durch die Bewegung der Cellulose-Synthase-Rosetten in der Plasmamembran kontrolliert (MUELLER & BROWN 1982, TAYLER *et al.* 2000). Die Richtung, in die sich die Cellulose-Synthase-Rosetten bewegen, könnte auf Mikrotubuli-begrenzte Bahnen in der Plasmamembran beschränkt sein, die die Bewegung der Synthase-Komplexe auf einer parallelen Achse erlauben (MUELLER & BROWN 1982, DELMER 1987, FISHER & CYR 1998). Eine andere Hypothese beschreibt, dass ein Rezeptor in der Plasmamembran die kortikalen Mikrotubuli mit den Cellulose-Mikrofibrillen verbindet (MUELLER & BROWN 1982, WYMER & LLOYD, 1996).

Auch in pilzlichen Zellen wurde von GROHMANN & HOFFMANN (1982) beschrieben, dass Zellwandbestandteile und Enzyme, die im Golgi-Apparat gebildet wurden, an den Mikrotubuli zur Hyphenspitze transportiert werden. Weiterhin ist bekannt, dass das Cytoskelett in verschiedene Stadien des Zellzyklus involviert ist (JELKE *et al.* 1987, TIMONEN *et al.* 1993, ASTRÖM 1994). Es ist für den polaren Aufbau des Cytoplasmas verantwortlich (GROHMANN & HOFFMANN 1982), besitzt eine wichtige Rolle bei Infektionsprozessen in Zoosporen (HARDHAM 1987) und ist an der Signaltransduktion, Transportprozessen und Organellenbewegung beteiligt (TIMONEN *et al.* 1993, JELKE *et al.* 1987).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Mikrotubuli in Hyphen von *Phytophthora infestans* als globuläre Strukturen auftraten, die durch filamentöse zu einem maschenartigen Netz verbunden waren. Möglicherweise stellen die globulären Strukturen eine direkte Verbindung zwischen der Plasmamembran und den filamentösen Mikrotubuli-Strukturen dar. Damit würden sie, wie in der pflanzlichen Plasmamembran beschrieben, eine gerichtete Bewegung der stets wandernden Cellulose-Synthase in der Plasmamembran vorgeben und die Ausrichtung der neu synthetisierten Cellulose-Mikrofibrillen kontrollieren. Durch eine 'Iprovalicarb'-Behandlung wurde die Anordnung der Mikrotubuli-Elemente in der pilzlichen Zelle dahingehend verändert, dass überwiegend dickere und längere Mikrotubuli-Filamente gebildet wurden, während globuläre Strukturen nicht mehr sichtbar waren. Dies würde bedeuten, dass die Verbindung zwischen den filamentösen Mikrotubuli und der Plasmamembran unterbrochen ist und damit die Kontrollfunktion der Mikrotubuli auf die Ausrichtung der neugebildeten Cellulose-Mikrofibrillen. In der Literatur wurden bereits Fungizide beschrieben, die eine Wirkung auf die Mikrotubuli besitzen. Es handelt sich dabei um 'Nocodazol' (NIINI & RAUDASKOSKI 1993, TEMPERLI *et al.* 1991) und 'Benomyl' (PEDREGOSA *et al.* 1995). Für diese Wirkstoffe wurde jedoch kein Einfluß auf die Anordnung der Mikrotubuli beschrieben, sondern eine depolymerisierende Wirkung, so dass die pilzliche Zelle nicht mehr in der Lage war, aus Tubulin-Untereinheiten Mikrotubuli aufzubauen. PEDREGOSA *et al.* (1995) vermuteten, dass durch die Zerstörung der Mikrotubuli der gerichtete Transport von Vesikeln, die Zellwandbausteine enthalten, beeinträchtigt wurde. Damit könnte eine Ver

änderung der Zellwandstruktur und deren Zusammensetzung verbunden sein. Möglicherweise beeinträchtigte 'Iprovalicarb' durch die Strukturveränderung der Mikrotubuli ebenfalls den gerichteten Vesikel-Transport. Dadurch könnten Proteine, die zum Beispiel eine vernetzende Funktion zwischen den einzelnen Cellulose-Mikrofibrillen besitzen, nicht an ihren Bestimmungsort gelangen. Dies würde zu einer veränderten Zellwandstruktur führen.

Weitere wichtige Proteine des Cytoskeletts sind die Actin-Elemente, denen beim Spitzenwachstum von pflanzlichen und pilzlichen Zellen eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird (WESSELS 1993, HEATH & HEROLD 1992, HEATH 2000). Sie erscheinen als feine Filamente, die das Cytoplasma durchziehen, bis hin zu größeren (patches) und kleineren (plaques) Ansammlungen dieser Proteine, die mit der apicalen Plasmamembran in Kontakt stehen (TEMPERLI *et al.* 1990, ASTRÖM *et al.* 1994, GEITMANN & EMONS 2000). ASTRÖM *et al.* (1994) und TEMPERLI *et al.* (1990) gingen davon aus, dass es sich bei den plaques um Vesikel, sogenannte Filasome, handelt, die mit den Actin-Filamenten verbunden sind. Die Aufgaben der Actin-Elemente in der Zelle sind die Regulation der Exocytose und die Ausdehnung wachsender Strukturen (HEATH & HAROLD 1992, LICHTSCHEIDL 2000). Diese Erkenntnis basiert auf Untersuchungen, die zeigten, dass nach einer Zerstörung der Actin-Elemente in verschiedenen Zellen ein Anschwellen von Hyphenspitzen und Deformationen beobachtet wurden. Weitere wichtige Funktionen des Actins sind die Anordnung des Endoplasmatischen Retikulums und die Ausrichtung von Zellwand-Fibrillen (BUCHEN 2000, KATSAROS 2000). Die Beteiligung von Actin-Filamenten an dem Vesikeltransport mit Zellwandbestandteilen zur Hyphenspitze wurde auch von TEMPERLI *et al.* (1991) beschrieben.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Actin in Hyphen von *Phytophthora infestans* wie von TEMPERLI *et al.* (1990), ASTRÖM *et al.* (1994) und HEATH & GEITMANN (2000) beschrieben, sowohl als filamentöse, als auch als globuläre Strukturen auftrat. Häufig wurde beobachtet, dass die filamentösen Strukturen eine Verbindung zwischen den globulären Elementen darstellten, die auch von TEMPERLI *et al.* (1990) beschrieben wurde. Möglicherweise stellen die globulären Strukturen eine direkte Verbindung zwischen der Plasmamembran und den filamentösen Actin-Elementen her. Das könnte die Vermutung unterstützen, dass die Actin-Elemente neben den Mikrotubuli-Elementen einen Einfluß auf die Cellulose-Mikrofibrillen in der Zellwand haben. Hyphen von *Phytophthora infestans*, die sich in Gegenwart von 'Iprovalicarb' entwickelten, zeigten eine veränderte Anordnung der Actin-Strukturen. Anstelle von globulären Actin-Strukturen wurde nur noch das Auftreten von kurzen, verdickten Strukturen beobachtet, die nicht in Verbindung standen. Der Kontakt zwischen der Plasmamembran und den filamentösen Actin-Strukturen schien unterbrochen zu sein, und damit auch eine mögliche Regulation auf die Anordnung der Cellulosefibrillen. In Hyphen, die nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung partielle Anschwellungen zeig

ten, war die Markierung von Actin-Elementen nicht mehr möglich. In tierischen Systemen konnte eine Verbindung zwischen Apoptosis und der Schädigung des Actin-Cytoskeletts gezeigt werden (MASHIMA 1997, DEMEESTER *et al.* 1998). Die völlig unkontrollierte Auflagerung neugebildeter Cellulose-Mikrofibrillen und der damit verbundene Stabilitätsverlust der Zellwand der vorliegenden Arbeit könnten eine Erklärung für das Anschwellen der Hyphen sein.

