

# Grundempfindlichkeit der Septoria-Blattdürre des Weizens gegenüber den SDHI-Fungiziden

Stéphanie Schürch<sup>1</sup> und Thibaut Cordette<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon, Schweiz

<sup>2</sup>Université de Picardie Jules Vernes, 80000 Amiens, Frankreich

Auskünfte: Stéphanie Schürch, E-Mail: stephanie.schuerch@acw.admin.ch, Tel. +41 22 363 43 75



In der Schweiz wird die Hälfte der Brotgetreidefläche mit Hilfe von Fungiziden gegen Blattkrankheiten geschützt.

## Einleitung

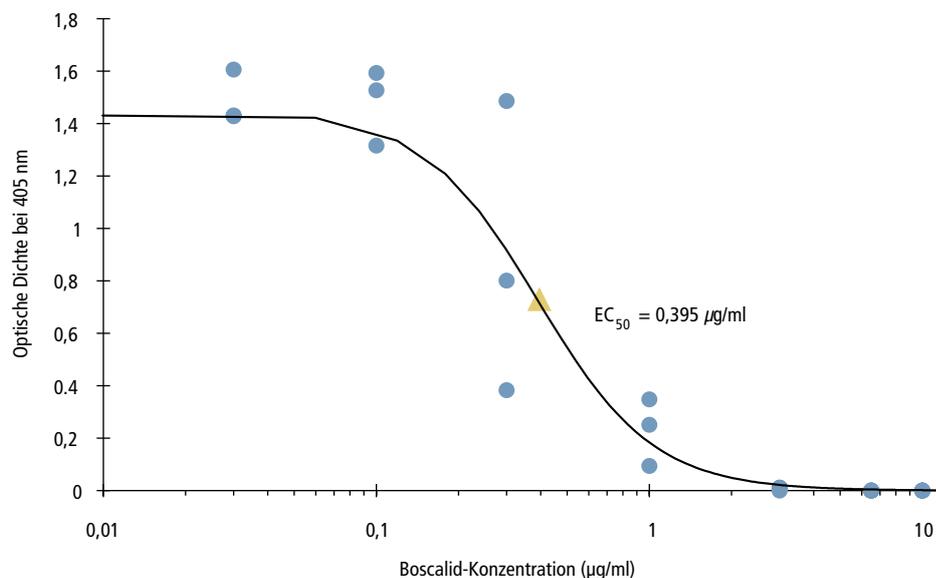
In unseren Breitengraden ist die Septoria-Blattdürre eine der wichtigsten Krankheiten des Weizens. Die Bekämpfung dieser Krankheit basiert auf der Wahl wenig anfälliger Sorten, auf einer geeigneten Bodenbearbeitung und auf dem Einsatz von Fungiziden. In der Schweiz wird die Hälfte der Brotgetreidefläche konventionell bewirtschaftet und mit Hilfe von Fungiziden gegen Blattkrankheiten geschützt. Einer der Krankheits-

erreger der Septoria-Blattdürre ist *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt., auch bekannt unter dem Namen der asexuellen Form, *Septoria tritici* Rob. in Desm. Bis vor kurzem wurden zwei Wirkstoffgruppen verwendet, um diese Krankheit zu bekämpfen: die Qoi (Quinone Outside Inhibitors; Strobilurine) und die DMI (Demethylation Inhibitors, darunter die Triazole). Eine Punktmutation, welche Resistenz gegenüber den Qoi verleiht, ist rasch in Populationen von *M. graminicola* aufgetaucht, was die Wirksamkeit dieser Fungizid-

