

Srovnání rezistence ke strobilurinovým fungicidům u braničnatky pšeničné na území ČR mezi lety 2003–2015

(Comparison of septoria leaf blotch resistance to strobilurine fungicides on the territory of the Czech Republic in period 2003–2015)

Tvarůžek L., Svačinová I., Matušinsky P., Váňová M.

Agrotest fyto, s.r.o.

Souhrn: Braničnatka pšeničná je významným patogenem pšenice v České republice. Cílem této práce bylo srovnat úroveň rezistence jejího původce - *Mycosphaerella graminicola* ke strobilurinovým fungicidům na území České republiky v delším časovém horizontu. Byly testovány populace z let 2003, 2004 a 2015 a jako srovnávací účinná látka byl použit picoxystrobin. V letech 2003 a 2004 byly záchyty snížené citlivosti k fungicidu pouze ojedinělé. Naopak v roce 2015 již 47,3 % testovaných izolátů vykazovalo zvýšenou úroveň rezistence k picoxystrobinu. Zjištěný posun v reakci *M. graminicola* na strobiluriny je velmi významný a je tedy nutno striktně dodržovat pravidla antirezistentní strategie.

Klíčová slova: *Mycosphaerella graminicola*, pšenice, QoI fungicidy, rezistence

Abstract: Septoria tritici blotch of wheat is an important pathogen of wheat in the Czech Republic. The aim of this study was to compare the level of resistance to strobilurine fungicides in *Mycosphaerella graminicola* populations in the Czech Republic in the long term view. Populations originating in years 2003, 2004, 2015 were tested and the active ingredient picoxystrobin was used. In years 2003 and 2004, there were found reduced sensitivity to fungicide sporadically. On the contrary, more than 47 % of the evaluated strains showed an increased level of resistance to picoxystrobin in 2015. The detected shift in reaction of *M. graminicola* to strobilurins is very important and it is necessary to follow the rules of antiresistant strategy.

Key Words: *Mycosphaerella graminicola*, wheat, QoI fungicides, resistance

Úvod

Stobiluriny jsou částí skupiny tzv. QoI inhibitorů, které působí v dýchacím řetězci fytopatogenních hub. Inhibují přenos elektronů na membránách mitochondrií a brání tak růstu cíleného houbového organismu. Na trh byly uvedeny v roce 1996 a za období 20 let používání se jejich řada významně rozšířila. Vlastnosti jednotlivých zástupců této skupiny se liší jak v účinnosti na jednotlivé patogeny, tak ve fyzikálně-chemických a biokinetických vlastnostech, které se promítají například do možnosti a rychlosti jejich translokace v rostlinných pletivech (Bartlet a kol., 2002). První výskyt rezistence *M. graminicola* k těmto fungicidům byl zaznamenán v roce 2001 ve Velké Británii a během následujících let se rezistence s vysokou frekvencí šířila celou Evropou (Fraaije a kol., 2002). Náš kolektiv rezistencí prokázal na pozemcích v okolí Kroměříže v roce 2011 (Matušinsky a kol., 2011). Rostoucí význam braničnatky pšeničné mezi původci listových skvrnitostí pšenice nastal v rámci celé Evropy na přelomu tisíciletí. Za hlavní faktory, které k tomuto stavu přispěly, jsou považovány citlivost hostitelské rostliny (odrůd v rozšířených pěstovaných kolekcích), zvýšené hnojení dusíkem, minimalizační technologie zpracování půdy a také vývoj rezistence k některým skupinám fungicidů (Bayles, 1991).

Cílem této práce bylo srovnat úroveň rezistence ke QoI fungicidům v dílčích populacích na území České republiky v delším, více než desetiletém časovém horizontu. Jako srovnávací účinná látka byl použit picoxystrobin.