Die Wirkung von 'Iprovalicarb' in *in vitro*-Untersuchungen wurde mit der von anderen Oomycetenfungiziden verglichen. *In vitro* besitzen die meisten eher einen hemmenden Effekt auf das Myzelwachstum und die Sporulation als auf die Sporenkeimung. 'Fluazinam' mit seiner Hauptwirkung auf die Zoosporenfreilassung und Keimung (ANEMA *et al.* 1992) und die Strobilurin Analoga BAS490F und ICIA5044 mit ihrer starken Wirkung auf die Sporangien- und Zoosporenkeimung (AMMERMANN *et al.* 1992, GODWIN *et al.* 1992) stellen eine Ausnahme dar. Die *in vitro*-Wirkung von 'Propamocarb' auf das Myzelwachstum vieler *Pythiaceae* wird als sehr schwach angesehen, während die Substanz eine gute *in planta*-Wirkung besitzt (REICH *et al.* 1994). Neben 'Dimethomorph' und 'Azoxystrobin' zeigte 'Iprovalicarb' in den vorliegenden Untersuchungen eine sehr gute *in vitro*-Wirkung im Vergleich zu 'Propamocarb' und 'Metalaxyl'.

'Propamocarb' aus der chemischen Stoffklasse der Carbamate wird zur Bekämpfung von Wurzel- und Stengelkrankheiten, die durch *Pythium*- und *Phytophthora*-Arten verursacht werden, eingesetzt. 'Propamocarb' zeigte nur einen sehr schwachen Einfluß auf die Zoosporenkeimung und das radiale Myzelwachstum von *Phytophthora infestans*. Eine deutliche Beeinträchtigung sowohl der Zoosporenkeimung als auch des Myzelwachstums wurde erst bei Einwirkung hoher Wirkstoffkonzentrationen (> 500 ppm a.i.) erzielt. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Untersuchungen von RAPP & RICHTER (1982) und REITER *et al.* (1995a und 1995b). 'Propamocarb' wirkt auf das Myzelwachstum eher fungistatisch als fungizid. Das pilzliche Wachstum wird unter Fungizideinfluß nur reversibel gehemmt (KAARS SIJPE-STEIJN *et al.* 1974).

'Propamocarb' besitzt eine primäre Wirkung auf den pilzlichen Lipidstoffwechsel und damit auf den Aufbau von Membranen (PAPAVIZAS *et al.* 1978, REICH 1994). Die Hemmung der Phospholipidsynthese ist von wesentlicher Bedeutung für die Struktur und Funktionsfähigkeit der pilzlichen Membranen (BOWMAN & MUMMA 1967, HENDRIX & ROUSER 1976) und führt zu umfangreichen physiologischen Störungen, die sich nachteilig auf das Wachstum und die Entwicklung des Pathogens auswirken. Die Beeinträchtigung der Phospholipidsynthese erklärt die selektive Wirkung von 'Propamocarb' auf Entwicklungsstadien von *Phytophthora infestans*, in denen eine *de novo*-Synthese von Membranen erforderlich ist (REITER

et al. 1995b). Durch eine Veränderung der Membrankomponenten des Pathogens könnte die Sekretion von extrazellulären Enzymen, die für die Degradation von Wirtszellwänden benötigt wurden (BODENMANN *et al.* 1985, FÖRSTER & RACHED 1985), verändert werden und damit die Aufnahme von Nährstoffen aus der Wirtszelle.

'Metalaxyl' gehört zu der chemischen Stoffklasse der Phenylamide und wird zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten eingesetzt, die durch Oomyceten hervorgerufen werden. In den vorliegenden Ergebnissen wurde gezeigt, dass 'Metalaxyl' in *in vitro*-Untersuchungen einen sehr geringen Effekt auf die Zoosporenkeimung (> 100 ppm a.i.) besaß und erst bei einer Konzentration von 10 ppm a.i. das radiale Myzelwachstum von *Phytophthora infestans* beeinträchtigte. *In vitro*-Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkungsweise von 'Metalaxyl', 'Furalaxyl' und 'Ofurace' gegenüber *Pythium ultimum*, *Phytophthora nicotianae* und *Phytophthora palmivora* von FISHER & HAYES (1982) ergaben, dass die Fungizide eine hemmende Wirkung auf das radiale Myzelwachstum, aber nicht auf die Keimung von Sporangien und Zoosporen besaßen. In zahlreichen Arbeiten (BENSON 1979, STAUB *et al.* 1979, GROHMANN & HOFMANN 1982, DAVIDSE *et al.* 1988) wurde jedoch die wachstumshemmende Wirkung von 'Metalaxyl' auf die Sporenkeimung und das Myzelwachstum in *in vitro*-Untersuchungen beschrieben. Die direkte Wirkung von Phenylamiden wird auf die spezifische Hemmung der ribosomalen RNA-Polymerase zurückgeführt (FISHER & HAYES 1982, GROHMANN & HOFFMANN 1982, DAVIDSE *et al.* 1983, GISI & COHEN 1996). Bei verschiedenen Pilzarten wurde nachgewiesen, dass die Proteinsynthese während der Keimung an bereits vorliegender mRNA stattfindet (LOVETT 1968, HORGAN 1971, BURKE *et al.* 1972). Das könnte eine mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt von 'Metalaxyl' als Inhibitor der RNA-Synthese bei der Encystierung und Keimung der Zoosporen von *Phytophthora infestans* sein.

Darüber hinaus beobachteten GROHMANN & HOFFMANN (1982) sowohl an *Phytophthora*- als auch an *Pythium*-Arten morphologische Veränderungen der Hyphen, die auf eine fungizide Wirkung von 'Metalaxyl' zurückzuführen sind. Sie bestanden in der Verminderung des Längenwachstums und Förderung des Breitenwachstums. Wobei die *Pythium*-Arten weniger ausgeprägt mit einer Hyphenverdickung reagierten und typische Anschwellungen nur an Hyphenenden beobachtet wurden. Weiterhin zeigten sie, dass eine Förderung des Dickenwachstums, der Verlust der apikalen Dominanz, eine Verstärkung der Zellwände und eine Veränderung der Oberflächenstruktur durch 'Metalaxyl' hervorgerufen wurden. Eine unterschiedliche 'Metalaxyl'-Sensitivität von *Pythium*- gegenüber *Phytophthora*-Arten, wobei die Gattung *Pythium* die höhere Toleranz aufwies, schien dabei quantitativ begründet zu sein.

'Azoxystrobin', ein Vertreter der Strobilurine, wird zur Bekämpfung von Getreidekrankheiten angewandt. Der Wirkstoff zeigte in den vorliegenden *in vitro*-Untersuchungen eine wirksame Hemmung der Zoosporenenkeimung und des radialen Myzelwachstums von *Phytophthora infestans* schon bei sehr niedrigen Konzentrationen (0,2 – 1 ppm a.i.). AMMERMANN *et al.* (1992) und GODWIN *et al.* (1992) beschreiben den Schwerpunkt der Wirkung von Strobilurin-Analoga bei Oomyceten auf die Sporangien- und Zoosporenenkeimung. Auch bei *Septoria tritici* erzielten niedrige 'Azoxystrobin'-Konzentrationen (0,1 – 1 ppm a.i.) eine wirksame Hemmung der Sporenenkeimung und des Myzelwachstums (ZIOGAS *et al.* 1997). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von MATHERON & PORCHAS (2000), die eine Hemmung der Zoosporenenkeimung von *Phytophthora*-Arten erst bei 'Azoxystrobin'-Konzentrationen von 256 bis 1000 ppm a.i. und eine starke Reduktion des Myzelwachstums bei 3000 ppm a.i. beobachteten. Sie führten die geringe Wirkung von 'Azoxystrobin' auf die Variabilität hinsichtlich der Fungizidsensitivität zwischen verschiedenen *Phytophthora*-Arten und Isolaten einer *Phytophthora*-Art zurück. Azoxystrobin inhibiert die mitochondriale Atmung in Pilzen, indem es den Elektronentransfer am Cytochrom bc1-Komplex blockiert (BECKER *et al.* 1981, BRANDT *et al.* 1988; BRANDT & JAGOW 1991, MANSFIELD & WIGGINS 1990).

'Dimethomorph', ein Wirkstoff der chemischen Stoffklasse der Zimtsäurederivate, wird seit 1988 als ein systemisches Fungizid gegen *Peronosporaceae* und *Phytophthora*-Arten eingesetzt (ALBERT *et al.* 1988). Gegenüber *Pythium* zeigte der Wirkstoff keine Wirkung (ALBERT *et al.* 1988, KUHN *et al.* 1989, ALBERT & HEINEN, 1995). 'Dimethomorph' wird apoplastisch in der Pflanze verteilt (ALBERT *et al.* 1988) und besitzt sowohl nach protektiver als auch kurativer Applikation eine Wirkung (ALBERT *et al.* 1988, COHEN *et al.* 1995). Es unterdrückt auch die Sporulation (ALBERT *et al.* 1988).