gruppe eher zufällig macht. Das Pathogen hat sich auch an die DMI angepasst, was sich in einem graduellen Verlust der Empfindlichkeit äussert und im Feld zur Abnahme der Wirksamkeit der Produkte führen kann. Um diese Resistenzphänomene in den Griff zu bekommen, wird Chlorothalonil, ein Multi-Site- Wirkstoff, regelmässig als Mischungspartner verwendet. Seit 2010 sind Fungizide auf der Basis von SDHI (Succinate Dehydrogenase Inhibitors) zur Bekämpfung der Septoria-Blattdürre auf dem Markt erschienen. Die SDHI, welche auch Carboxamide genannt werden, entsprechen eigentlich einer älteren Familie von Fungiziden, welche seit 1970 zur Saatgutbehandlung gegen Basidiomyceten (z.B. die Erreger des Weizenflugbrandes oder des Weizensteinbrandes; Rheinheimer 2012) verwendet wurden. Das älteste Molekül dieser Familie, das heute noch verwendet wird, ist das Carboxin, welches 1968 eingeführt wurde. Die Entdeckung von Boscalid im Jahre 2003 hat dieser Fungizidfamilie neuen Schub vermittelt, da dieses Molekül auch gegen Ascomyceten aktiv ist. Diese Ausdehnung des Wirkungsspektrums hat es erlaubt, die SDHI-Fungizide gegen Blattkrankheiten des Getreides einzusetzen. Dies hat bei den Pflanzenschutzfirmen ein erneutes Interesse an dieser Fungizidfamilie geweckt und zur Entwicklung neuer Moleküle wie Isopyrazam oder Bixafen geführt. Angesichts der Resistenzentwicklung gegenüber den Qoi und den DMI ist es von Interesse, über ein neues Bekämpfungswerkzeug gegenüber der Septoria-Blattdürre zu verfügen. Bis heute ist kein Stamm von *M. graminicola* im Feld entdeckt worden, welcher gegen Carboxamide resistent war (FRAC 2012), aber im Labor wurden resistente Mutanten gefunden (Skinner *et al.* 1998; Fraaije *et al.* 2012). Allerdings wurden im Feld resistente Stämme bei andern Pathogenen wie *Botrytis cinerea* oder *Sclerotinia sclerotiorum* (FRAC 2012) gefunden. Die Carboxamide hemmen in den Mitochondrien ein Enzym der Atmungskette (Komplex II); ein unentbehrliches Glied für die Energieerzeugung in den Pilzzellen. Bei den resistenten Stämmen ist dieses Zielenzym leicht modifiziert (Substitution einer oder mehrerer Aminosäuren) sodass das Fungizidmolekül sich nicht mehr korrekt an seinen Wirkungsort anlagern kann. Das Risiko für eine Resistenzentwicklung bei *M. graminicola* gegenüber den SDHI-Fungiziden wird als mittel bis hoch eingeschätzt. Um die Entwicklung der Resistenz beim Pathogen zu verfolgen, muss die Grundsensitivität (Basislinie) bekannt sein. Dieser Ausgangspunkt ist wichtig, um die Wirksamkeit von resistenzvorbeugenden Massnahmen beurteilen zu können. Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, im Agroscope-Labor einen Sensitivitätstest für grossangelegte Studien zu erarbeiten und die Basislinie für drei SDHI-Wirkstoffe zu defi-

### Zusammenfassung

Seit kurzem ist zur Bekämpfung der Septoria-Blattdürre eine neue Gruppe von Fungiziden, die Carboxamide oder SDHI, verfügbar. Das Risiko für eine Resistenzentwicklung von *Mycosphaerella graminicola* gegenüber dieser Wirkstoffgruppe wird als mittel bis hoch eingeschätzt. Vorsichtsmassnahmen sind daher bei der Anwendung angezeigt, damit die Wirksamkeit der Carboxamide möglichst lange erhalten bleibt. Eine Folgeüberwachung der Resistenz könnte nötig werden, falls die Wirkung im Feld nicht mehr ausreichend ist. Um dies zu ermöglichen, wurde ein Protokoll erstellt, um die Empfindlichkeit der Stämme auf breiter Basis zu prüfen. Die Grundempfindlichkeit von 117 Stämmen dieses Pathogens wurde *in vitro* gegenüber drei SDHI-Wirkstoffe untersucht. Diese Daten stellen eine Basislinie dar, welche bei Bedarf als Vergleichspunkt dienen kann. Um die Entwicklung von Resistenzen zu verhindern oder zu verlangsamen, werden in einer ersten Phase die Carboxamide auf Getreide nur einmal pro Kultur eingesetzt und dies nur in Mischung mit Wirkstoffen aus anderen Resistenzgruppen.



**Abb. 1** | Wachstum von *Mycosphaerella graminicola* (Stamm 11–02) bei sieben Konzentrationen von Boscalid (blaue Punkte) und  $EC_{50}$  (gelbes Dreieck), berechnet mittels einer logarithmischen Regression (Modell = schwarze Linie).

nieren, nämlich für Boscalid, Bifaxen und Isopyrazam. Falls sich in der Zukunft eine Resistenanalyse als nötig erweisen sollte als Folge von Zweifeln an der Wirksamkeit dieser Moleküle, ist somit ein Vergleichspunkt vorhanden.

