

Hodnocení úrovně rezistence *Zymoseptoria tritici* a *Ramularia collo-cygni* k strobilurinům, azolům, SDHI a picolinamidovým fungicidům na území ČR (Evaluation of resistance level in *Zymoseptoria tritici* and *Ramularia collo-cygni* to strobilurins, azoles, SDHI a picolinamide fungicides in the Czech Republic)

Tvarůžek Ludvík, Svačinová Ivana, Blažková Kateřina, Matušinsky Pavel, Hambálková Markéta
Agrotest fyto, s.r.o., Havlíčkova 2787, Kroměříž

Souhrn: Populace patogenů *Z. tritici* a *R. collo-cygni* pocházející z území ČR byly hodnoceny na výskyt snížené citlivosti k fungicidním látkám azoxystrobin, prothioconazole, fluxapyroxad a fenpicoxamid. Extrémně vysoká hodnota faktoru ED50 byla zjištěna v roce 2020 u obou patogenů v reakci na azoxystrobin. *Z. tritici* tuto rezistentní reakci vykázala i v letech 2018 a 2019. V roce 2020 vzrostl podíl izolátů se sníženou citlivostí k prothioconazole ve srovnání s rokem 2019, přesto hodnota ED50 byla jen mírně zvýšena. Citlivost na fluxapyroxad a fenpicoxamid byla absolutní.

R. collo-cygni se vyskytla v reprezentativním pokrytí pro hodnocení rezistence na území ČR v roce 2020 po několika letech. Více než 80 % izolátů projevilo sníženou citlivost k prothioconazole. Také část populace vykázala sníženou citlivost na fluxapyroxad. Minimální počet izolátů byl méně citlivý na fenpicoxamid.

Klíčová slova: *Z. tritici*, *R. collo-cygni*, fungicidy, azoxystrobin, prothioconazole, fluxapyroxad, fenpicoxamid, zistence

Abstract: The populations of *Z. tritici* and *R. collo-cygni* were collected from the territory of the Czech Republic and evaluated in resistance to azoxystrobin, prothioconazole, fluxapyroxad and fenpicoxamid. Extremely high ED50 level was found in both pathogens to azoxystrobin in 2020.

Z. tritici showed high level of insensitivity also in 2018 and 2019. The number of low sensitive isolates to prothioconazole increased significantly in 2020 compare with season 2019 although the ED50 level was only jently increasing. The sensitivity to fluxapyroxad and fenpicoxamid was absolute in 2020.

R. collo-cygni occurrence allowed this screening in 2020 after a few years of non-regular pathogen distribution in the aimed territory. More then 80 % of isolates were less susceptible to prothioconazole. Also a part of population showed slight decrease of sensitivity to fluxapyroxad. Minimal number of isolates showed lower sensitivity to fenpicoxamid

Key Words: *Z. tritici*, *R. collo-cygni*, fungicides, azoxystrobin, prothioconazole, fluxapyroxad, fenpicoxamid, resistance

Úvod

Fungicidy představují řadu látek z různých chemických skupin, s různými způsoby účinku, které jsou používány k prevenci nebo kontrole chorob a tím k uchování zdravých plodin. Řada houbových patogenů má však tendenci vzniku rezistence k fungicidům. Existuje řada faktorů, které vývoj rezistence ovlivňují - biologie patogena, načasování a počet provedených aplikací, to, zda se jedná o účinné látky s jedním nebo více místy účinku a nebo zda jsou používány sólo formulace či vícesložkové přípravky.

Listová skvrnitost způsobená patogenem *Zymoseptoria tritici* (teleomorph. *Mycosphaerella graminicola*, česky septoriová skvrnitost pšenice nebo bráničnatka pšeničná) je významným onemocněním pšenice v České republice, ale i v rámci Evropy. Patogen s velkým potenciálem působení výrazného výnosových ztrát si v posledních letech vytvořil široce rozšířenou rezistenci k strobilurinům i azolům. V případě strobilurinů se jedná o jednobodovou mutaci označovanou G143A, která je označována jako kvalitativní, bez ztráty patogenity izolátů. Rezistence k azolům je naproti tomu kvantitativní podstaty, u které dochází k hromadění více bodových mutací v genu CYP51 a některé izoláty projevují známky ztráty vitality.

