

Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Thiophanat-methyl in *Fusarium* spp.

Investigations in the mode of action of thiophanate-methyl in Fusarium spp.

Tim Hirschfeld¹, Frank Ellner¹, Herbert Buschhaus², Monika Goßmann³ und Carmen Büttner³

Einleitung

Thiophanat-methyl (TM) ist ein fungizider Wirkstoff aus der Klasse der Benzimidazole und wird seit den 1960er Jahren gegen eine Vielzahl pilzlicher Pathogene eingesetzt. In Deutschland ist TM derzeit für die Indikationen *Sclerotinia sclerotiorum* in Winterraps, pilzliche Lagerfäulen in Kernobst sowie Ährenfusariosen in Weizen- und Triticale zugelassen. Die Primärwirkung von TM wird durch das Abbauprodukt Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat (MBC) verursacht. MBC bindet das pilzliche Tubulin, stört damit den Aufbau des Spindelapparates in der Mitose, so dass die homologen Chromosomen sich nicht trennen können und das Zellwachstum gehemmt wird.

In Feldversuchen, die unter verschiedenen klimatischen Bedingungen in Europa durchgeführt wurden, wirkte TM in Konzentrationen bis zu 500 ai/ha häufig deutlich stärker auf die Mykotoxinsynthese in den Körnern als auf den Ährenbefall mit *Fusarium* spp. (BUSCHHAUS und ELLNER, 2006). Wir stellten die Hypothese auf, dass TM möglicherweise durch eine Hemmung der Respiration einen Energiemangel hervorruft, durch den die Bildung von energiereichen Sekundärmetaboliten wie Mykotoxinen reduziert werden kann.

In vitro-Versuche zum Einfluss von TM und MBC auf mykotoxinbildende *Fusarium*-Arten zeigten, dass die Biosynthese der Mykotoxine stärker gehemmt wurde als das Myzelwachstum (HIRSCHFELD et al., 2009). Während die tägliche Zuwachsrate nur marginal beeinträchtigt wurde, ging die Mykotoxinbildung bis zu 95% zurück. Daraufhin wurde der Effekt von TM und MBC auf die Respiration von *Fusarium* spp. untersucht.

Material und Methoden

Isolate von *F. culmorum* und *F. verticillioides* wurden aus Dauerkulturen des Julius Kühn-Institutes in Erde auf speziellem, nährstoffarmen Agar (SNA; NIRENBERG, 1976) kultiviert. Nach einer 7-10 tägigen Inkubation bei Raumtemperatur und dem natürlichen Tag-/Nachtrhythmus wurden pilzbewachsene SNA-Stücke für die Beimpfung flüssigen Bilay's Mediums genutzt (BOOTH, 1971). Die Isolate wurden weitere 3-5 Tage auf einem Horizontalschüttler inkubiert, bevor das Medium mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und durch eine Gaze filtriert wurde. Im Anschluss wurde eine Konidiensuspension mit 10⁵ Konidien/ml hergestellt. Je 1 ml dieser Konidiensuspension wurde in 500 ml Duran-Flaschen transferriert, die 150 ml Bilay's Medium sowie TM in Konzentrationen von 0, 1, 2,5, 5 und 10 mg/l enthielten. Für jede Variante wurden 4 Wiederholungen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte weitere 5 Tage auf einem Horizontalschüttler bei 20°C, dunkel. Während dieser Zeit wurde die Respiration der Pilze mit dem Sensomat-System von AquaLytic gemessen.

Mittels hochauflösender Flüssigchromatographie (HPLC) wurde der Ergosterol-Gehalt als Indikator für die Myzelmasse sowie die Mykotoxinkonzentration im Medium analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

F. verticillioides erreichte die maximale Menge an freigesetztem Kohlenstoffdioxid (CO₂) von 32,8 mg/l+h nach 40 Stunden (Abb. 1). Zu diesem Zeitpunkt war die Menge an freigesetztem CO₂ in den Flüssigkulturen unter dem Einfluss von TM in den untersuchten Wirkstoffkonzentrationen um 40-65% reduziert. Die Respiration von *F. culmorum* wurde durch TM um 30-80% gehemmt.

Unter der Annahme, dass der Pilz in dem Bereich des linearen Anstiegs der Respirationkurve über optimale Wachstumsbedingungen verfügt und an deren Ende sein Wachstum entweder durch einen Mangel an Sauerstoff oder Nährstoffen gehemmt wird, ist der Wendepunkt in der Atmungskurve der unbehandelten Kontrolle (UK) als das Ende der logarithmischen Wachstumsphase des Pilzes anzusehen und wurde deshalb zum Vergleich der untersuchten Varianten herangezogen.