Materiál a metody

V letech 2003, 2004 a 2015 byly vytvořeny kolekce izolátů *Z. tritici*, pocházející z provozních ploch na území České republiky. Rostlinný materiál byl odebírán v době jarní regenerace, kdy se porosty ozimé pšenice nacházely ve stadiu plného odnožování. Jednotlivé listy s příznaky choroby (léze s pyknidami), byly umístěny na vlhký filtrační papír a inkubovány při pokojové teplotě 24 hodin. Pyknidy uvolní cerry s pyknosporami. Pyknospory v rámci jedné pyknidy vznikají nepohlavním množení a jsou geneticky jednotné. Sterilní jehlou

byl přenesen takto uvolněný obsah jednotlivých pyknid na samostatné Petriho misky s bramborovo-dextrozovým agarem (PDA) a inkubován při 20 °C 5 dní ve tmě. Následně byly vyříznuty disky mycelia o průměru 1,5 mm a přeneseny na bramborový agar, do kterého byl přidán streptomycin a testovaný fungicid. Koncentrační řada fungicidu byla 0,0, 0,01, 0,1, 1,0 a 10,0 µg ml⁻¹. Inkubace probíhala po dobu 14 dnů a následně byl měřen průměr kolonií (obr. 1). Pomocí probitové analýzy byla vypočtena hodnota ED50 (µg ml⁻¹) jako parametr, vyjadřující koncentraci, při které je růst houby redukován na polovinu.

Výsledky a diskuze

Celkem 47,3 % izolátů v roce 2015 z celkového počtu 55 testovaných vykazovalo zvýšenou úroveň rezistence k picoxystrobinu (ED50 byla vyšší než 10,0 µg.ml⁻¹ viz graf č. 1). Popsanou metodou bylo zjištěno (obr. 2), že z celkového počtu odebraných vzorků byl k picoxystrobinu ve Středočeském kraji ze tří hodnocených izolátů jeden citlivý, Plzeňském kraji z šesti izolátů tři citlivé, Zlínském kraji ze šestnácti izolátů deset citlivých, v Jihomoravském kraji ze sedmnácti izolátů sedm citlivých, v Moravskoslezském kraji z pěti izolátů tři izoláty citlivé, v Olomouckém kraji žádný izolát nebyl rezistentní a pět bylo citlivých, z kraje Vysočina ze tří izolátů nebyl žádný citlivý. Situace u hodnocených populací o 12 resp. 13 let dříve byla významně odlišná. V té době byly zaznamenány jen ojedinělé záchyty snížené citlivosti k fungicidu. Jelikož se jednalo pouze o senzitivní jedince, reakce na fungicid byla u jednotlivých testovaných izolátů podobná, tedy v hodnoceném souboru existovala jen nízká variabilita. V minulém roce byla situace odlišná. Izoláty se na základě vypočtených hodnot ED50 rozdělily do dvou skupin; první se senzitivními a druhé s rezistentními izoláty. To vedlo kromě zvýšení průměrné hodnoty ED50 také ke zvýšení variability naměřených dat (graf. 2). V grafu č. 1 je jako nejvyšší hodnota ED50 uvedeno 10 µg ml⁻¹, protože jsme tuto hodnotu používali jako nejvyšší testovanou koncentraci.

Skutečné hodnoty ED50 jsou však u rezistentních jedinců mnohem vyšší a to až v řádu tisíců, jelikož mutace genu pro cytochrom b v pozici 143 přítomná v našich izolátech má vysoký faktor rezistence, který se pohybuje řádově ve stovkách až tisících. Dávka fungicidu by tedy musela být stokrát až tisíckrát zvýšena, aby bylo dosaženo stejného efektu jako u citlivého izolátu. V praxi je něco takového nemyslitelné a takovéto izoláty jsou brány jako plně rezistentní.

Lze předpokládat, že nárůst rezistence v populacích braničnatky pšeničné v posledních letech v Západní Evropě se promítne i do úrovně rezistence na našem území. Zdá se být oprávněným očekávat, že tato reakce bude přicházet se zpožděním a v menším výpadku účinnosti. Již dříve byla Západní Evropa označována v tomto smyslu za oblast s vysokým rizikem výskytu, země Střední Evropy s rizikem středním (Matušínský a kol, 2011).

Důvodů může být více, pravděpodobně rozhodujícím bude obecně intenzita použití daných fungicidních látek. Protože tyto přípravky patřily po dobu patentové ochrany jednotlivých Qol účinných látek k dražším skupinám, byly používány vesměs jednorázově a ne celoplošně. Přesto je zjištěný posun v reakci velmi významný.

V žádném případě však není možné hovořit o neúčinnosti fungicidů, které Qol obsahují. Použití těchto látek je v současné době stále efektivní, což jsme prokázali v našich srovnávacích pokusech (Tvarůžek a kol., 2015).