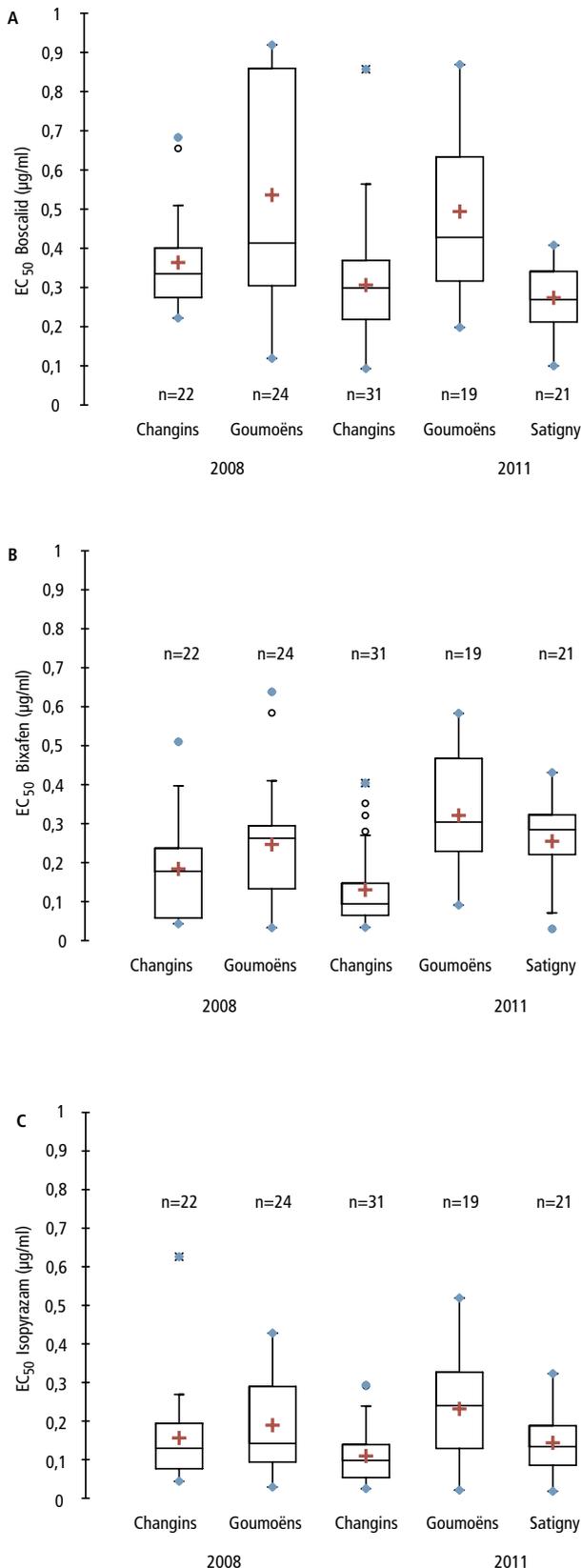
## Material und Methoden

Von Blattläsionen wurden insgesamt 127 Stämme von *M. graminicola* isoliert. Im Jahre 2008 stammte das Pflanzenmaterial (Sorte Arina) von Changins (VD) und von Goumoëns-la-Ville (VD); im Jahre 2011 stammte das Material von denselben Orten (Sorten Arina und Tapidor) sowie von Satigny (Sorten Zinal und Levis). Für die Sensitivitätstests (Modifizierte Methodik nach G. Stammler BASF) wurden die Stämme während sieben Tagen auf Hefe-Malz-Agar inkubiert (YMA: 4 g Hefeextrakt, 4 g Malzextrakt, 4 g Saccharose, 15 g Agar, in 1 l bi-distilliertem Wasser, 50 mg Aureomycin). Zur Förderung des hefeförmigen Wachstums wurden die Stämme mit nahem UV-Licht behandelt. Die mit einem Baumwollstängel entnommenen Sporen wurden in Suspension in ein flüssiges Hefe-Bacto-Glycerol Milieu gebracht, welches doppelt konzentriert war (YBG: 20 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, 40 ml Glycerin in 1 l bi-distilliertem Wasser). Die Sporenkonzentration wurde auf  $1,6 \cdot 10^4$  Sporen/ml eingestellt.

