

Einfluss von Thiophanat-Methyl und Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat auf mykotoxinbildende *Fusarium* spp.

Influence of thiophanate-methyl and methyl-benzimidazole-2-yl-carbamate on mycotoxin producing Fusarium spp.

T. Hirschfeld, F. Ellner, H. Buschhaus, M. Goßmann, C. Büttner

1. Einleitung

Thiophanat-Methyl (TM) ist ein fungizider Wirkstoff aus der Wirkstoffgruppe der Benzimidazole, der über 30 Jahre gegen eine Vielzahl phytopathogener Pilze in der Landwirtschaft eingesetzt wurde. TM ist in Deutschland derzeit für die Indikationen Lagerfäulen an Kernobst, Weißstängeligkeit im Raps sowie Ährenfusariosen in Weizen und Triticale zugelassen.

Die Primärwirkung von TM besteht in einer Störung der Zellteilung während der Mitose, ausgelöst durch den Metaboliten Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat (MBC) durch Bindung an das pilzliche Tubulin wodurch der Aufbau des Spindelapparates zur Trennung der homologen Chromosomen verhindert wird. Eine Sekundärwirkung wurde in *Rhizoctonia solani* sowie *Sacharomyces graminis* nachgewiesen und liegt in der Hemmung der Cytochrom C Oxidase als eines der Schlüsselenzyme der Respiration. Zur Wirkung von TM auf Pilze der Gattung *Fusarium* gibt es bislang nur wenige Untersuchungen.

In Freilandversuchen von Buschhaus und Ellner (2007) an Weizen, der mit *Fusarium graminearum* inokuliert wurde, führte die Applikation von TM zur Blüte zu deutlich reduzierten Mykotoxinkonzentrationen im Erntegut, obwohl der Effekt auf den Anteil *F. graminearum* infizierter Körner nicht so ausgeprägt war wie in den Vergleichsvarianten mit Azolfungiziden. Sie postulierten daher, dass eine durch TM ausgelöste Hemmung der Respiration in Folge des entstehenden Energiemangels die Mykotoxinbildung von *F. graminearum* einschränkt, da Mykotoxine energiereiche Sekundärstoffwechselprodukte darstellen.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurde der Einfluss von TM und MBC auf das Wachstum, die Mykotoxinbildung und die Respiration einiger im Getreideanbau relevanter *Fusarium*-Arten *in vitro* untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchung des Wachstums und der Mykotoxinbildung

Die Anzucht von *Fusarium* spp. erfolgte für jeden Untersuchungsansatz immer neu aus Erdkultur, um Degenerierungen der Isolate zu vermeiden. Nach 5-7 Tagen Inkubation auf Slight-Nutrient-Agar (SNA) wurden Stücke des bewachsenen SNA mit einem definierten Durchmesser von 5mm ausgestochen und mittig auf den Nährmedien platziert, die TM in Konzentrationen zwischen 0 und 10mg/l oder MBC-Konzentrationen bis 1mg/l enthielten. Die Trichothecene-bildenden *Fusarium*-Arten *F. graminearum* und *F. culmorum* inkubierten auf einem Weizenmehl-Agar (WMA), die Fumonisin-bildenden Arten *F. verticillioides* und *F. globosum* auf einem Maisextrakt-Agar (MA). Innerhalb der ersten 6-10 Tage wurde durch die tägliche Messung des radialen Myzelwachstums die Zuwachsrate bestimmt. Begleitend wurden morphologische Veränderungen der Isolate durch mikroskopische bzw. makroskopische Bonituren festgehalten. Nach drei Wochen Inkubation wurde der Agar aufbereitet und der Mykotoxin- sowie Ergosterolgehalt mittels hochauflösender Flüssigchromatographie (HPLC) analysiert.

2.2 Untersuchung der Respiration

Die Isolate von *Fusarium* spp. wurden zunächst aus Erdkultur auf SNA rekultiviert und inkubierten anschließend drei Tage im Bilay`s Flüssigmedium, aus dem eine Sporensuspension mit 100000 Konidien/ml hergestellt wurde. Schließlich wurde 1 ml der Sporensuspension je Variante und Wiederholung in das auf bestimmte TM-Konzentrationen eingestellte Bilay`s Medium transferiert und während der 5-tägigen Inkubation die Respiration mit dem Sensomat-System von Aqua Lytic gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von TM und MBC auf Wachstum und Mykotoxinbildung

3.1.1 Fumonisine-bildende *Fusarium* spp.

Der Einfluss von TM auf die Fumonisinbildung von *F. verticillioides* war stärker ausgeprägt als auf das Myzelwachstum. Das Wachstum ging bei einer Aufwandmenge von 1mg/l TM um 40% zurück, die Produktion von Fumonisin B₁ (FB₁) und Fumonisin B₂ (FB₂) dagegen um 94% (Abb. 1). Ab einer Aufwandmenge

von 5mg/l war das Myzelwachstum nahezu komplett gehemmt und keine Fumonisine mehr nachweisbar.