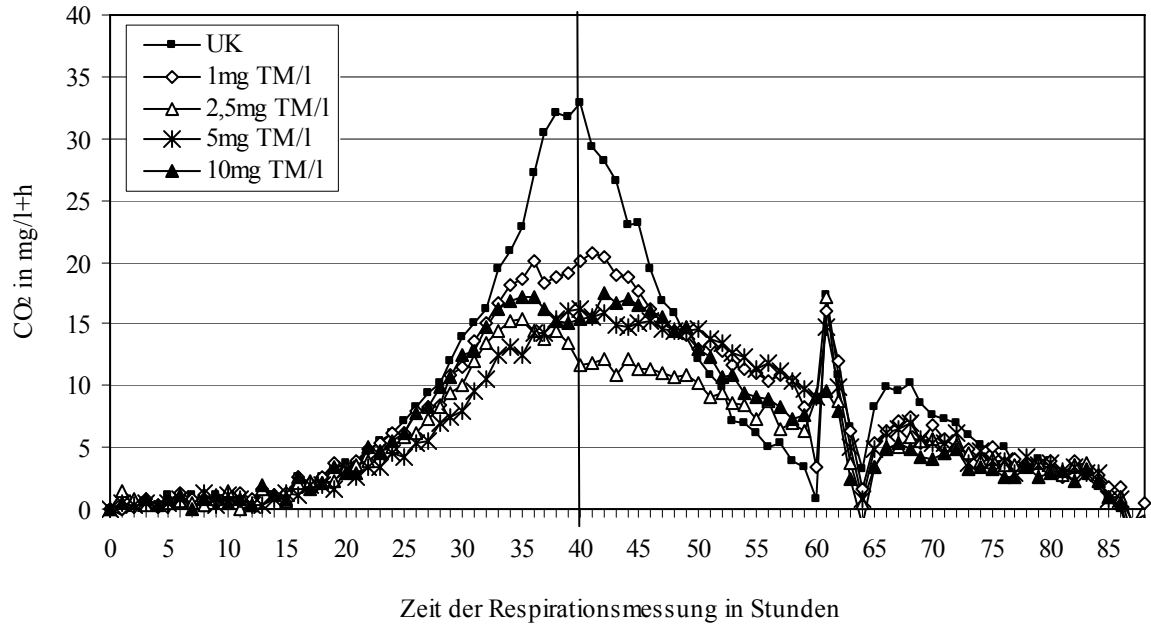


Abbildung 1: Menge an freigesetztem Kohlenstoffdioxid pro Stunde von *F. verticillioides* in Flüssigkultur bei bestimmten Konzentrationen von Thiophanat-methyl (TM) (die eingezogene Senkrechte bezeichnet das Ende der logarithmischen Wachstumsphase)

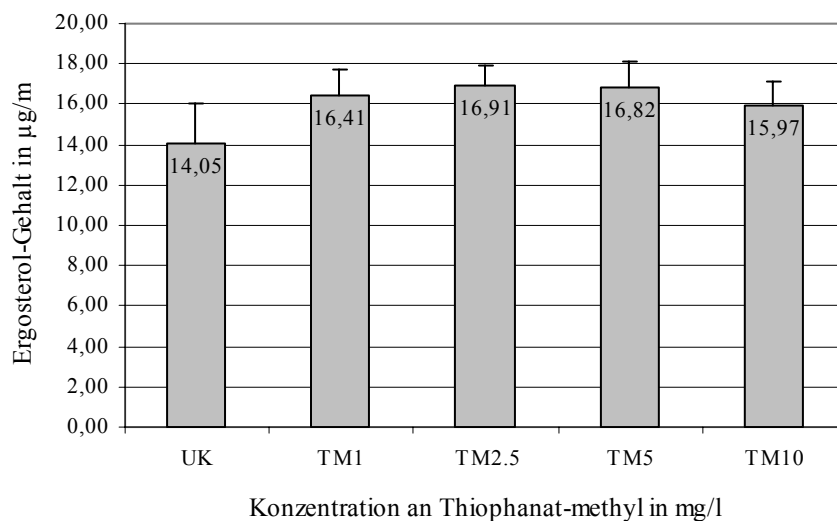


Abbildung 2: Ergosterol-Gehalt im Flüssigmedium von *F. verticillioides* bei bestimmten Konzentrationen an Thiophanat-methyl

Der durchschnittliche Ergosterolgehalt in der Flüssigkultur der UK von *F. verticillioides* lag bei 14,1 µg/ml und wurde unter dem Einfluss von TM auf 16,0-16,9 µg/ml nur leicht erhöht (Abb. 2). Das Wachstum von *F. culmorum* wurde durch TM in den untersuchten Wirkstoffkonzentrationen ebenfalls nicht gehemmt (4,1-5,5 mg/ml). Daraus ist zu schliessen, dass der Rückgang der Atmung nicht auf einem gehemmten Wachstum basierte.