Podobnou závažnou listovou chorobou, jakou je bráničnatka pšeničná při pěstování pšenice, je ramuláriová nebo také tmavohnědá endofytická skvrnitost listů ječmene (*Ramularia collo-cygni*) pro ječmeny. Nekrotické skvrny se žlutým ohraničením se objevují nejdříve ve fázi metání, kvetení, ale většinou ještě později. Onemocnění je charakteristické velmi rychlým rozvojem příznaků napadení, která může způsobit

odumření listů během několika málo dnů. Nejprve se objevují drobné tmavě hnědé až černé skvrnky. Později vznikají typické symptomy, které jsou obdélníkového tvaru, tvarované podél listové nervatury. Na starších listech a v pozdějších fázích vývoje choroby jsou na spodní straně listů pomocí lupy nebo i pouhým okem rozpoznatelné, do řad uspořádané, bílé shluky konidioforů.

Azoly i strobiluriny byly klíčovými chemickými skupinami fungicidních látek, které sehrály zásadní roli ve vytvoření a zavedení systému preventivní ochrany proti chorobám obilnin. Vývoj rezistence u *Z. tritici* právě v těchto fungicidních skupinách však vyvolal kritickou potřebu zavedení nových účinných látek s odlišným módem účinku, který by eliminoval vzniklou necitlivost. Agrochemický průmysl reagoval na tuto potřebu před několika lety zavedením nové skupiny carboxamidů (inhibitorů sukcinát-dehydrogenázy, zkráceně SDHI). Tato skupina sice není originálně objevenou až v posledních letech, ale doposud nebyla využívána ve foliárních fungicidech. Po zavedení účinné látky boscalid proti pravému stéblolamu v roce 2003 následovaly v roce 2010 látky z další generace této skupiny. Byl to fluxapyroxad (BASF Crop Protection), bixafen (Bayer Crop Science), penthiopyrad (DuPont Crop Protection) a isopyrazem (Syngenta). Jako poslední v řadě pak v roce 2016 následoval benzovindiflupyr (Syngenta).

Široké využívání SDHI vytváří v posledních letech opět vzrůstající selekční tlak na vznik rezistence. Je třeba vnímat, že jako obrana proti jejímu rozšíření jsou fungicidní přípravky s obsahem SDHI formulovány ve vícekomponentních směsích a to často s látkami ze skupiny strobilurinů i azolů, tedy s výše

uvedenými riziky existence populací s menší citlivostí k nim. To vše si žádá další vývoj a hledání nových účinných látek.

Před nedávnou dobou se podařilo v laboratořích firmy Dow AgroScience ve spolupráci s Meiji Seika Pharma Co. Ltd identifikovat novou účinnou látku fenpicoxamid (Inatreq) ze skupiny picolinamidů. Je určena především k využití v obilninách a primárně byla izolována z fermentačních směsí aktinomycet *Streptomyces* sp. (Shibata a kol., 1998). Picoliamidy působí rovněž v mitochondriálním komplexu patogena, ale v jiném

1,5 mm a přeneseny na bramborový agar, do kterého byl přidán streptomycin a testovaný fungicid.

V letech 2019–2020 byla hodnocena reakce populací obou patogenů na následující fungicidní účinné látky: prothioconazole, azoxystrobin a fluxapyroxad. V roce 2020 byla nově testována také účinná látka fenpicoxamid.

Koncentrační řada fungicidů byla 0,0 - 0,01 - 0,1 - 1,0 - 10,0 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Inkubace probíhala po dobu 14 dnů a následně byl měřen průměr kolonií. Pomocí probitové analýzy byla vypočtena

Tab. 1: Hodnoty faktoru rezistence k fungicidům (ED50) pro populace *Zymoseptoria tritici* a *Ramularia collo-cygni* z území ČR v roce 2020

Patogen	Počet izolátů	Fungicid	ED50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ v populaci
<i>Z. tritici</i>	75	Prothioconazole	1,30 (73,3% rezistentních izolátů)
		Azoxystrobin	398,95 (66,7% rezistentních izolátů)
		Fenpicoxamid	0,07 (0,0% rezistentních izolátů)
		Fluxapyroxad	0,12 (0,0% rezistentních izolátů)
<i>R. collo-cygni</i>	51	Prothioconazole	18,21 (80,7% rezistentních izolátů)
		Azoxystrobin	100,09 (69,2% rezistentních izolátů)
		Fenpicoxamid	0,18 (3,8% rezistentních izolátů)
		Fluxapyroxad	0,58 (36,5% rezistentních izolátů)

vazebním místě než strobiluriny, neexistuje tedy společné cílové místo v metabolismu, které by zvyšovalo riziko vzniku rezistence.