Alle drei Aktivsubstanzen (Fluka) wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst um eine Ausgangslösung von 1 g/l zu erhalten. Die endgültigen Konzentrationen der Wirkstoffe betragen 0, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 6.5 und 10 µg/ml bei einer konstanten Konzentration von DMSO von 1%. Auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen wurden 50 µl der Sporensuspension mit 50 µl der Fungizidlösung in Kontakt gebracht. Jeder Test enthielt eine Negativprobe (Milieu YGB ohne Sporen) und wurde dreimal wiederholt. Die Platten wurden sieben Tagen in Dunkelheit bei 18 °C unter Schütteln inkubiert. Dann wurde das Wachstum durch Messung der Absorption bei 405 nm mit Hilfe eines Messgerätes für Mikrotiterplatten (MRX Reader, Dynex technologies) erhoben. Die Empfindlichkeit gegenüber den Fungiziden wurde durch jene Menge definiert, welche das Wachstum zu 50% zu hemmen vermochte ( $EC_{50}$ ). Diese  $EC_{50}$  wurden mit Hilfe von logarithmischen Regressionen mit vier Parametern (Abb. 1) mit XLSTAT (Version 2011.2.04, Addinsoft 1995–2011) berechnet.

## Resultate

Die Methodik ist angepasst worden, um verlässliche und reproduzierbare Resultate zu erhalten. Die Sensitivitätstests sind in Mikrotiterplatten durchgeführt worden,



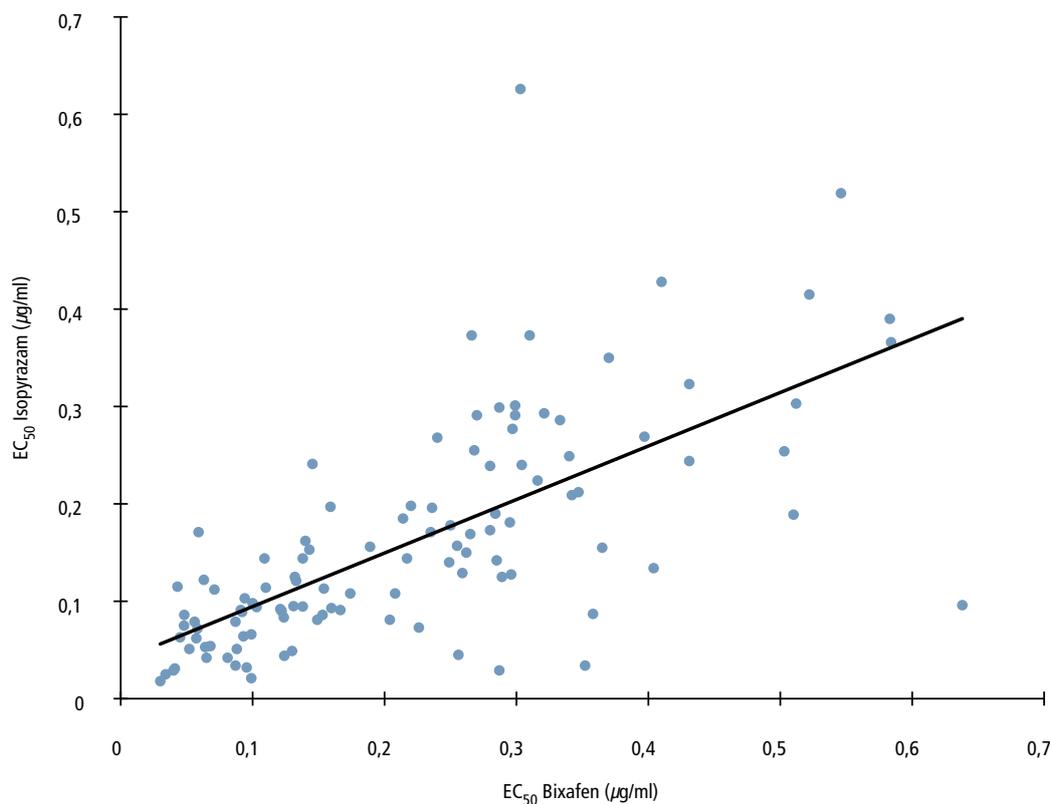
**Abb. 2** | Empfindlichkeit von fünf Populationen von *M. graminicola* gegenüber (A) Boscalid, (B) Bixafen und (C) Isopyrazam. (Box Plots: 50% der Werte befinden sich im Rechteck, horizontale Linie = Median, rotes Kreuz = Mittelwert)