Je třeba se striktně držet pravidel antirezistentních strategií, mezi něž patří především používání fungicidních směsí ať již přímo ve formulovaných přípravcích, nebo samostatně kombinovaných. Strobiluriny navíc dobře účinkují na rzi nebo *Rhynchosporium secalis*. Zpracování a zveřejnění antirezistentních strategií pro hlavní rizikové skupiny fungicidních účinných látek zajišťuje FRAC (Fungicide Resistance Action Committee), složený ze zástupců výrobců fungicidních účinných látek. FRAC také sleduje a eviduje výskyt rezistence, cíleně plánuje výzkum rezistence a vydává doporučení k problematice rezistence pro chemický průmysl, poradce a pěstitele.

Stále aktuálním a zajímavým řešením snižujícím riziko vývoje rezistence se jeví využití fungicidních účinných látek s kontaktním a nikoliv úzce specifickým místem účinku. Jedná se o chlorothalonil, ale i další řadu látek (například sloučeniny síry), většinou již dříve používané v ochraně rostlin.

Není bez zajímavosti, jak reagují populace patogenů na fungicidy s rozdílnými mechanismy účinku. Populace patogena je složena z jedinců s různými vlastnostmi a tedy i s různou citlivostí vůči danému fungicidu. Jestliže budeme opakovaně používat danou účinnou látku, bude podíl rezistentní populace patogena narůstat (citliví jedinci budou potlačeni a rezistentí se rozšíří). Takový fungicid ztratí svou praktickou účinnost. Jestliže tuto látku používat přestaneme, populace patogena se u některých skupin fungicidů (např. DMI) začne navracet do původního stavu, tzn. opět začne narůstat podíl jedinců k této látce citlivých. Důvodem je nižší fitness jedinců s rezistencí, kteří jsou zvýhodněni pouze v době, kdy je vytvořen seleční tlak fungicidní látkou.

To však pravděpodobně neplatí v případě rezistence braničnatky ke strobilurinům, protože jak ukazují různé studie, mutace genu pro cytochrom b na pozici 143 nemá na fitness braničnatky vliv. Dá se tedy předpokládat, že se rezistence braničnatky ke strobilurinům bude udržovat v populacích ještě dlouho po té, co se tyto látky používat přestanou.

V poslední době byly do praktické ochrany proti braničnatce pšeničné, ale i celé řadě dalších chorob zavedeny látky ze skupiny inhibitorů sukcinát dehydrogenázy (SDHI). Skupina těchto systemických fungicidů blokuje funkci sukcinát dehydrogenázy, což je důležitý enzym pro respiraci. Riziko

rezistence *M. graminicola* je považováno za střední až středně vysoké. V našich testech s populací izolátů braničnatky pšeničné z poslední sezóny 2015 bylo 100 % izolátů plně senzitivních (ED50 populace = 0,04 µg ml⁻¹). Rezistentní izoláty *M. graminicola* však již byly zachyceny v polních podmínkách před třemi lety ve Francii a vloni jeden případ v Irsku.

Závěr

V našich testech jsme zjistili, že v dílčích populacích původce braničnatky pšeničné došlo na území ČR k obecnému snížení citlivosti k Qol fungicidům. Výrazně se zvýšil podíl rezistentních izolátů, který v roce 2015 dosahoval téměř poloviny testovaného souboru. Proto lze doporučit kombinované fungicidy, obsahující více účinných látek s různým mechanismem účinku a střídání jednoplošné fungicidy s víceplošnými.

Tomu by měl předcházet celý soubor agronomických zásahů, od výběru odrůd, technologie zpracování půdy až po osevni sled. Vzhledem k tomu, že braničnatka pšeničná je chorobou velmi destruktivní s výrazným vlivem na výnos ozimé pšenice, je v širokém zájmu sledovat účinnost všech uvedených možností k tomu, abychom zabránili širšímu rozšíření rezistence.

Poděkování

Tato publikace vznikla v rámci institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace RO0211 a projektu QJ1530373.

Literatura

Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B. (2002): The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci* 58: 649–662.

Bayles, R.A. (1991): Varietal resistance as a factor contributing to the increased importance of *Septoria tritici* Rob. and Desm. In the UK wheat Crop Plant Varieties and Seeds 4: 177–183.