Obě výše uvedené listové choroby jsou velmi závažné a způsobují významné hospodářské škody. Cílem této práce bylo porovnat výsledky víceletého sledování úrovně rezistence v populacích těchto listových patogenů pšenice a ječmene a potvrdit význam nezbytnosti zavádění nových fungicidních látek s odlišným způsobem účinku oproti dlouhodobě i krátkodobě používaným a zavedeným fungicidním látkám. Tato studie je zaměřena na hodnocení populací v České republice jako součásti evropského pěstitelského prostoru z pohledu geografie i populační dynamiky.

Materiál a metody

Byly vytvořeny kolekce izolátů *Z. tritici* a *R. collo-cygni*, pocházející z provozních ploch na území České republiky. Rostlinný materiál (listy) byl odebírán v době jarní regenerace, kdy se porosty ozimé pšenice nacházely ve stadiu plného odnožování pro odběr *Z. tritici* a ve fázi voskové zralosti zrna pro odběr *R. collo-cygni*.

Tab. 2: Zastoupení izolátů *Z. tritici* rezistentních ke strobilurinovým fungicidům (2018–2020)

Patogen	Počet izolátů celkem	Zastoupení rezistentních izolátů v testu		
		2018	2019	2020
<i>Z. tritici</i>	159	100%	82%	67%

Pozn.: 2018 - picoxystrobin, 2019 a 2020 azoxystrobin

Jednotlivé listy s příznaky choroby byly umístěny na vlhký filtrační papír a inkubovány při pokojové teplotě 24 hodin. Pyknidy nebo konidie byly sterilní jehlou přeneseny na samostatné Petriho misky s bramborovo-dextrozovým agarem (PDA) a inkubovány ve tmě. Každý získaný izolát patogenů byl popsán informacemi o místě původu, názvu odrůdy a historii jejího pěstování. Následně byly vyříznuty disky mycelia o průměru

hodnota ED50 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) jako parametr, vyjadřující koncentraci, při které je růst houby redukován na polovinu.