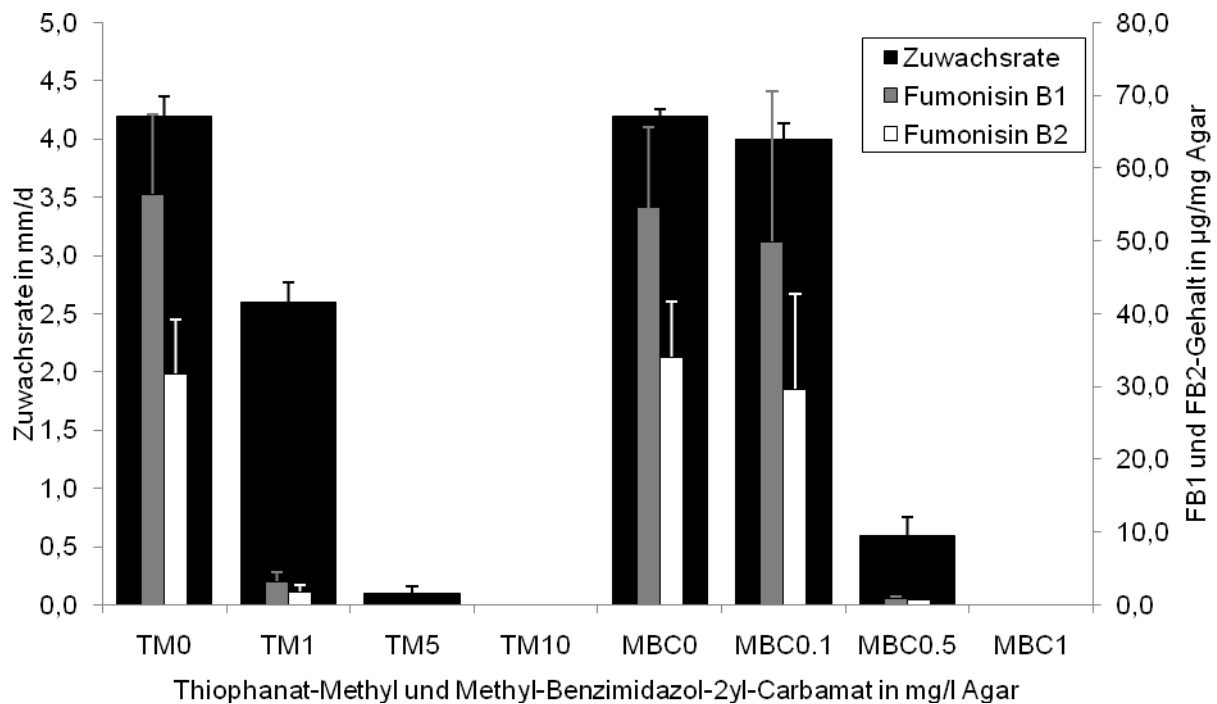


Abb. 1: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an TM und MBC auf Wachstum und Fumonisinbildung von *F. verticillioides*

Im Gegensatz dazu wurden das Wachstum sowie die Fumonisinproduktion von *F. verticillioides* durch MBC in einem verhältnismäßig ähnlichen Ausmaß reduziert. Bei Aufwandmengen von 0,1mg/l MBC bzw. 0,5mg/l MBC wurde das Myzelwachstum um 5% bzw. knapp 90% gehemmt und die Bildung von FB₁ und FB₂ um 9-13% bzw. 98% limitiert.

Ein ähnlicher Einfluss von TM und MBC auf das Myzelwachstum und die Synthese von FB₁ und FB₂ war auch in *F. globosum* nachweisbar.