Der Wirkungsmechanismus konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Untersuchungen zeigten, dass 'Dimethomorph' keinen Einfluß auf die DNA-, RNA-, Protein- und Lipidsynthese sowie die mitochondriale Atmung besitzt (ALBERT *et al.* 1988, KUHN *et al.* 1990). In *in vitro*-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit besaß 'Dimethomorph' schon bei Konzentrationen kleiner als 0,5 ppm a.i. einen keimungshemmenden Effekt auf Zoosporen von *Phytophthora infestans*, während das radiale Myzelwachstum bei 1 ppm a.i. vollständig unterdrückt wurde. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen von KUHN *et al.* (1991), COHEN *et al.* (1995) und ALBERT & HEINEN (1995), die ebenfalls eine deutliche *in vitro*-Wirkung bei bereits sehr geringen 'Dimethomorph'-Konzentrationen auf *Phytophthora infestans* feststellten.

Anhand von mikroskopischen Untersuchungen wurde nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung das Auftreten von partiellen Einschnürungen der Hyphen beobachtet, die dem

Myzel ein perlschnurartiges Aussehen verliehen. Dieser charakteristische Effekt für 'Dimethomorph' wurde auch von KUHN *et al.* (1991) beschrieben. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass in einigen Hyphenbereichen die Lyse von Zellwänden auftrat, so dass Cytoplasma aus dem Hyphenlumen austreten konnte. ALBERT & HEINEN (1995) führten den Zelltod von Zoosporen, Cysten, Sporangien, Keimschläuchen und Hyphen auf eine Lyse der Keimschläuche an der Ansatzstelle des Keimschlauches an der encystierten Zoospore oder an der Hyphenspitze zurück. Weiterhin beobachteten sie eine ungleichmäßige Verzweigung von Keimschläuchen und Hyphen sowie ein anormales Dickenwachstum der Zellwände. Da 'Dimethomorph' alle Entwicklungsstadien von *Phytophthora infestans* beeinträchtigte, in denen Zellwandwachstum stattfand, schlußfolgerten sie, dass 'Dimethomorph' einen Einfluß auf Zellwand-bildende Prozesse besitzt. KUHN *et al.* (1991) postulierten nach ihren Untersuchungen, dass 'Dimethomorph' nicht in die Polymer-Synthese eingreift, sondern in die Anordnung der einzelnen Strukturen in der Zellwand.

Obwohl 'Iprovalicarb' und 'Dimethomorph' ähnliche morphologische Veränderungen an Hyphen von *Phytophthora infestans* bewirkten, konnte anhand weiterführender Untersuchungen gezeigt werden, dass sie unterschiedlich in die Struktur des Zellwandaufbaus eingreifen. 'Iprovalicarb' verursachte eine Veränderung hinsichtlich der Anfärbarkeit von Monosacchariden (α -D-Mannose, α -D-Glucose und α -D-N-Acetylglucosamin) in der Zellwand sowohl von Keimschläuchen als auch von Hyphen. In Hyphen, die sich auf Fungizid-freiem Medium entwickelt hatten, waren die Monosaccharide als homogene Schicht um das Hyphenlumen angelagert. Pilzliche Strukturen, die in Gegenwart von 'Iprovalicarb' wuchsen, wiesen in dieser Schicht Unterbrechungen auf, bzw. eine Markierung wurde nur noch sehr schwach oder nicht mehr beobachtet. Inwieweit 'Iprovalicarb' einen Einfluß auf die Monosaccharid-Synthese besitzt, konnte anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht beurteilt werden. 'Dimethomorph' zeigte keinen Effekt auf die Anfärbarkeit der Monosaccharide in den Zellwänden von *Phytophthora infestans*.

Polysaccharide, vor allem Cellulose, ließen sich anhand von histologischen Färbungen deutlich in der Zellwand als eine geschlossene Schicht um das Hyphenlumen markieren. Nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung traten Unterbrechungen in dieser Schicht auf, wie bei einer Markierung der Monosaccharide. Auch diese Untersuchungen gestatten keine Aussage hinsichtlich eines Einflusses von 'Iprovalicarb' auf die Polysaccharid-Synthese. Vielmehr deuten sie daraufhin, dass 'Iprovalicarb' einen Einfluß auf die Anordnung der Polysaccharide in der Zellwand besitzt. 'Dimethomorph' zeigte keinen Einfluß auf die Anfärbarkeit der Polysaccharide in den Zellwänden von *Phytophthora infestans*. Diese Untersuchungsergebnisse ließen den Schluß zu, dass 'Iprovalicarb' und 'Dimethomorph' unterschiedlich Einfluß nehmen auf Zellwand-bildende Prozesse.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Enzymgold-Markierung der Cellulose in den Zellwänden von Hyphen von *Phytophthora infestans* durchgeführt, um eine quantitative Aussage hinsichtlich des Cellulosegehalts treffen zu können. Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten, besaßen eine höhere spezifische Markierungsdichte für Cellulose in den Zellwänden. Vereinzelt wurde in einigen Zellwandbereichen der 'Iprovalicarb'-Variante eine Akkumulation der Goldpartikel beobachtet. Entwickelten sich die Hyphen von *Phytophthora infestans* auf 'Dimethomorph'-haltigem Agar, war die spezifische Markierungsdichte für Cellulose nicht erhöht im Vergleich zu der der unbehandelten Variante. Eine Akkumulation der Goldpartikel in dem Maße wie bei der 'Iprovalicarb'-Variante wurde an Hyphen, die sich auf 'Dimethomorph'-haltigem Agar entwickelt hatten, nicht beobachtet. Ausstülpungen der äußeren Zellwandschicht, sowie das Abschnüren von Vesikeln, die nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung auftraten, wurden ebenfalls nicht nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung beobachtet.

Beide Fungizide bewirkten eine Zunahme der Zellwandstärke, wodurch auch der Gesamtgehalt an Cellulose anstieg. KUHN *et al.* (1991) und ALBERT & HEINEN (1995) beobachteten ebenfalls eine Zunahme der Zellwandstärke an Hyphen, die sich in Gegenwart von 'Dimethomorph' entwickelt hatten. Inwieweit beide Fungizide eine ähnliche Förderung der Cellulose-Synthese bewirkten, deren Kristallisation aber beeinträchtigten, kann anhand der vorliegenden Untersuchungen nicht gezeigt werden.

Sowohl 'Iprovalicarb' (STENZEL *et al.* 1998) als auch 'Dimethomorph' (ALBERT *et al.* 1988) zeigten keine fungizide Wirkung auf *Pythium*-Arten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellwand von *Pythium* aus anderen Bestandteilen aufgebaut ist, da neben Cellulose auch Chitin nachgewiesen wurde (CHRIF *et al.* 1992).

'Iprovalicarb' besaß einen erheblichen Einfluß auf die Cytoskelettelemente in der pilzlichen Zellwand, 'Dimethomorph' zeigte jedoch keine Auswirkungen auf diese Strukturen. Sowohl für Mikrotubuli (FISHER & CYR 1998) als auch für Actin (KATSAROS 2000) wurde eine bedeutende Rolle bei der Ausrichtung der Cellulosefibrillen in der Zellwand von Pflanzen beschrieben. Nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung wurde weder ein Einfluß auf das Cytoskelett noch auf die Zellwandstruktur beobachtet, so dass die fungizide Wirkung von 'Dimethomorph' auf andere physiologische Prozesse zurückzuführen ist.

Für eine Reihe von Fungiziden wurde eine Auswirkung auf die pilzliche Zellwand beschrieben. Dazu gehören unter anderem 'Metalaxyl' (GROHMANN & HOFFMANN 1982), 'Tebucnazol' (KANG *et al.* 2001) und 'Aluminiumfosetyl' (DERCKX & BUCHENAUER 1987). Wei

terführende Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich bei der Veränderung der Zellwand um eine Folgeerscheinung der Wirkung und nicht um das primäre Target handelte.