Výsledky a diskuse

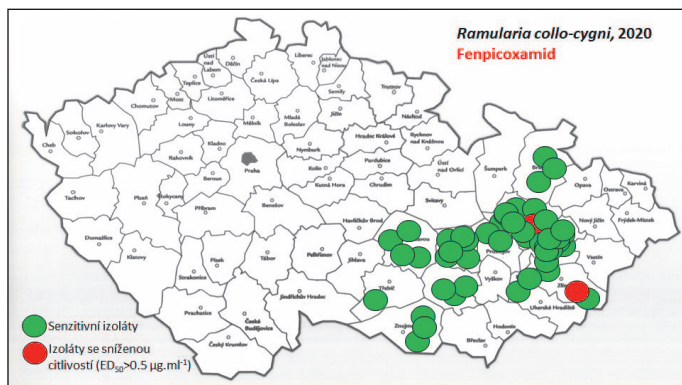
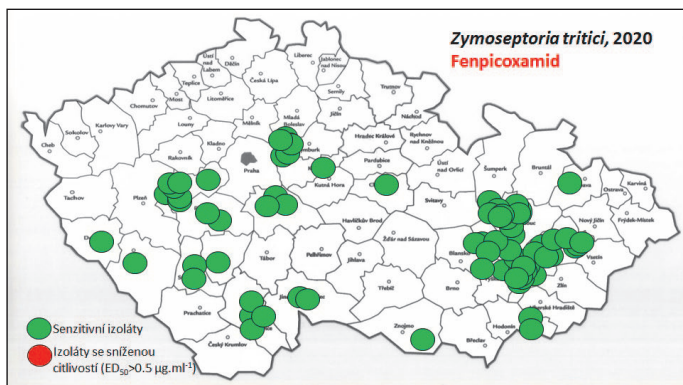
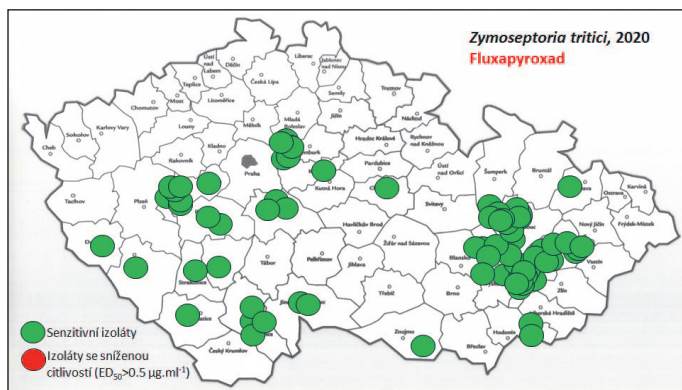
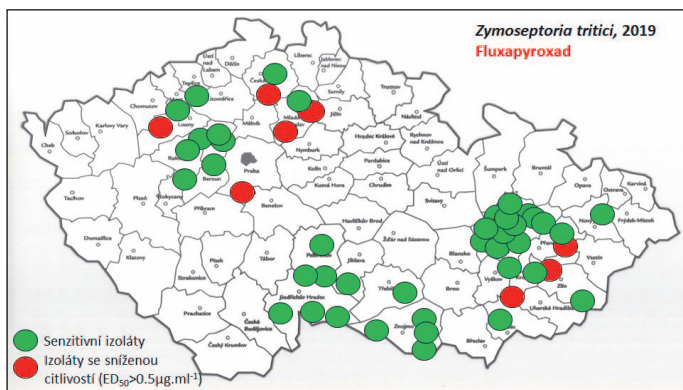
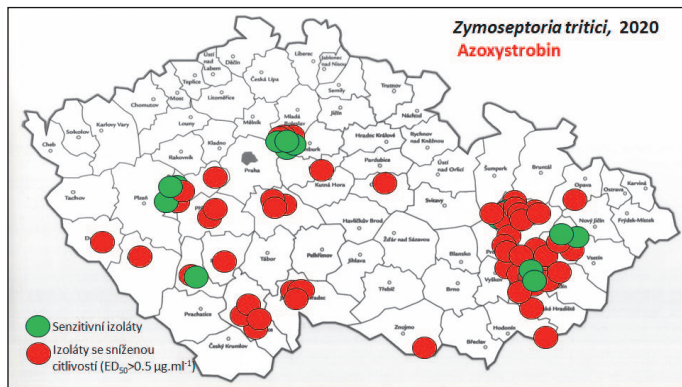
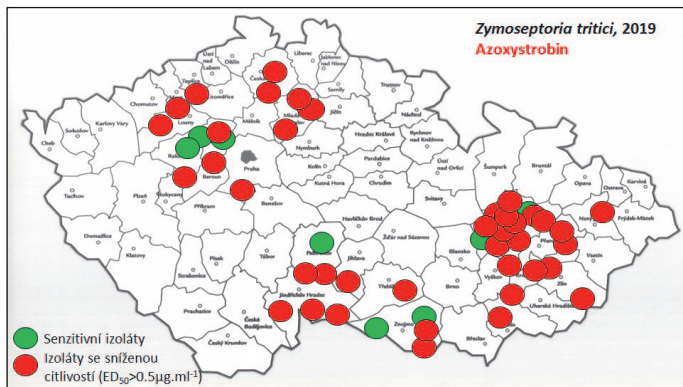
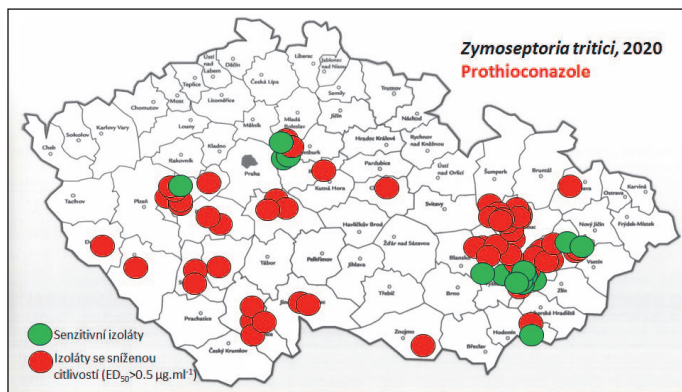
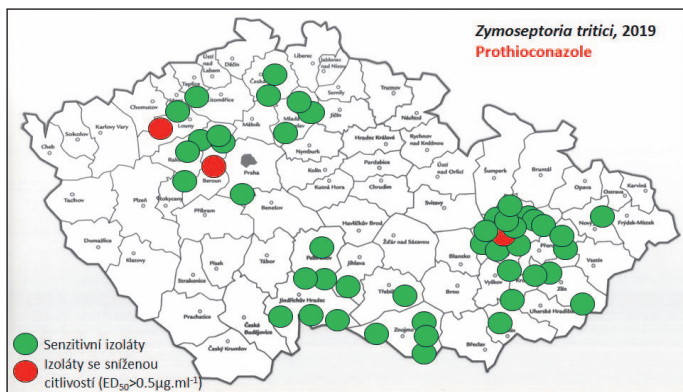
Z výsledků vyplynulo, že poměrně vysoký podíl izolátů *Z. tritici* (přes 70 %) vykazoval v minulém roce sníženou citlivost k prothioconazolu (tab. 1), ED50 však jen mírně překračovala hodnotu 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Rezistence populace k azoxystrobinu vykazovala dvoutřetinová část populace při tom, že byla i extrémně vysoká hodnota průměrné ED50.