3.1.2 Trichothecene-bildende *Fusarium* spp.

Bei *F. culmorum* und *F. graminearum* wurde die Toxinproduktion ebenfalls deutlich stärker durch TM beeinflusst als das Wachstum. *F. culmorum* reagierte auf Konzentrationen von 1mg/l bzw. 2,5mg/l TM mit einem eher marginalen Rückgang des Myzelwachstums wohingegen die Produktion der Trichothecene Deoxynivalenol (DON) und Acetyl-Deoxynivalenol (AcDON) um 30-50% bzw. 70-75% eingeschränkt wurde (Abb. 2). Ab einer Aufwandmenge von 5mg/l TM konnten keine Trichothecene mehr nachgewiesen werden. Das Myzelwachstum war im Vergleich dazu nur um 30-

60% bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (UK) gehemmt. Im Gegensatz zu den fumonisinbildenden *Fusarium*-Arten zeigte MBC einen ähnlich ausgeprägten Effekt auf die Trichothecenproduktion von *F. culmorum* wie TM.

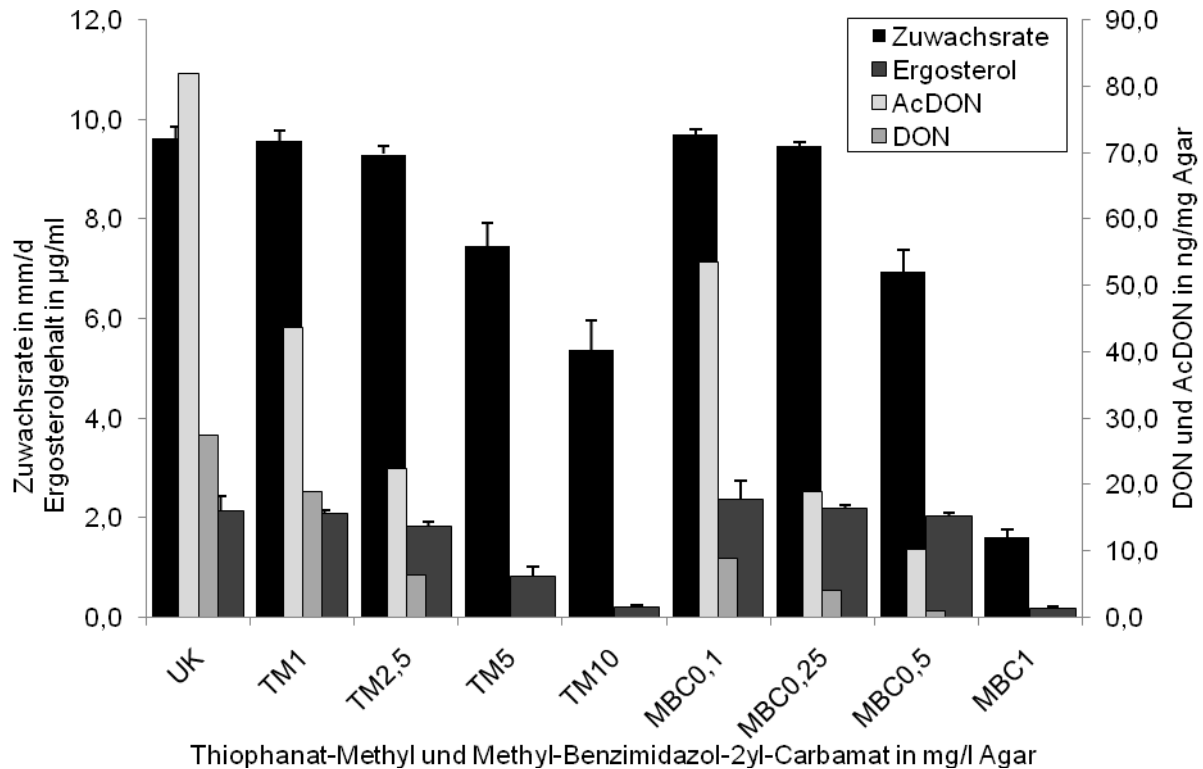


Abb. 2: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen an TM und MBC auf Wachstum und Trichothecen-Bildung von *F. culmorum*

Darüber hinaus korrelierten der Ergosterolgehalt und die Zuwachsrates des Myzels von *F. culmorum* nach Pearson in 82% aller gemessenen Einzelwerte, wodurch der Parameter Zuwachsrates als Maß für die gebildete Myzelmenge bestätigt wird.

Die Wirkung von TM und MBC auf *F. graminearum* war adäquat.

3.2 Einfluss von TM auf die Respiration von *Fusarium* spp.

Wir postulieren, dass der Pilz nur im Bereich des linearen Anstiegs der Respirationskurve über optimale Wachstumsbedingungen verfügt und das Wachstum am Ende der logarithmischen Phase entweder durch einen Mangel an Sauerstoff in der Gasphase oder an Nährstoffen im Medium limitiert wird. Daher sehen wir den Wendepunkt der Respirationskurve der unbehandelten Kontrolle (UK) als das Ende der logarithmischen Wachstumsphase an, das wir zur Evaluierung der Unterschiede in der Respiration der untersuchten Varianten heranziehen.