Vermutlich stellt die Zellwand von *Phytophthora infestans* auch nicht das primäre Target von 'Iprovalicarb' dar, sondern verändert sich aufgrund der Wirkung auf die Cytoskelettelemente. 'Benomyl' besitzt auch eine fungizide Wirkung auf die Mikrotubuli, die möglicherweise den gerichteten Vesikeltransport und damit die Bereitstellung von Zellwandbausteinen beeinträchtigt (PEDREGOSA *et al.* 1995). Nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung konnte gezeigt werden, dass die Zellwandstärke deutlich zunahm, verbunden mit einem erhöhten Cellulosegehalt. Dennoch verlor die Zellwand an Stabilität. Die Ursache für die Beeinträchtigung der Zellwandstruktur durch 'Iprovalicarb' konnte noch nicht genau geklärt werden. Die Veränderung der Cytoskelettelemente weisen jedoch darauf hin, dass physiologische Prozesse, die beim Zellwandaufbau eine Rolle spielen, verändert werden.

Damit erweitert 'Iprovalicarb' das Instrumentarium fungizider Wirkstoffe zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten gegenüber Oomyceten. Durch eine alternierende Anwendung von Präparaten mit unterschiedlichen Targets wird das Entstehen von Resistenzen der Pathogene gegenüber Fungiziden verzögert. Möglicherweise lassen sich von der in der Arbeit verwendeten Methoden auch neue Screening-Tests zur Entwicklung neuer Substanzen im Rahmen einer Target-orientierten Forschung ableiten.

5 Zusammenfassung

Die Wirksamkeit von 'Iprovalicarb' gegenüber *Phytophthora infestans*, dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel und der Braunfäule an Tomate, wurde charakterisiert und mit der Wirkung anderer Oomycetenpräparate verglichen.

Folgende Themenkomplexe bildeten die Schwerpunkte der Arbeit:

- Charakterisierung der Wirksamkeit von 'Iprovalicarb' gegenüber *Phytophthora infestans* an Tomatenpflanzen
- Histologische Studien mit Hilfe der konfokalen Laser Scan-Mikroskopie zum Einfluß von 'Iprovalicarb' auf den Infektionsverlauf von *Phytophthora infestans* in Tomatenblättern
- Histochemische Untersuchungen zur Charakterisierung der fungiziden Wirkung von 'Iprovalicarb' auf die Infektionsstrukturen des Pathogens mit dem konfokalen Laser Scan-Mikroskop und Transmissionselektronen-Mikroskop

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 'Iprovalicarb' bewirkte sowohl nach protektiver als auch nach kurativer Applikation (5 ppm a.i.) eine deutliche Verminderung des Befalls von *Phytophthora infestans* an Tomatenpflanzen.
- Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass frühe Entwicklungsstadien von *Phytophthora infestans* auf der Oberfläche von Tomatenpflanzen nach protektiver Applikation von 'Iprovalicarb' (5 ppm a.i.) gehemmt wurden. Neben einer verringerten Keimungsrate wurde auch das Auftreten von morphologischen Veränderungen, wie abschnittsweise verdickte Keimschläuche und partielle Auflösung der Keimschlauchzellwände, beobachtet.
- Die deutlichste Wirkung auf die Entwicklung von *Phytophthora infestans* hatte 'Iprovalicarb' im Gewebe von Tomatenblättern. Die pilzliche Ausbreitung bzw. das Durchwachsen der inter- und intrazellulären Hyphen des Erregers aus den Epidermiszellen durch das Palisadenparenchym in das Schwammparenchym wurde wirksam unterbunden. Auch eine horizontale Ausbreitung in den einzelnen Gewebeschichten wurde selten beobachtet. Dadurch war der infizierte Bereich in diesen Gewebeschichten signifikant kleiner als der in unbehandelten Pflanzen. Morphologische Veränderungen durch 'Iprovalicarb' wie das Anschwellen von pilzlichen Strukturen und Auflösen der Zellwand, die schon an Keimschläuchen auftraten, wurden an Hyphen von *Phytophthora infestans*, die sich im Blatt

gewebe entwickelten, noch deutlicher beobachtet. Besonders auffällig erschien die Volumenvergrößerung der Hyphen kurz vor und nach Penetration der pflanzlichen Zellwand im Blattgewebe, sowie die partielle Auflösung der Hyphenzellwand.

- Die Wirkung von 'Iprovalicarb' war abhängig von einer hohen Luftfeuchte, die ein vorzeitiges Antrocknen des Spritzbelages verhinderte. Dadurch war die Hemmung auf die untersuchten Entwicklungsstadien des Pathogens wesentlich effektiver, da die Aufnahme des Fungizids in das Pflanzengewebe verstärkt wurde.
- *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass Ringerlösung als isotonisches Kulturmedium eine stimulierende Wirkung auf die Keimungsrate und Ausbildung von Keimschläuchen von *Phytophthora infestans* besaß. Darum wurde der keimungshemmende Effekt von 'Iprovalicarb' erst bei wesentlich höheren Konzentrationen beobachtet im Vergleich zu Zoosporen, die in Leitungswasser oder demineralisiertem Wasser kultiviert wurden.
- 'Iprovalicarb' wirkte schon bei niedrigen Konzentrationen (0,3 ppm a.i.) deutlich reduzierend auf das radiale Myzelwachstum von *Phytophthora infestans* auf Agar. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Hyphen, die sich auf 'Iprovalicarb'-haltigem Agar entwickelt hatten, partiell eingeschnürt waren, so dass sie das Aussehen einer Perlschnur erhielten. Weiterhin traten nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung globulär verdickte Hyphenspitzen auf.
- Mit Hilfe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe wurde der Einfluß von 'Iprovalicarb' auf verschiedene Zuckerkomponenten in der Zellwand untersucht. Eine 'Iprovalicarb'-Behandlung veränderte die Anfärbbarkeit von Monosacchariden und Polysacchariden in den Zellwänden von *Phytophthora infestans*.
- Ein direkter Cellulosenachweis in den Zellwänden von *Phytophthora infestans* mit Hilfe der Enzym-Gold-Markierung zeigte, dass sich die spezifische Markierungsdichte für Cellulose gegenüber unbehandelt nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung signifikant veränderte. Da die Zellwandstärke aufgrund einer 'Iprovalicarb'-Behandlung zugenommen hatte, war die Markierungsdichte für Cellulose über die Gesamtfläche der Zellwand höher.
- Actin und Mikrotubuli, als bedeutende Cytoskelettelemente, werden eine wichtige Rolle beim Aufbau und der strukturellen Anordnung der Zellwand zugeschrieben. Sowohl die Actin- als auch die Mikrotubuli-Strukturen wurden nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung deutlich verändert.

- Die Wirkung von 'Iprovalicarb' in *in vitro*-Untersuchungen wurde mit der von anderen Oomycetenfungiziden verglichen. Neben 'Dimethomorph' und 'Azoxystrobin' zeigte 'Iprovalicarb' in den vorliegenden Untersuchungen eine sehr gute *in vitro*-Wirkung im Vergleich zu 'Propamocarb' und 'Metalaxyl'.
- Obwohl 'Iprovalicarb' und 'Dimethomorph' ähnliche morphologische Veränderungen an Hyphen von *Phytophthora infestans* bewirkten, konnte gezeigt werden, dass sie unterschiedlich in die Struktur der Zellwand eingreifen. Auf die Anfärbarkeit der Mono- und Polysaccharide, die durch 'Iprovalicarb' verändert wurden, zeigte 'Dimethomorph' keinen Effekt. Auch die Cytoskelettelemente, die in ihrer Anordnung nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung deutlich beeinträchtigt wurden, hatten nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung dieselbe Struktur wie in der unbehandelten Variante. Ultrastrukturelle Untersuchungen zeigten, dass beide Fungizide eine Verdickung der Zellwand verursachten. Während sich die Markierungsdichte für Cellulose nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung signifikant erhöhte, blieb sie nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung unverändert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Zellwand von Oomyceten aufgrund ihrer Zusammensetzung, die von anderen Pilzen abweicht, ein geeignetes Target für eine selektive Bekämpfung von Oomyceten darstellt. Obwohl 'Iprovalicarb' und 'Dimethomorph' ähnliche morphologische Veränderungen an Hyphen von *Phytophthora infestans* verursachen, greifen sie unterschiedlich in die Zellwandstruktur ein. Eine 'Iprovalicarb'-Behandlung veränderte die Anordnung der Cytoskelettelemente in der pilzlichen Zelle, wodurch deren Regulation auf die Ausrichtung der Mikrocellulosefibrillen und deren Kristallisation verändert sein könnte. Die Zunahme der Zellwandstärke nach einer 'Iprovalicarb'-Behandlung war mit einem erhöhten Cellulosegehalt verbunden, der aber vermutlich aufgrund der ausbleibenden Kristallisation nicht genügend Stabilität und Starrheit bietet. Nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung wurde ebenfalls eine Zunahme der Zellwanddicke beobachtet, der Cellulosegehalt in den Zellwänden blieb im Vergleich zur unbehandelten Variante jedoch unverändert. Auch die Anordnung der Cytoskelettelemente wurde nach einer 'Dimethomorph'-Behandlung nicht beeinträchtigt. 'Dimethomorph' scheint somit auf eine andere Art und Weise die Zellwandstruktur zu beeinträchtigen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sich 'Iprovalicarb' hinsichtlich seiner Wirkung trotz ähnlicher Auswirkungen auf die pilzliche Zellwand von anderen Oomycetenfungiziden unterscheidet und damit das Instrumentarium des Pflanzenschutzes erweitert.