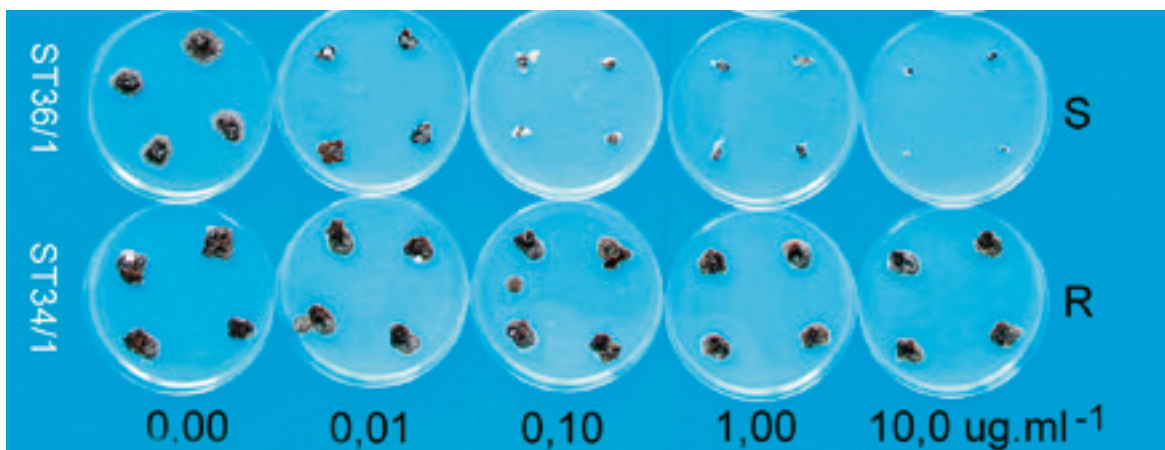
Fraaije, B.A., Butters, J.A., Coelho, J.M., Jones, D.R., Hollomon, D.W. (2002): Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* using quantitative allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR GreenI. *Plant Pathol* 51: 45–54.

Matušínský, P., Tvarůžek, L., Vyšehlíková, M., Horáčková, S. (2011): Potvrzení výskytu rezistence ke strobilurinům u *Mycosphaerella graminicola* (anamorph.: *Septoria tritici*) v oblasti Kroměříže. *Obilnářské listy*, 19, 2011, 3–4, 51–53

Tvarůžek, L., Růžková, S., Jergl, Z., Matušinsky, P., Svačinová, I.: Účinnost vybraných fungicidů na původce významných listových chorob pšenice ozimé v roce 2015, 2015, *Obilnářské listy*, 23, s. 35–39.

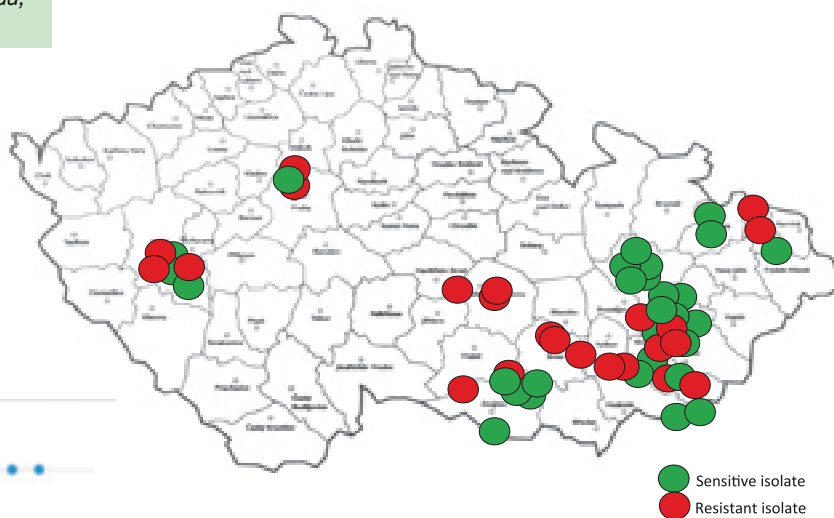
Vincelli, P. 2002. Q_oI (Strobilurin) Fungicides: Benefits and Risks. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2002-0809-02. Updated, 2012.