Sowohl *F. verticillioides* als auch *F. culmorum* bildeten in dem Bilay's Medium keine Mykotoxine. Der Einfluss von TM auf das Wachstum und die Mykotoxinbildung von *Fusarium* spp. wurde jedoch bereits in *in vitro*-Versuchen analysiert, wobei sich deutlich stärkere Effekte des Wirkstoffes auf die

Biosynthese der Mykotoxine als auf die gebildete Biomasse der Pilze zeigten (HIRSCHFELD et al., 2009).

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass durch TM ein Wirkungsmechanismus ausgelöst wird, der die Respiration von *Fusarium* spp. beeinflusst, da die Menge an freigesetztem CO₂ unter dem Einfluss von TM in den Flüssigkulturen ohne eine vergleichbare Hemmung im Myzelwachstum abnahm.

Zusammenfassung

Thiophanat-methyl (TM) gehört zu den Fungiziden der Benzimidazole und ist in Deutschland seit 2009 für die Indikation Ährenfusariosen in Weizen und Triticale zugelassen. Die Primärwirkung geht von dem Transformationsprodukt Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat (MBC) aus, das als β -Tubulin-Inhibitor die Zellteilung stört. In Feldversuchen reduzierte TM die Mykotoxinbildung in den Weizenkörnern zum Teil effizienter als den Befall mit *Fusarium* spp.. Auch in *in vitro*-Versuchen wurde die Mykotoxin-Biosynthese in einigen Fällen um bis zu 95% gehemmt, wohingegen das Wachstum der Pilze kaum eingeschränkt war. Weiterhin war die Respiration von *Fusarium* spp. unter dem Einfluss von TM je nach Wirkstoffkonzentration um 20-80% gehemmt, ohne dass ein vergleichbarer Rückgang im Myzelwachstum beobachtet werden konnte.

Abstract

Thiophanate-methyl (TM) is a benzimidazole fungicide and has been approved for control of *Fusarium* head blight in wheat and triticale since 2009. The primary fungicidal effect of TM is caused by the transformation product methyl-benzimidazole-2-yl-carbamate (MBC), which is a β -tubulin inhibitor and disturbs the cell division. TM reduced in field trials the deoxynivalenol (DON) contents in wheat kernels more efficiently than head blight caused by *F. graminearum*. TM reduced the biosynthesis of mycotoxins up to 95% in mycotoxin-producing *Fusarium* spp. *in vitro* although the fungal growth hardly decreased. Respiration of *Fusarium* spp. exposed to TM was also reduced by about 20-80% depending on the TM-concentration used without a corresponding inhibition of growth.

Literatur

BOOTH C 1971: The Genus *Fusarium*. Commonw. Mycol. Inst./Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.

BUSCHHAUS H, ELLNER F 2007: Impact of Thiophanate-methyl on mycotoxin production in vitro and in vivo. Rheinhardtbrunn; Symposium on Fungicides

HIRSCHFELD T, ELLNER F, BUSCHHAUS H, GOßMANN M, BÜTTNER C 2009: Einfluss von Thiophanat-Methyl und Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat auf mykotoxinbildende *Fusarium* spp., ALVA-Mitteilungen (7), S. 31-35.

NIRENBERG H 1976: Untersuchungen über die morphologische und biologische Differenzierung in der *Fusarium*-Sektion *Liseola*. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstwirtschaft., Berlin-Dahlem, 169, S. 1-117.

Adressen der Autoren

¹ Julius Kühn-Institut, Bundesinstitut für Kulturpflanzen, Institut für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz, Königin-Luise-Straße 19, D-14195 Berlin

² Nisso Chemical Europe GmbH, Berliner Allee 42, D-40212 Düsseldorf

³ Humboldt-Universität zu Berlin, Landwirtschaftlich-Gärtnerische Fakultät, Fachgebiet Phytomedizin, Department für Nutzpflanzen und Tierwissenschaften, derzeitige Adresse: Julius Kühn-Institut, Königin-Luise-Straße, D-14195 Berlin