F. verticillioides setzte in der unbehandelten Kontrolle nach 41 Stunden Inkubation ein Maximum von 33 mg/l CO₂ je Stunde und im Durchschnitt der 5 tägigen Inkubation insgesamt 770mg/l CO₂ frei (Abb. 3+4). Unter dem Einfluss von TM wurde die Menge an stündlich freigesetztem CO₂ um 40-65% reduziert und die Gesamtrespiration ging um 20-40% zurück.

Die Ergebnisse der Ergosterol-Untersuchungen zeigen, dass der Rückgang der Respiration nicht auf einer Hemmung des Myzelwachstums basierte, da die UK mit 14,05 µg/ml den geringsten Ergosterol-Gehalt im Flüssigmedium aufwies, wohingegen in den Varianten, die TM enthielten Ergosterolgehalte zwischen 15,97-16,82 µg/ml nachgewiesen wurden.

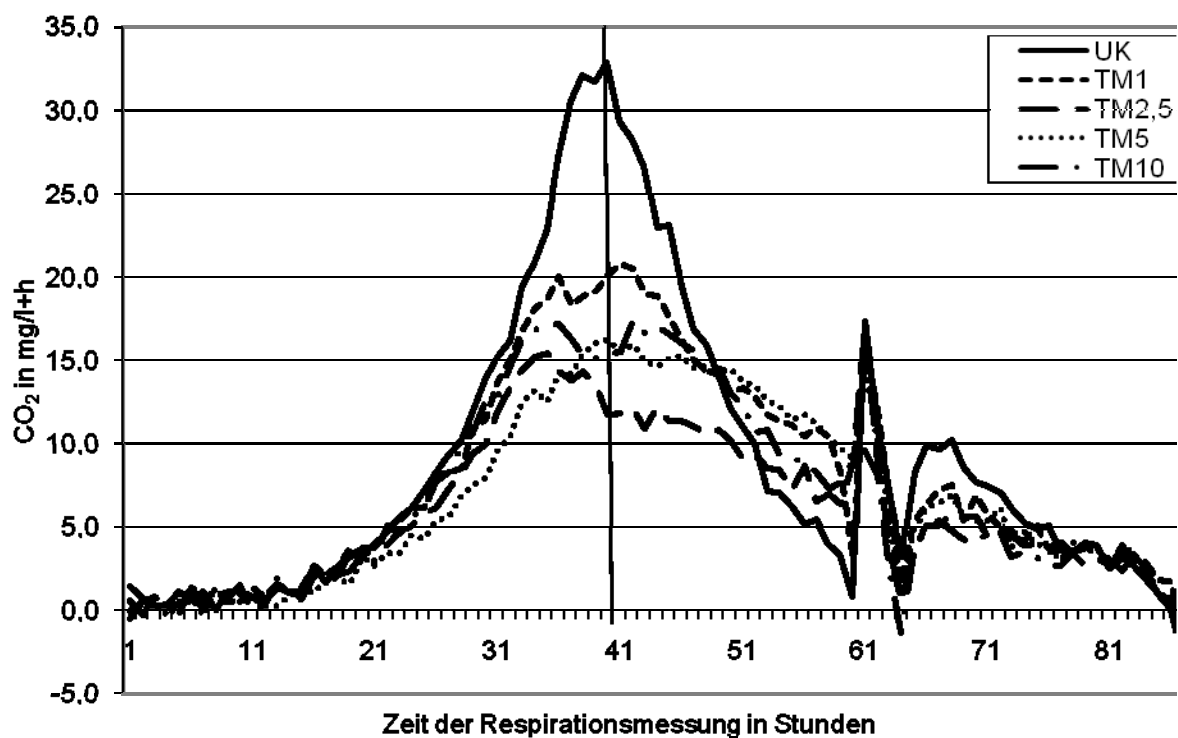


Abb. 3: Stündlich freigesetzte Menge an CO₂ von *F. verticillioides* bei bestimmten Konzentrationen an TM über einen Zeitraum von 5 Tagen

