

UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS VON THIOPHANAT-METHYL IN *FUSARIUM* SPP.

T. HIRSCHFELD, F. M. ELLNER, H. BUSCHHAUS, M. GOßMANN, C. BÜTTNER



NIPPON SODA CO., LTD.



EINLEITUNG

Thiophanat-methyl (TM) ist ein fungizider Wirkstoff aus der Klasse der Benzimidazole und ist in Deutschland seit 2009 für die Indikation Ährenfusariosen in Weizen- und Triticale zugelassen. Die Primärwirkung von TM wird durch das Abbauprodukt Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat (MBC) verursacht, das als β -Tubulin-Inhibitor die Zellteilung stört. In Feldversuchen, die unter verschiedenen klimatischen Bedingungen in Europa durchgeführt wurden, zeigte die Applikation von TM zum Teil stärkere Effekte auf die Deoxynivalenol-Gehalte (DON) als auf den prozentualen Anteil *Fusarium*-infizierter Weizenkörner. Weiterhin reduzierte TM die Mykotoxinbildung von *Fusarium* spp. in *in vitro* Versuchen um bis zu 95% ohne eine vergleichbare Hemmung im Myzelwachstum. 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) 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. 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 Suspension mit 10^5 Konidien/ml hergestellt. Je 1 ml dieser Konidien suspension wurde in 500 ml Duran-Flaschen transferiert, 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 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 Kohlendioxid (CO_2) von 32,8 mg/l*h nach 40 Stunden (Abb. 1). Zu diesem Zeitpunkt war CO_2 in den Flüssigkulturen unter dem Einfluss von TM um 40-65% reduziert. Die Respiration von *F. culmorum* wurde durch TM um 30-80% gehemmt (Abb. 2). Unter der Annahme, dass der Pilz in dem Bereich des linearen Anstiegs der Respirationskurve 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. Der durchschnittliche Ergosterol-Gehalt in der Flüssigkultur der UK von *F. verticillioides* lag bei 14,1 μ g/ml und wurde unter dem Einfluss von TM nur leicht auf 16,0-16,9 μ g/ml erhöht (Abb. 3). Das Myzelwachstum von *F. culmorum* wurde durch TM in Konzentrationen bis zu 5mg/l ebenfalls nicht gehemmt (Abb. 4). Erst bei 10mg TM/l waren die Ergosterol-Gehalte im Medium um etwa 25% reduziert. 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. war jedoch bereits in *in vitro*-Versuchen analysiert worden, wobei sich deutlich stärkere Effekte des Wirkstoffes auf die Biosynthese der Mykotoxine als auf die gebildete Biomasse der Pilze zeigten (Tab. 1).

Abb. 1

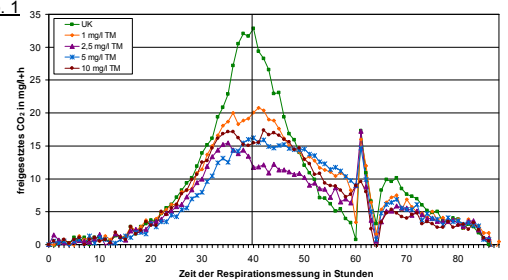


Abb. 2

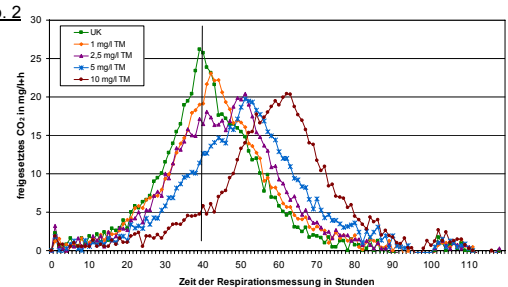


Abbildung 1+2: Respiration von *F. verticillioides* (Abb. 1) und *F. culmorum* (Abb. 2) in Flüssigkultur bei bestimmten Konzentrationen an Thiophanat-methyl

Tabelle 1: Einfluss von Thiophanat-methyl (mg/l) auf Zuwachsrates, Ergosterol-Gehalt und Konzentrationen an Deoxynivalenol (DON) und Acetyl-Deoxynivalenol (AcDON) in *in vitro*-Kulturen von *F. culmorum*

<i>F. culmorum</i>	UK	TM1 (%)	TM2,5 (%)	TM5 (%)	TM10 (%)
Zuwachsrates (mm/d)	9,6	0	-3	-22	-44
Ergosterol (μ g/g Agar)	2,1	0	-14	-62	-90
DON (ng/g Agar)	27,3	-30	-77	-100	-100
AcDON (ng/g Agar)	81,9	-47	-73	-100	-100

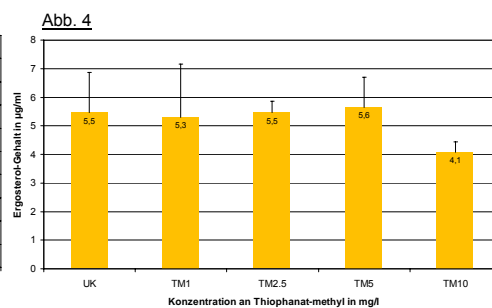
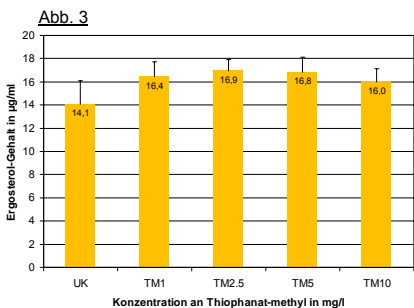


Abbildung 3+4: Ergosterol-Gehalte von *F. verticillioides* (Abb. 3) und *F. culmorum* (Abb. 4) in Flüssigkultur bei bestimmten Konzentrationen an Thiophanat-methyl

FAZIT

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass durch TM ein Wirkungsmechanismus ausgelöst wird, der die Respiration von *Fusarium* spp. beeinflusst, da die Menge an freigesetztem CO_2 unter dem Einfluss von TM in den Flüssigkulturen ohne eine vergleichbare Hemmung im Myzelwachstum abnahm.