6 Literaturverzeichnis

- ALBERT, G., and HEINEN, H., 1995: How does Dimethomorph kill fungal cells? – a time lapse video study with *Phytophthora infestans*. In: Modern fungicides and antifungal compounds, 11th International Symposium, May 14th-20th (eds. Lyr, H., Russel, P.E., Sisler, H.D.) 141-146.
- ALBERT, G., CURTZE, J., and DRANDAREVSKI, C.A., 1988: Dimethomorph (CME151), a novel curative fungicide. Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases **1**, 17-24.
- ALI, G.S., and REDDY, A.S.N., 2000: Inhibition of fungal and bacterial plant pathogens by synthetic peptides: *In vitro* growth inhibition, interaction between peptides and inhibition of disease progression. Molecular Plant Microbe Interaction **13** (8), 847-859.
- AMMERMAN, E., LORENZ, G., SCHELBERGER, K., WENDEROTH, B., SAUTER, H., and RENTZEA, C., 1992: BAS490F – A broad spectrum fungicide with a new mode of action. Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases **1**, 403-410.
- ANDERSSON, C., 1999: Metabolism of Iprovalicarb (SZX 0722) in animals. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer **52/1**, 83-93.
- ANEMA, B.P., BOUWMANN, J.J., KOMYOJI, T., and SUZUKI, K., 1992: Fluazinam: A novel fungicide for use against *Phytophthora infestans* in potatoes. Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases **2**, 663-668.
- ASTRÖM, H., GIOVANNETTI, M., and RAUDASKOSKI, M., 1994: Cytoskeletal components in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. Molecular Plant Microbe Interaction **7** (2), 309-312.
- BARTNICKI-GARCIA, S., and WANG, M.C., 1983: Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology* (eds. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P.H. Tsao), St Paul, Minnesota. The American Phytopathological Society, 121-137.
- BAUR, P., BUCHHOLZ, A., and SCHÖNHERR, J., 1997: Diffusion in plant cuticles as affected by temperature and size of organic solutes: similarity and diversity among species. Plant cell environment **20**, 982-994.
- BEAKES, G.W., COOMBS, G.H., VICKERMAN, K., SLEIGH, M.A., and WARREN, A., 1998: Evolutionary relationships among protozoa. The systematic association special **54**, 351-373.
- BECKER, W.F., JAGOW VON, G., ANKE, T., and STEGLICH, W., 1981: Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an e- β -methoxyacrylate systems as common structural element. FEBS Letters **132**, 329-233.
- BENSON, D.M., 1979: Efficacy and *in vitro* activity of two systemic acylalanines and ethazole for control of *Phytophthora cinnamomi* root of azalea. Phytopathology **69**: 174-178.
- BERG, R.H., 1990: Cellulose and xylans in the interface capsule in symbiotic cells of actinorhizae. Protoplasma **159**, 35-43.

- BODENMANN, J., HEINIGER, U., and HOHL, H.R., 1985: Extracellular enzymes of *Phytophthora infestans*: endo-cellulase, β -glucosidases and 1,3- β -glucanases. Canadian Journal of Microbiology **31**, 75-82.
- BOWMAN, R.D., and MUMMA, R.O., 1967: The lipids of *Pythium ultimum*. Biochimica et Biophysica Acta **44**, 501-510.
- BRANDT, D.M., SCHÄGGER, H., and JAGOW VON, G., 1988: Characterization of binding of the methoxyacrylate inhibitors mitochondrial cytochrome c reductase. European Journal of Biochemistry **173**, 499-506.
- BRANDT, U., and JAGOW VON, G., 1991: Analysis of inhibitor binding to the mitochondrial cytochrome c reductase by fluorescence quench titration. European Journal Biochemistry **195**, 163-170.
- BRANDTZAEG, P., 1998: The increasing power of immunohistochemistry and immunocytochemistry. Journal of Immunological Methods **216**, 49-67.
- BROEMSEN VON, S.L. and DEACON, J.W., 1996: Effects of calcium on germination and further zoospore release from zoospore cysts of *Phytophthora parasitica*. Mycological Research **100** (12), 1498-1504.
- BROEMSEN VON, S.L. and DEACON, J.W., 1997: Calcium interference with zoospore biology and infectivity of *Phytophthora parasitica* in nutrient irrigation solutions. Phytopathology **87**, 522-528.
- BROWN, R.M., 1996: The biosynthesis of cellulose. Journal of Macromolecular Science, Pure and Applied Chemistry **A33**, 1345-1373.
- BUCHEN, B., 2000 zitiert in: Cell Biology of plant and fungal tip growth- getting to the point. Meeting report. Plant Cell **12**, 1513-1517
- BUCHENAUER, H., 1978: Inhibition of ergosterol biosynthesis by triadimenol in *Ustilago avenae*. Pesticide Science **9**, 507-512.
- BUCHENAUER, H., 1987: Mechanism of triazolyl fungicides and related compounds, In: Modern selective fungicides, Properties, Applications and Mechanism of Action (eds. Lyr, Longman, Wiley), New York, 205-231.
- BURDEN, R.S., CARTER, G.A., JAMES, C.S., CLARK, T., and HOLLOWAY, P.I., 1988: Selective effects of Propamocarb and Prothiocarb on the fatty acid composition of some oomycetes. Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases **1**, 403-408.
- BURKE, D.J., SEALE, T.W., and McCARTHY, B.J., 1972: Protein and ribonucleic acid synthesis during the diploid life cycle of *Allomyces arbuscula*. Journal of Bacteriology **110**, 1065-1072.
- CAVALIER-SMITH, 1997: Sagenista and bigyra, two phylo of heterotrophic heterokont chromista. Archiv für Protistenkunde **148**, 253-267.
- CAVALLARIN, L., ANDREU, D., and SAN SEGUNDO, B., 1998: Cecropin A-derived peptides are potent inhibitors of fungal plant pathogens. Molecular Plant Microbe Interaction **11** (3), 218-227.