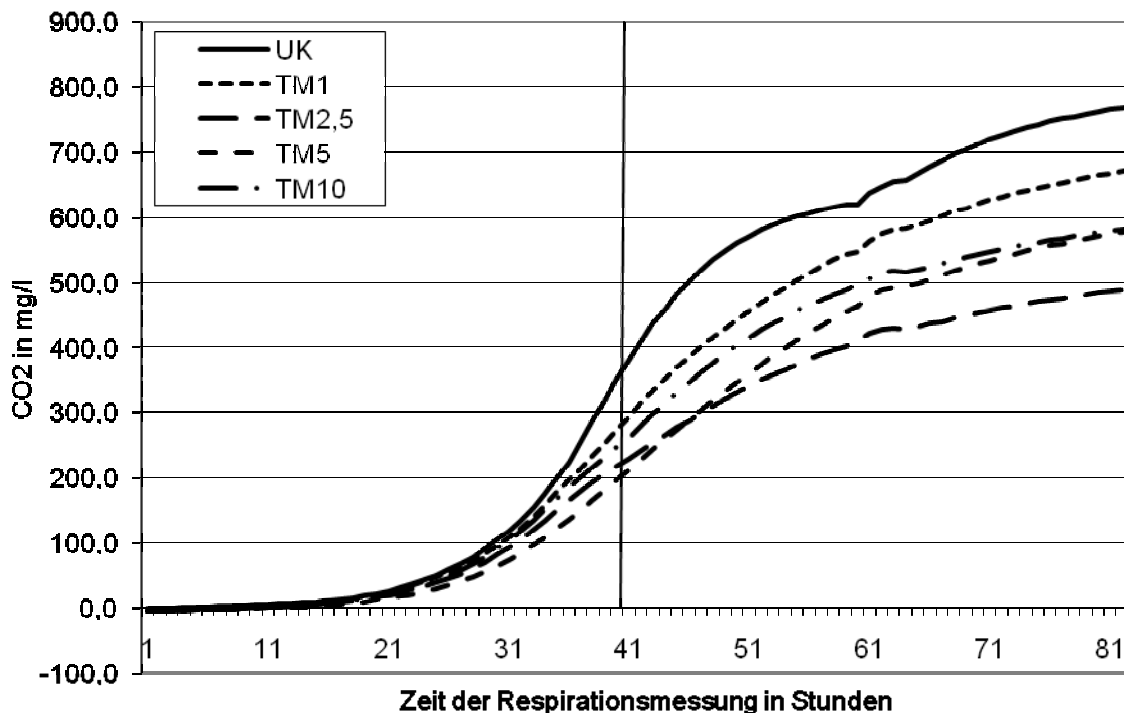


Abb. 4: Gesamtrespiration von *F. verticillioides* bei bestimmten Konzentrationen an Thiophanat-Methyl über einen Zeitraum von 5 Tagen

F. culmorum erreichte 39 Stunden nach der Inkubation mit 26,2 mg/l das Maximum an stündlich freigesetztem CO₂ in der UK und zeigte eine Gesamtrespiration von 253,5 mg/l CO₂. Die Menge an stündlich freigesetztem CO₂ wurde durch TM in Konzentrationen von 1-10 mg/l um 30-80% reduziert und die Gesamtrespiration ging um 20-70% zurück. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei der Untersuchung von *F. graminearum* erzielt werden.

4. Zusammenfassung

Bei der Untersuchung des Einflusses von Thiophanat-Methyl und Methyl-Benzimidazol-2-yl-Carbamat auf mykotoxinbildende Arten von *Fusarium* spp. konnte beobachtet werden, dass Thiophanat-Methyl einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Biosynthese der Mykotoxine als auf das Wachstum der Pilze aufwies und die Respiration von *Fusarium* spp. im Flüssigmedium unabhängig vom Myzelwachstum gehemmt wurde. Die Ergebnisse weisen somit auf einen zusätzlichen Wirkungsmechanismus von Thiophanat-Methyl in *Fusarium* spp. hin.

Schlüsselwörter: *Fusarium* spp., Thiophanat-Methyl, Carbendazim, Mykotoxinbildung

Summary

Investigations into the effect of thiophanat-methyl and methyl-benzimidazole-2-yl-carbamate on mycotoxin-producing species of *Fusarium* spp. showed that the influence on the biosynthesis of mycotoxins was more distinct than on the growth of the fungi. Moreover *Fusarium* spp. showed a reduced respiration at certain levels of TM that was not associated with an inhibited growth. The data indicate that there may be a mechanism of thiophanat-methyl by which the mycotoxin production of *Fusarium* spp. could be inhibited independent from the growth of the mycelium.

Keywords: *Fusarium* spp., thiophanat-methyl, carbendazim, mycotoxin production