was erlaubt hat, eine relativ grosse Anzahl (117) von *M. graminicola* Stämmen zu studieren. Um das Wachstum um 50% zu hemmen, war eine grössere Menge Boscalid nötig ( $EC_{50}$  zwischen 0,093 und 0,919  $\mu\text{g/ml}$ , im Mittel 0,388  $\mu\text{g/ml}$ ) als dies bei den beiden andern Aktivsubstanzen der Fall war (Kruskal-Wallis  $K = 98,3$ ,  $P < 0,0001$ ; Abb. 2). Bixafen ( $EC_{50}$  zwischen 0,030 und 0,638  $\mu\text{g/ml}$ , im Mittel 0,217  $\mu\text{g/ml}$ ) war etwas weniger wirksam *in vitro* als Isopyrazam ( $EC_{50}$  zwischen 0,018 und 0,626  $\mu\text{g/ml}$ , im Mittel 0,161  $\mu\text{g/ml}$ ). Zwischen den beiden Testjahren 2008 und 2011 gab es keine signifikanten Unterschiede. Bei 46 Stämmen aus dem Jahre 2008 war die Resistenz gegenüber Strobilurinen vorgängig bereits bekannt. Die gegenüber Strobilurinen resistenten und sensiblen Stämme wiesen gegenüber Carboxamiden kein signifikant unterschiedliches Sensitivitätsprofil auf. Innerhalb der Carboxamide war die Sensitivität hingegen korreliert. Die Sensitivität gegenüber Bifaxen war stark an jene gegenüber Isopyrazam gebunden ( $R^2 = 0,47$ ,  $P < 0,0001$ ; Abb. 3). Die Korrelation zwischen Boscalid und Isopyrazam war etwas weniger eng ( $R^2 = 0,31$ ,  $P < 0,0001$ ) und jene zwischen Bixafen und Boscalid war am schwächsten ( $R^2 = 0,17$ ,  $P < 0,0001$ ).

## Diskussion

Die Grundempfindlichkeit von Schweizer *M. graminicola* Stämmen gegenüber den Carboxamiden wurde geschätzt. Diese Basislinie dient als unerlässlicher Vergleichspunkt für jegliche zukünftige Empfindlichkeitsstudie. Dafür ist ein Protokoll an unsere Laborbedingungen angepasst worden. Der Konzentrationsbereich der eingesetzten Fungizide war angemessen. Die Verwendung von zwei zusätzlichen Konzentrationen zwischen 0,1 und 1  $\mu\text{g/ml}$  würde eine präzisere Schätzung des  $EC_{50}$ -Wertes erlauben. Es ist relativ heikel, die Bedingungen zusammenzubringen, welche ein hefeförmiges und homogenes Wachstum (unerlässlich für eine quantitative Messung) von *M. graminicola* hervorbringen und dies in Gefässen von lediglich 6,5 mm Durchmesser.

Die erhaltenen  $EC_{50}$ -Werte (Mittel- und Bereichswerte) entsprechen jenen, die für andere Stämme von *M. graminicola* beschrieben worden sind (Sierotzki *et al.* 2010; Fraaije *et al.* 2012). Die Bereichswerte sind relativ breit. Um das Wachstum der Stämme zu hemmen ist bei Boscalid eine grössere Dosis nötig als bei Bixafen oder Isopyrazam. Gemäss einem Strukturmodell der Interaktionen zwischen den Carboxamiden und ihres Zielenzym im Pathogen ist die Affinität (Bindungskraft) von Boscalid mit den Proteinen des Komplexes II geringer als jene der beiden anderen Wirkstoffe (Fraaije *et al.* 2012). Zwischen den Carboxamiden und den Strobilurinen haben



**Abb. 3** | Kreuzsensitivität bei *M. graminicola* zwischen Bixafen und Isopyrazam (Lineare Regression  $y = 0,55x + 0,04$ ;  $n = 111$ ).