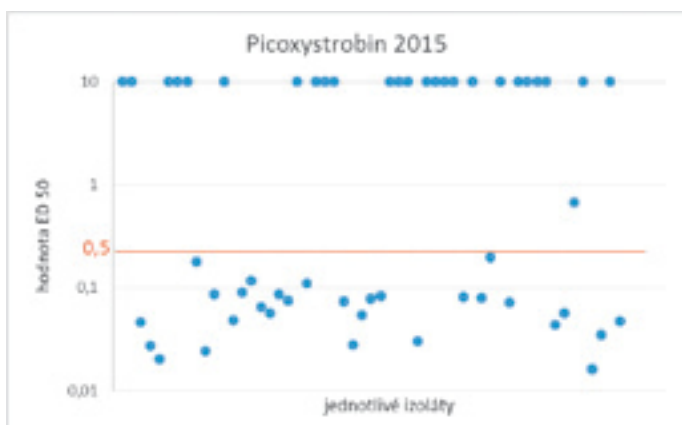


Obr. 1: Ukázka biotestu s izoláty *Z. tritici* na Petriho miskách. (řádky – jednotlivé izoláty, sloupce – koncentrace fungicidu, R – rezistentní, S – citlivé)

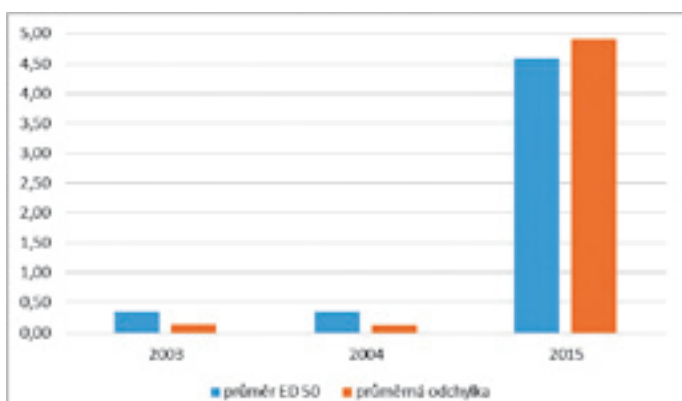
Septoria tritici – Picoxystrobin resistance screening – 2015



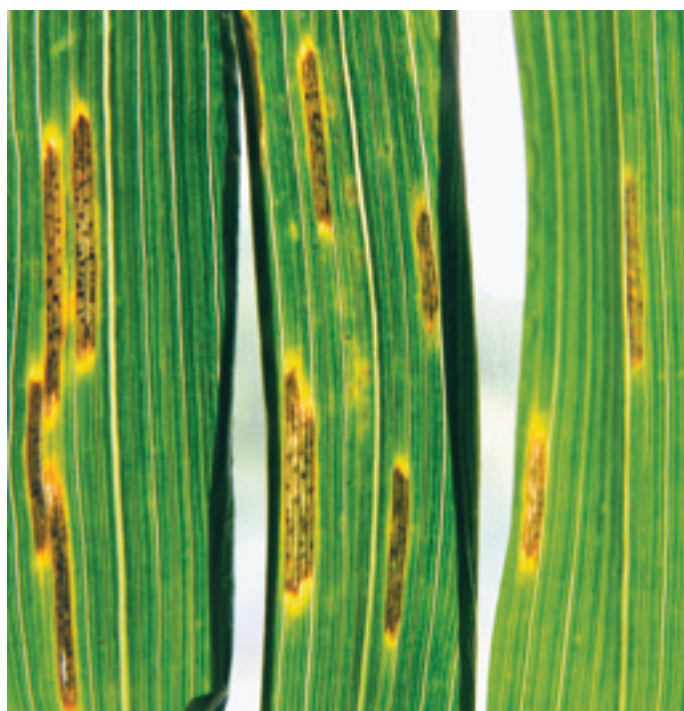
Obr. 2: Výskyt rezistentní reakce *Z. tritici* v roce 2015



Graf 1: Hodnota ED₅₀ µg ml⁻¹ pro picoxystrobin u jednotlivých izolátů v roce 2015



Graf 2: Průměrná hodnota a variabilita v reakci mezi hodnocenými izoláty v jednotlivých letech



M. graminicola – pyknidy (plodnice) na listech ozimé pšenice