- CHERIF, M., BENHAMOU, N. and BELANGER, R., 1992: Occurrence of cellulose and chitin in the hyphal wall of *Pythium ultimum*: a comparative study with other plant pathogenic fungi. Canadian Journal of Microbiology **39**, 213-222.
- CHRISPEELS, M.J., 1976: Biosynthesis, intracellular transport and secretion of extracellular macromolecules. Annual Review of Plant Physiology **27**, 19-58.
- COHEN, Y., BAIDER, A., and COHEN, B.H., 1995: Dimethomorph activity against oomycete fungal plant pathogen. Phytopathology **85** (12), 1500-1506.
- COUTINHO, T.A., ASCH VAN, M.A.J., and RIJKENBERG, F.H.J., 1995: The effects of the fungicide bayfidan on infection structure formation by *Hemileia vastatrix* in *Coffea arabica* cv. Caturra. Mycological Research **99** (7), 793-798.
- CYR, R.J. and PALEVITZ, B.A., 1995: Organisation of cortical microtubules in plant cells. Current Opinion in Cell Biology **7**, 65-71.
- DALTON, A.J., 1955: A chrome-osmium fixative for electron microscopy. Anatomic records **121**, 281.
- DAVIDSE, L.C., GERRITSMA, O.C.M., IDELER, J., PIE, K., and VELTHUIS, G.C.M., (1988): Antifungal modes of action of metalaxyl, cyprofuram, benalaxyl and oxadixyl in phenylamide-sensitive and phenylamide-resistant strains of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* and *Phytophthora infestans*. Crop Protection **7**, 347-355.
- DAVIDSE, L.C., HOFMAN, A.E., and VELTHUIS, G.C.M., 1983: Specific interference of metalaxyl with endogenous RNA polymerase activity in isolated nuclei from *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis*. Experimental Mycology **7**, 344-361.
- DELMER, D.P., 1977: The biosynthesis of cellulose and other plant cell wall polysaccharides. In: Recent advances in phytochemistry, (eds. Loewus, F.A., Runeckles, V.C.), Plenum, New York, 45-77.
- DELMER, D.P., 1987: Cellulose Biosynthesis. Annual Review of Plant Physiology **38**, 259-290.
- DE MEESTER, S.L., COBB, J.B., HOTCHKISS, R.S., OSBORN, D.F., KARL, I.E., TINSLEY, K.W., and BUCHMAN, T.G., 1998: Stress-induced fractal rearrangement of the endothelial cell cytoskeleton causes apoptosis. Surgery **124**, 362-371.
- DERCKX, W., and BUCHENAUER, H., 1987: Comparative studies on the modes of action of aluminium ethyl phosphite in four *Phytophthora* species. Crop protection **6** (2), 82-89.
- DESPREAUX, D., FRITZ, R., and LEROUX, P., 1981: Mode d'action biochimique du cymoxanil. Phytologie Phytopharmacie **30**, (4), 245-255
- DICKER, W., and TURIAN, G., 1990: Calcium deficiencies and apical hyperbranching in wild type and the "frost" and "spray" morphological mutants of *N. crassa*. Journal of Genetic Microbiology **136**, 1413-1420.
- DUTZMANN, S., 1999: Iprovalicarb (SZX 0722) – a novel fungicide with specific activity against Oomycetes. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer, **52/1**, 15-21.
- FENN, M.E., and COFFEY, M.D., 1984: Studies on the *in vitro* and *in vivo* antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. Phytopathology **74**, 606-611.

- FÈVRE, M., GIRARD, V., and NODET, P., 1990: Cellulose and β -D-glucan synthesis in *Saprolegnia*. In: Biochemistry of cell wall and membranes in fungi (eds. P.J. Kuhn, A.P.J. Trinci, M.J. Jung, M.W. Goosey, L.G. Copping), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 97-107.
- FISHER, D.D. and CYR, R.J. (1998): Extending the microtubule/microfibril paradigm. *Plant Physiology* **116**, 1043-1051.
- FISHER, D.J., and HAYES, A.L., 1982: Mode of action of the systemic fungicides furalaxyl, metalaxyl and ofurace. *Pesticide Science* **13**, 330-339.
- FÖRSTER, H., and RACHED, I., 1985: Purification and characterization of extracellular pectinesterases from *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* **77**, 109-112.
- FREYTAG, S., and MENDGEN, K., 1991: Carbohydrates on the surface of urediniospore- and basidiospore-derived infection structures of heteroecious and autoecious rust fungi. *New Phytologist* **119**, 527-534.
- FULLER, M.S., ROBERSON, R.W., and GISI, U., 1990: Effects of the sterol demethylase inhibitor, cyproconazole, on hyphal tip cells of *Sclerotium rolfsii* III. Cell wall cytochemistry. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **36**, 115-126.
- GEITMANN, A., and EMONS, A.M.C., 2000: The cytoskeleton in plant and fungal tip growth. *Journal of Microscopy* **198**, 218-245.
- GIDDINGS, T.H.jr., BROWER, D.L., and STAEHELIN, L.A., 1980: Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils and secondary cell walls. *Journal of Cell Biology* **84**, 327-339.
- GISI, U., and COHEN, Y., 1996: Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure. *Annual Review of Phytopathology* **34**, 549-72.
- GODWIN, J.R., ANTHONY, V.M., CLOUGH, J.M., and GODREY, C.R.A., 1992: ICIA5504: a novel, broad spectrum, systemic β -methoxyacrylate fungicide. Brighton Crop Protection Conference – Pests and Diseases **1**, 435-442.
- GRIFFITH, J., DAVIS, A.J., and GRANT, B.R., 1992: Target sites of fungicides to control oomycetes. In: Target sites of fungicide action (ed. Köller, W.). CRC Press, Boca Raton, 69-100.
- GROHMANN, U.J., und HOFFMANN, G.H., 1982: Licht –und elektronenoptische Untersuchungen zur Wirkung von Metalaxyl bei *Pythium*- und *Phytophthora*-Arten. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **89** (7), 435-446.
- GROHMANN, U.J., und HOFFMANN, G.H., 1988: Blattinfektion und Gewebebesiedlung durch *Phytophthora infestans* an Kartoffeln unter Einfluß steigender Dosierungen von Metalaxyl. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **96** (6), 585-603.
- GUO, Z., MIYOSHI, H., KOMYOJI, T., TAGA, T., and FUJITA, T., 1991: Uncoupling activity of a newly developed fungicide, Fluazinam [3-chloro-N-(3-chloro-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2 pyridinamine]. *Biochimica et Biophysica Acta* **1056**, 89-92.
- HAIGLER, C.H., and BENZIMAN, M., 1982: Biogenesis of cellulose microfibrils occurs by cell-directed selfassembly in *Acetobacter xylinum*. In: Cellulose and other natural polymer systems (ed. Malcolm, Brown, R. jr.), Plenum, New York London, 273-297.

- HARDHAM, A.R., 1985: Studies on the cell surface of zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomi*. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry **33** (2), 110-118.
- HARDHAM, A.R., 1987: Microtubules and the flagellar apparatus in zoospores and cysts of the fungus *Phytophthora cinnamomi*. Protoplasma **137**, 109-124.
- HAROLD, R.L., and HAROLD, F.M., 1986: Ionophores and cytochalasins modulate branching in *Achlya bisexualis*. Journal of Genetic Microbiology **132**, 213-219.
- HARTWIG, J.H., and SHELVIN, P., 1986: The architecture of actin filaments and the ultrastructural location of acrin-binding protein in the periphery of lung macrophages. Journal of Cell Biology **103**, 1007-1020.
- HEATH, B., 2000 zitiert in: Cell Biology of plant and fungal tip growth- getting to the point. Meeting report. Plant Cell **12**, 1513-1517.
- HEATH, B., and HAROLD, R.L., 1992: Actin has multiple roles in the formation and architecture of zoospores of oomycetes, *Saprolegnia ferax* and *Achlya bisexualis*. Journal of Cell Science **102**, 611-627.
- HEATH, B., and GEITMANN, A., 2000: Cell Biology of plant and fungal tip growth- getting to the point. Meeting report. Plant Cell **12**, 1513-1517.
- HEATH, M.C., and SKALAMERA, D., 1997: Cellular interactions between plants and biotrophic fungal parasites. Advances in Botanical Research **24**, 196-225.
- HENDRIX, J.W. and ROUSER, G., 1976: Polar lipids of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in comparison with those of selected other fungi. Mycologia **68**, 354-361.
- HERTH, W., 1985: Plasmamembrane rosettes involved in localized wall thickening during xylem vessel formation of *Lepidium sativum* L.. Planta **164**, 12-21.
- HEUSER, J.E., and KIRCHNER, M.W., 1980: Filament organization revealed in platinum replicas of freeze dried cytoskeletons. Journal of Cell Biology **86**, 212-234.
- HEWITT, H.G., 1998: Fungicides in plant protection, CAB International, Wallingford, UK.
- HILL, A.E., GRAYSON, D.E., and DEACON, J.W., 1998: Suppressed germination and early death of *Phytophthora infestans* sporangia caused by pectin, inorganic phosphate, ion chelators and calcium-modulating treatments. European Journal of Plant Pathology **104**, 367-376.
- HOCH, H.C., BOURETT, T.M., and STAPLES, R.C., 1986: Inhibition of cell differentiation in *Uromyces* with D₂O and taxol. European Journal of Cell Biology **41**, 290-234.
- HOHL, H.R., 1991: *Phytophthora infestans*, the cause of late blight of potato. Nutrition 3. (eds. Ingram, D.S., and Williams, P.H.). Advances in Plant Pathology **7**, 53-83.
- HOHL, H.R., and BALSIGER, S., 1986: Probing the surface of soybean protoplasts and of germ tubes of the soybean pathogen *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* with lectins. Botanica Helvetica **2**, 289-297.
- HORGAN, P.A., 1971: *In vitro* ribonucleic acid synthesis in the zoospores of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. Journal of Bacteriology **106**, 281-282.