Větší zastoupení méně citlivých izolátů v minulém roce ve srovnání s rokem 2019 je názorně vidět na obr. 1 a 2. Tato změna se týká všech odběrových oblastí a neměla regionální charakter. Lze předpokládat, že se vyšší hodnoty ED50 odvíjejí v souvislosti s vysokým nárůstem aplikací s účinnou látkou prothioconazole, která je obsažena v celé řadě používaných přípravků. Druhým důvodem může být odlišná klimatická situace v obou letech, kdy se rok 2020 po delší době navrátil k deštivému průběhu konce vegetace, čímž měly fytopatogenní

houbové organismy optimální podmínky pro šíření a rozvoj a populační variabilita se mohla výrazněji rozvinout. V případě azoxystrobinu vidíme podobnou celoplošně rozšířenou rezistenci v obou letech (obr. 3 a 4), její nárůst je patrný po delší řadu let. Již

v roce 2015 jsme zjistili podíl rezistentních izolátů v ČR na úrovni 47 % populace (Tvarůžek a kol., 2016), mezi roky 2018 až 2020 byla úroveň rezistence k strobilurinům mezi 70 až 100 % (tab. 2). Podobných dřívějších zjištění z různých částí Evropy existuje celá řada (Siah a kol., 2010).

Účinné látky fluxapyroxad i fenpicoxamid prokázaly v roce 2020 absolutní kontrolu choroby bez selekce rezistentních



izolátů. V případě účinné látky fluxapyroxad byl v roce 2019 zaznamenán výskyt několika izolátů se zvýšenou hodnotou rezistence, v roce 2020 se však situace neopakovala a reakce patogenu byla plně citlivá (obr. 5, 6 a 7). Fenpicoxamid jako látka, která na území ještě není používána, je podle předpokladů plně efektivní a bez záchytů rezistentních izolátů.

Více než 80 % izolátů *Ramularia collo-cygni* s řádově vyšší průměrnou hodnotou ED50 vykazovalo rezistenci k ú. I. prothioconazole (tab. 1). Část populace *Ramularia collo-cygni* (36%) vykazovala mírné snížení citlivosti k fluxapyroxadu, ale opět jen s nepatrným překročením hodnoty ED50 - 0,5 µg.ml⁻¹ (Obr 8).