wir keine Kreuzresistenz beobachtet; es handelt sich um zwei Fungizidfamilien mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen. Hingegen war die Empfindlichkeit gegenüber den Carboxamiden kreuzkorreliert, was sich leicht erklären lässt, da die drei untersuchten Moleküle den selben Zielort (Bindungsstelle) und denselben Wirkungsmechanismus aufweisen. Man spricht von Kreuzsensitivität. Konkret bedeutet dies, dass ein Stamm, der gegenüber einem Molekül Resistenz entwickelt, auch gegenüber den beiden andern Molekülen resistent wird. Es wurden Massnahmen ergriffen, um das Risiko einer Resistenzentwicklung in natürlichen Populationen von *M. graminicola* zu minimieren. Die Carboxamide werden nicht Solo gegen die Septoria-Blattdürre eingesetzt, aber in Mischung mit Triazolen, welche einen andern Wirkungsmechanismus aufweisen und zu welchen keine Kreuzresistenz besteht. Ausserdem ist nur eine Behandlung pro Kultur gegen Blattkrankheiten in Getreide

zugelassen. Diese zwei Massnahmen sollten ausreichen, um das Risiko einer Verbreitung von resistenten Stämmen zu begrenzen, und die Wirksamkeit der Carboxamide auf lange Zeit zu gewährleisten. ■

**Riassunto****Sensibilità iniziale ai fungicidi SDHI (carbrossamidici) della septoriosi del frumento**

E' da poco disponibile una nuova famiglia di fungicidi, i carbrossamidici o SDHI per lottare contro la septoriosi del frumento. Il rischio di sviluppare delle resistenze nella *Mycosphaerella graminicola* verso questa famiglia è stimato da medio a elevato. E' dunque necessario prendere delle precauzioni nell'uso per conservare il più lungo possibile l'efficacia dei carbrossamidici. Un monitoraggio delle resistenze potrebbe essere necessario se l'efficacia in campo non è più soddisfacente. A questo scopo è stato stabilito un protocollo per testare su larga scala la sensibilità dei ceppi. La sensibilità iniziale di 117 ceppi di questo patogeno verso tre sostanze attive della famiglia dei SDHI è stata valutata *in vitro*. Questi dati formano una «linea di base» e potrebbero, al bisogno, servire come punto di confronto. Per prevenire e frenare, in un primo tempo, lo sviluppo di resistenze, i carbrossamidici sono applicati su cereali solo una volta per coltura e sono utilizzati unicamente miscelati con delle sostanze attive appartenenti a un altro gruppo di resistenza.

**Summary****Baseline sensitivity of septoria leaf blotch to SDHI fungicides**

Since recently, a new class of fungicides is available to control Septoria leaf blotch of wheat, the so-called carboxamides or SDHI. The risk of resistance development in *Mycosphaerella graminicola* to SDHI fungicides is estimated to be medium to high. Therefore the implementation of an anti-resistance strategy is necessary to preserve the efficacy of these fungicides. Sensitivity studies may be necessary in case field efficacy weakens. Thus, a method was established to conduct large-scale sensitivity tests in our laboratory. The sensitivity to three SDHI active substances (boscalid, bixafen and isopyrazam) of 117 Swiss *M. graminicola* strains was measured *in vitro*. These data describe the «baseline sensitivity» (initial sensitivity level prior to the introduction of the fungicides) and may be used in case of control failures to detect potential shifts in sensitivity. At the moment, to prevent resistance emergence and build up, SDHI fungicides are applied on cereals only once per crop and are used only in mixtures with partners having a different mode of action.

**Key words:** EC<sub>50</sub>, baseline sensitivity, resistance, septoria leaf blotch, wheat.

**Literatur**

- Fraaije B. A., Bayon C., Atkins S., Cools H. J., Lucas J. A. & Fraaije M. W., 2012. Risk assessment studies on succinate dehydrogenase inhibitors, the new weapons in the battle to control Septoria leaf blotch in wheat. *Molecular Plant Pathology* **13** (3), 263–275.
- FRAC, 2012. Succinate dehydrogenase inhibitor (SDHI) working group. Minutes of the 5th meeting on December 6, 2011. Zugang: <http://www.frac.info> [6. November 2012].
- Rheinheimer J., 2012. Succinate dehydrogenase inhibitors: anilides. In: Modern crop protection compounds (Eds. W. Krämer, U. Schirmer, P. Jeschke & M. Witschel). Wiley, Weinheim, 627–639.
- Sierotzki H., Frey R., Morchoisne M., Olaya G., Mösch M. & Scalliet G., 2010. Sensitivity of fungal pathogens to SDHI fungicides. In: Modern fungicides and antifungal compounds VI (Eds. H. W. Dehne, H. B. Deising, U. Gisi, K. H. Kuck, P. E. Russel & H. Lyr). DPG, Braunschweig, 179–186.
- Skinner T., Bailey A., Renwick A., Keon J., Gurr S. & Hargreaves J. A., 1998. A single amino acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics* **34** (5), 393–398.