- JACKSON, S.L., and HEATH, B.I., 1989: Effects of exogenous Ca^{2+} ions on tip growth, intracellular Ca^{2+} concentration, and actin array in hyphae of the fungus *Saprolegnia ferax*. *Experimental Mycology* **13**, 1-12.
- JELKE, E., OERTEL, B., BÖHM, K.J., and UNGER, E., 1987: Tubular cytoskeletal elements in sporangia and zoospores of *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary (Oomycetes, *Pythiaceae*). *Journal of Basic Microbiology* **27** (1), 11-21.
- JIANG, Y., and GROSSMANN, F., 1991: Cellular damage to *Phytophthora infestans* in tomato leaves treated with oxadixyl: an ultrastructural investigation. *Journal of Phytopathology* **132**, 116-128.
- KAARS SIJPESTEIJN, A., KERKENAAR, A., and OVEREEM, J.C., 1974: Observations on selectivity and mode of action of prothiocarb. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent* **39**, 1027-1034.
- KANBE, T., KOBAYASHI, I., and TANAKA, K., 1989: Dynamics of cytoplasmic organelles in the cell cycle of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: three-dimensional reconstruction from serial sections. *Journal of Cell Science* **94**, 647-656.
- KANG, Z., HUANG, L., and BUCHENAUER, H., 2000: Cytochemistry of cell wall component alterations in wheat roots infected by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **107** (4), 337-351.
- KANG, Z., HUANG, L., KRIEG, U., MAULER-MACHNIK, A., and BUCHENAUER, H., 2001: Effects of tebuconazole on morphology, structure, cell wall components and trichothecene production of *Fusarium culmorum* *in vitro*. *Pest Management Science* **57**, 491-500.
- KARNOVSKY, M.J., 1965: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology* **27**, 137-138.
- KATSAROS, C., 2000 zitiert in: Cell Biology of plant and fungal tip growth- getting to the point. Meeting report. *Plant Cell* **12**, 1513-1517.
- KERKENAAR, A., and KAARS SIJPESTEIJN, A., 1981: Antifungal activity of metalaxyl and furalaxyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **15**, 71-81.
- KIMURA, S., LAOSINCHAI, W., ITOH, T., CUI, X., LINDER, C.R., and BROWN, R.M., 1999: Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *Plant Cell* **11**, 2075-2085.
- KOBAYASHI, I., KOBAYASHI, Y., YAMAOKA, N., and KUNOH, H., 1991: Recognition of a pathogen and a nonpathogen by barley coleoptile cells. III. Responses of microtubules and actin filaments in barley coleoptile cells to penetration attempts. *Canadian Journal of Botany* **70**, 1815-1823.
- KUHN, P.J., ALBERT, G., WYNESS, G., LEE, L.E., LINDSLEY, S.A., and LINDSLEY, M.A., 1989: Studies on the antifungal activity *in vitro* of dimethomorph, a novel fungicide active against downy mildews and *Phytophthora*. 9th International Symposium on systemic fungicides and antifungal compounds, Reinhardtsbrunn, GDR, Abstr.
- KUHN, P.J., ALBERT, G., WYNESS, L.E., LEE, S.A., and LINDSLEY, M.C., 1990: Studies on the antifungal activity of dimethomorph, a novel fungicide active against downy mildews on *Phytophthora*. Systemic fungicides and antifungal compounds. Tagungsbericht Akademie der Landwirtschaftswissenschaften, Berlin, **291**, 229-238.

- KUHN, P.J., PITT, D., LEE, S.A., WAKELY, G., and SHEPPARD, A.N., 1991: Effects of dimethomorph on the morphology and ultrastructure of *Phytophthora*. *Mycological Research* **95** (3), 333-340.
- LAPEYRIE, F., and MENDGEN, K., 1993: Quantitative estimation of surface carbohydrates of ectomycorrhizal fungi in pure culture and during *Eucalyptus* root infection. *Mycological Research* **97** (5), 603-609.
- LICHTSCHEIDL, I., 2000 zitiert in: Cell Biology of plant and fungal tip growth- getting to the point. Meeting report. *Plant Cell* **12**, 1513-1517
- LOCKEY, T.D., and OURTH, D.D., 1996: Formation of pores in *Escherichia coli* cell membranes by cecropin isolated from hemolymph of *Heliothis virescens* larvae. *European Journal of Biochemistry* **236**, 263-271.
- LOVETT, J.S., 1968: Reactivation of ribonucleic acid and protein synthesis during germination of *Blastocladiella* zoospores and the role of ribosomal nuclear cap. *Journal of Bacteriology* **96**, 962-969.
- MACLACHLAN, G.A., 1977: Cellulose metabolism and cell growth. In: *Plant growth regulation*, (ed. Pilet, P.E.), Springer, Berlin Heidelberg New York, 13-20.
- MANSFIELD, R.W., and WIGGINS, T.E., 1990: Photoaffinity labelling of the β -methoxyacrylate binding site in bovine heart mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Biochimica et Biophysica Acta* **1015**, 109-115.
- MARAS, M., DE BRUYN, A., SCHRAMIL, J., HERDEWIJN, P., CLAEYSSSENS, M., FIERS, W., and CONTRERAS, R., 1997: Structural changes of N-linked oligosaccharides from cellobiohydrolases I secreted by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* RUTC 30. *European Journal of Biochemistry* **245**, 617-625.
- MASHIMA, T., NAITO, M., NOGUCHI, K., MILLER, D.K., NICHOLSON, D.W., and TSURUO, T., 1997: Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* **14**, 1007-1012.
- MATHERHON, M.E., and PORCHAS, M., 2000: Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-AI, and metalaxyl on growth, sporulation, and zoospore cyst germination of three *Phytophthora* spp.. *Plant disease* **84** (4), 454-458.
- MATZKE, M.A., and MATZKE, A.J.M., 1986: Visualization of mitochondria and nuclei in living plant cells by the use of a potential-sensitive fluorescent dye. *Plant, Cell and Environment* **9**, 73-77.
- MILLARDET, P.M.A., 1885: Sur l'histoire du traitement du mildiou par le sulfate de cuivre. *Journal Agricola Pratique* **2**, 801-805; Engl. transl. by F.J. Schneiderhan in *Phytopathol. Classics* No 3 (1933)
- MONEY, N.P., and HOWARD, R.J., 1996: Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. *Fungal Genetics and Biology* **20**, 217-227.
- MOREJOHN, L.C., 1991: The molecular pharmacology of plant tubulin and microtubules. In: *The cytoskeletal basis of plant growth and form* (ed. Lloyd, C.W.), Academic Press, San Diego, CA, 29-44.