V posledních letech byl zaznamenán v Evropě záchyt izolátů *Ramularia colo-cygni* s mutacemi zodpovědnými za snížení citlivosti k látkám ze skupiny inhibitorů sterolu a také inhibitorů sukcinát dehydrogenázy. Tento jev je pozorovatelný v počínajícím stádiu i na našem území, kde jsme již v roce 2018 zachytili jeden izolát s výraznou úrovní rezistence k látkám ze skupiny SDHI. V souvislosti s těmito zjištěními je důležitý i fakt, že platnost povolení pro chlorothalonil v Evropské Unii letos končí a nadále nebude možno tuto látku používat. Byla to jedna z látek, která zajišťovala k této chorobě maximálně efektivní ochranu (Tvarůžek a kol., 2017). V našich testech, podobně jako v případě *Zymoseptoria tritici*, i na *Ramularia collo-cygni* vykazoval sníženou citlivost k fenpicoxamidu pouze minimální podíl izolátů (obr. 8).

Podobně jako u *Z. tritici* dosahoval podíl rezistentních izolátů *R. collo-cygni* k azoxystrobinu 70 % a to opět při vysoké hodnotě ED50.

Závěr

Listové choroby obilnin patří k těm, které mají největší význam při snižování asimilační plochy rostlin, a tudíž výrazně ovlivňují nejen celkový výnos sklizeného zrna, ale i jeho kvalitu. Mezi nejdůležitější z nich patří u pšenice septoriová skvrnitost a u ječmene společně se síťovitou skvrnitostí také ramulárióvá skvrnitost. My jsme se zaměřili na jejich původce a sledovali jsme reakci izolátů těchto patogenů k vybraným fungicidním látkám.

V roce 2020 se po několika letech kalamitně rozšířila ramulárióvá skvrnitost a tudíž jsme měli možnost v hojně míře sbírat a následně testovat izoláty tohoto patogenu z území České republiky. Proměnlivost podmínek jednotlivých vegetačních ročníků je tak výrazná, že je třeba sledování populací patogenů provádět dlouhodobě a tím v předstihu hledat rizika, která mohou ohrožovat úspěch pěstování zemědělských plodin.

/Recenzováno/

Poděkování

Publikace vznikla s využitím institucionální podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace Agrotest fyto, s.r.o. (MZE-RO1118). Autoři děkují firmě Dow Agrosciences za podporu plošného monitoringu rezistence.

Literatura

Fraaije, B. A., Lucas, J. A., Clark, W. S., Burnett, F. J.: QoI resistance development in populations of cereal pathogens in the UK. Proc. BCPC International Congress: Crop Science and Technology, Glasgow, UK, 10–12 November, Vol. 2, BCPC, Alton, UK, pp. 689–694 (2003).

Owen, W. J., Yao, Ch., Myung, K., Kemmitt, G., Leader, A., Meyer, K. V., Bowling, A. J., Slanec, T., Kramer, V. J.: Biological characterization of fenpicoxamid, a new fungicide with utility in cereals and other crops. Pest Manag Sci. 2017; 73(10): 2005–2016.

Siah, A., Deweer, C., Morand, E., Reignault, P., Halama, P.: Azoxystrobin resistance of French *Mycosphaerella graminicola* strains assessed by four *in vitro* bioassays and by screening of G143A substitution. Crop Prot 29:737–743 (2010).

Shibata, K., Hanafi, M., Fujii, J., Sakanaka, O., Iinuma, K., Ueki, M. *et al*: UK-2A, B, C and D, novel antifungal antibiotics from *Streptomyces* sp. 517–02 III. Absolute configuration of an antifungal antibiotic, UK-2A, and consideration of its conformation. J Antibiot 51:1113–1116 (1998)

Tvarůžek, L., Svačinová, I., Matušinsky, P., Váňová, M.: Srovnání rezistence ke strobilurinovým fungicidům u braničnatky pšeničné na území ČR mezi lety 2003–2015. Obilnářské listy, 24, 2016, 2, 41–43.

Tvarůžek, L., Svačinová, I., Růžková, S., Matušinsky, P.: Využití chlorothalonilu v ochraně obilnin proti houbovým chorobám s vysokým rizikem výskytu rezistence k fungicidům. Obilnářské listy, 25, 2017, 1, 3–7.