- MUELLER, S.C. and BROWN, R.M., 1982: The control of cellulose microfibril deposition in the cell wall of higher plants. *Planta* **154**, 489-500.
- MUELLER, S.C., and BROWN, R.M.jr., 1980: Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril-synthesizing complex in higher plants. *Journal Cell Biology* **84**, 315-326.
- NAKANISHI, T., and SISLER, H.D., 1983: Mode of action of Hymexazol in *Pythium aphanidermatum*. *Journal of Pesticide Science* **8**, 173-181.
- NIINI, S.S., and RAUDASKOSKI, M., 1993: Response of ectomycorrhizal fungi to benomyl and nocodazole: growth inhibition and microtubule depolymerisation. *Mycorrhiza* **3**, 83-91.
- NODET, P., CAPELLANO, A., FÈVRE, M., 1986: Effects of Congo red on polysaccharide synthesis and glucan synthase activity of the fungus *Saprolegnia*. In: *Cell Wall 86* (eds. Vian, B., Reiss, B., and Goldberg, R.), Proc 4th Cell Wall Meet, Paris, 346-347.
- PAPAVIZAS, G.C., O'NEILL, N.R., and LEWIS, J.A., 1978: Fungistatic activity of propyl-N-(γ -dimethylaminopropyl)-carbamate on *Pythium* spp. and its reversal by sterols. *Phytopathology* **68**, 167-1671.
- PEDREGOSA, A.M., RIOS, S., MONNISTROL, I.F., and LABORDA, F., 1995: Effect of the microtubule inhibitor methyl benzimidazol-2-yl carbamate (MBC) in protein secretion and microtubule distribution in *Cladosporium cucumerinum*. *Mycological Research* **1**, 43-48.
- PENNINGTON, C.J., ISER, J.R., GRANT, B.R., and GAYLOR, K.R., 1989: Role of RNA and protein synthesis in stimulated germination of zoospores of the pathogenic fungus *Phytophthora palmivora*. *Experimental Mycology* **13**, 158-168.
- QUADER, H., ROBINSON, D.G., and KEMPEN, R. van, 1983: Cell wall development in *Oocystis solitaria* in the presence of polysaccharide binding characterisation binding dyes. *Planta* **157**, 317-323.
- RAPP, L. und RICHTER, J., 1982: Wirkung von Propamocarb-hydrochlorid (Previcur N) auf verschiedene Isolate einiger *Pythium*- und *Phytophthora*-Arten *in vitro* und *in vivo*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **89**, 487-497.
- REICH, B., 1994: Zur Wirkungsweise von Propamocarb-Hydrochlorid auf *Phytophthora infestans* an Kartoffeln und Tomaten. Doktorarbeit, Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Universität Hannover.
- REICH, B., BUCHENAUER, H., BUSCHHAUS, H., and WENZ, M., 1992: Wirkungsweise von Propamocarb gegenüber *Phytophthora infestans*. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt für Land- u. Forstwirtschaften* **266**, 423.
- REISSIG, J.L., and KINNEY, S.G., 1983: Calcium as a branching signal on *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology* **154**, 1397-1402.
- REITER, B., WENZ, M., BUSCHHAUS, H. und BUCHENAUER, H., 1995a: Zur Wirkung von Propamocarb-Hydrochlorid auf *Phytophthora infestans in vitro* und an Kartoffeln und Tomaten. *Gesunde Pflanzen* **2**, 3-50.
- REITER, B., WENZ, M., BUSCHHAUS, H., and BUCHENAUER, H., 1995b: Action of Propamocarb against *Phytophthora infestans* causing late blight of potato and tomato. In: *Modern fungicides and antifungal compounds*, (eds. Lyr, H., Russel, P.E., Sisler, H.D.), 11th International Symposium, May 14th-20th, 147-155.

- ROBSON, G.D., WIEBE, M.G., and TRINCI, A.P.J., 1991: Involvement of Ca²⁺ in the regulation of hyphal extension and branching in *Fusarium graminearum* A 3/5. *Experimental Mycology* **15**, 263-272.
- SCHWINN, F., and STAUB, T., 1995: Phenylamides and other fungicides against oomycetes. In: *Modern selective fungicides. Properties, application, mechanisms of action.* (ed. Lyr, H.) 2nd revised and enlarged edition, Gustav Fischer Verlag, 323-346.
- SEAGULL, R.W., 1990: The effects of microtubule and microfilament disrupting agents on cytoskeletal arrays and wall deposition in developing cotton fibers. *Protoplasma* **159**, 44-59.
- SHAI, Y., 1995: Molecular recognition between membrane spanning polypeptides. *Trends in Biochemical Sciences* **20**: 460-464.
- SMOLKA, S., and WOLF, G., 1983: Cytologische Untersuchungen zur Wirkungsweise von Bayleton (Triadimefon) und Bayton (Triadimenol) auf den Wirt-Parasit-Komplex Gerste-*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* **36** (2), 97-128.
- STAUB, T., DAHMEN, H., URECH, P., and SCHWINN, F., 1979: Failure to select for *in vivo* resistance on *Phytophthora infestans* to acylalanine fungicides. *Plant Dis. Rep.* **63**, 385-389.
- STEIGER, C.J. and SCHLIWA, M., 1987: Actin localization and function in higher plants. *Protoplasma* **141**, 1-12.
- STENZEL, K., PONTZEN, R., SEITZ, T., TIEMANN, R., and WITZENBERGER, A. (1998): SZX 722: A novel systemic oomycete fungicide. Brighton Crop Protection Conference: Pests & Diseases-1998: Volume **2**: Proceedings of an International Conference, Brighton, UK, 16-19, November 1998, 335-342.
- STOWARD, P.J., NAKAE, Y., and VAN NORDEN, C.J.F., 1998: The everchanging advances in enzyme histochemistry, 1986-1996. *European Journal of Histochemistry* **42**, 35-40.
- STRUCK, C., HAHN, M., and MENDGEN, K., 1998: Infection structures of plant pathogenic fungi-potential targets for plant disease control. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **105** (6), 581-589.
- STÜBLER, D., RECKMANN, U., and NOGA, G., 1999: Systemic action of Iprovalicarb (SZX 0722) in grapevines. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* **52/1**, 33-47.
- TAYLOR, G.T., LAURIE, S., and TURNER, S.R., 2000: Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 2529-2540.
- TEERI, T.T., KOIVULA, A., LINDER, M., WOHLFAHRT, G., RUOHONEN, L., LEHTI, J., REINIKAINEN, T., SRISODSUK, M., KLEMAN-LEYER, K., KIRK, T.K., and JONES, T.A., 1997: Cellulose-Cellulase interactions of native and engineered cellobiohydrolases from *Trichoderma reesei*. In: *Carbohydrates from Trichoderma reesei and other microorganisms. Structures, biochemistry, genetics and applications* (eds. Claeysens, M., Nerinckx, W., and Piens, K.), 3-12.
- TEMPERLI, E., ROOS, U.P., and HOHL, R.H., 1990: Actin and tubulin cytoskeletons in germlings of the oomycete fungus *Phytophthora infestans*. *European Journal of Cell Biology* **53**, 75-88.
- TEMPERLI, E., ROOS, U.P., and HOHL, H.R., 1991: Germ tube growth and the microtubule cytoskeleton in *Phytophthora infestans*: Effects on antagonists of hyphal growth, microtubule inhibitors and ionophors. *Mycological Research* **5**, 611-617.

- TIEMANN, R., and PFLÜGER, W., 1999: Ecological profile of the fungicide Iprovalicarb. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* **52/1**, 61-69.
- TIMONEN, S., FINLAY, R.D., SÖDERSTRÖM, B., and RAUDASKOSKI, M., 1993: Identification and cytoskeletal components in pine ectomycorrhizas. *New Phytologist* **124**, 83-92.
- TRIGIANO, R.N., DYKE VAN, C.G., and SPURR, H.W. jr., 1984: Effects of metalaxyl on *Peronospora tabacina* infecting tobacco. *Phytopathology* **74**, 1034-1040.
- WARREN, R.A.J., 1997: Structure and function in β -1,4-Glycanases. In: Carbohydrates from *Trichoderma reesei* and other microorganisms. Structures, biochemistry, genetics and applications (eds. Claeysens, M., Nerinckx, W., and Piens, K.), 115-123.
- WESSELS, J.G.H., 1993: Transley Review No. 45. Wall growth, protein secretion and morphogenesis in fungi. *New Phytologist* **123**, 397-413.
- WILLIAMSON, R.E., 1991: Orientation of cortical microtubules in interphase plant cells. *International Review of Cytology* **129**, 135-205.
- WYMER, C. and LLOYD, C., 1996: Dynamic microtubules: implications for cell wall pattern. *Trends in Plant science* **1**, No. 7, 222-228.
- ZASLOFF, M., 1987: Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **84**, 5449-5453.
- ZIOGAS, B.N., BALDWIN, B.C, and YOUNG, J.E., 1997: Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA5504) in *Septoria titici*. *Pesticide Science* **50**, 28-34.
- ZIOGAS, B.N., and DAVIDSE, L.C., 1987: Studies on the mechanism of action of cymoxanil in *Phytophthora infestans*. *Pesticide and Physiology* **29**, 89-96.