

VYUŽITIE BIOLOGICKÝCH METÓD PRI POTLÁČANÍ VYBRANÝCH HUBOVÝCH PATOGENOV

ROMAN LEONTOVÝČ, ANDREJ KUNCA, VALÉRIA LONGAUEROVÁ
Národné lesnícke centrum – LVÚ Zvolen, Stredisko Lesníckej ochrannárskej služby,
Lesnícka 11, SK – 969 23 Banská Štiavnica, e-mail: leontovyc@nlcsk.org,
kunca@nlcsk.org, longauerova@nlcsk.org,

LEONTOVÝČ R., KUNCA A., LONGAUEROVÁ V.: Application of biological methods for suppression of several fungal pathogens. Lesn. Čas. – Forestry Journal, **56**(4): 383 – 396, 2010, 2 fig., tab. 8., ref. 15. Original paper. ISSN 0323 – 10468

The paper presents results from testing the biological efficiency of antagonistic micro fungi *Trichoderma* sp. and *Pythium oligandrum* Drechsler from 2005 through 2008. The growth speed *in vitro* differed among *Trichoderma* isolates. Sporulation depended on isolates. Age of isolates and temperature had an effect on speed growth and sporulation. Mycelium growth of pathogens in cultures was twice slower than *Trichoderma*. We found a tolerance of *Trichoderma* to fungicides Dithane M 45 and Pomarsol Forte. Biopreparation had a positive effect on health condition of oak seedlings. There were similar results obtained from applying commercial preparations Supresivit and Polyversum as well as from the field isolated *Trichoderma* strains cultivated at the Chemical institute SAV Bratislava.

Key words: *biological control, Trichoderma sp., Pythium oligandrum, health condition, forest nurseries*

Práca uvádza získané poznatky pri testovaní biologickej účinnosti biopreparátov na báze kmeňov *Trichoderma* sp., *Pythium oligandrum* Drechsler v rokoch 2006 – 2008. V laboratórnych pokusoch testované izoláty *Trichoderma* sp. vykazovali na živných pôdach rozdielny rast. Sporulácia závisela od jednotlivého kmeňa, najintenzívnejší rast sa potvrdil pri čerstvých izolátoch. Teplota, ani dĺžka svetelnej periódy, výraznejšie neovplyvnila rýchlosť rastu hýf mycélia húb rodu *Trichoderma*. Rast vegetatívnych orgánov patogénov v čistých kultúrach bol v porovnaní s *Trichoderma* sp. v priemere 2-krát pomalší. Zistila sa určitá tolerancia húb rodu *Trichoderma* voči fungicídnym prípravkom Dithane M 45 a Pomarsol Forte. Získané výsledky pri aplikácii biopreparátov na ochranu sadbového materiálu poukazujú na pozitívny vplyv testovaných biopreparátov na zdravotný a kondičný stav semenáčikov duba v porovnaní s kontrolou. Dobré výsledky sa dosiahli nielen s komerčnými prípravkami Supresivit, Polyversum, ale aj s testovanými kmeňmi poskytnutými Chemickým ústavom SAV v Bratislave.

Kľúčové slová: *biologické metódy, Trichoderma sp., Pythium oligandrum, zdravotný stav, lesné škôlky*

1. Úvod a problematika

Biologické metódy ochrany rastlín predstavujú nasadenie a cieleňú podporu živých organizmov proti patogénom a škodcom. V súčasnom období sú najviac rozpracované spôsoby biologického boja proti škodcom. V období posledných desaťročí sa venuje zvýšená pozornosť biologickej ochrane proti pôvodcom ochorení rastlín. Intenzívne sa využitím biologických metód zaoberá najmä výskum v oblasti poľnohospodárstva.

V boji proti hubovým ochoreniam, najmä v lesných škôlkach, sa používa široké spektrum chemických fungicídnych prípravkov. Priemerná ročná spotreba fungicídnych prípravkov v lesnom hospodárstve dosahuje v posledných rokoch približne 3 tisíc kilogramov. V priebehu dlhodobého používania fungicídnych prípravkov dochádza k vyselektovaniu rezistentných kmeňov hubových patogénov, voči ktorým sa fungicídne prípravky stávajú málo účinné. Navyiac tieto pesticídne prípravky zanechávajú v pôde škodlivé rezíduá cudzorodých látok, ktoré značne redukovujú pôdne symbiotické vzťahy, na ktorých sa zúčastňujú najmä mykorizné huby.

Súčasná ochrana rastlín hľadá nové cesty uplatňovania obranných opatrení zameraných na elimináciu pôsobenia hubových patogénov, najmä vo vzťahu k využívaniu prírody blízkyh produktov. Ide prítom o dlhodobý záujem zdokonaľovať biologické metódy ochrany. Súčasná veda pozná desiatky príkladov antagonisticky a hypovirulentne pôsobiacich kmeňov húb, ktoré majú inhibičné a fungistatické účinky. Štúdium a využívanie takto pôsobiacich mikroorganizmov sa v súčasnom období javí ako veľmi perspektívne z hľadiska ekologizácie metód boja proti škodlivým mikroorganizmom.

Huby z rodu *Trichoderma* sú vo svete jednou z najviac využívaných skupín, ktorá sa používa na biologickú ochranu najmä poľnohospodárskych plodín.

So zástupcami z rodu *Trichoderma* sa môžeme stretnúť na lesných pôdach, najmä v humusových vrstvách, ako aj na poľnohospodárskych pôdach (CHET 1987, WERNER 1993). Druhy z tohto rodu sú taktiež popisované aj na živých rastlinách a sú bezprostredne zviazané aj s drevom stromov. Veľmi často sa vyskytujú vo výrezoch zo stromov, pričom ich úloha v živých stromoch nie je celkom jasná. Veľmi často dochádza aj k tomu, že sa vyskytujú v pletivách súčasne s hubami rodu *Ophiostoma*, pričom pri ich spoločnom raste nebol pozorovaný žiadny antagonizmus (LEONTOVYČ 2000). V laboratórnych pokusoch však takýto antagonizmus bol zistený a to pri použití biopreparátu Supresivit. V tomto prípravku je účinným agens kmeň druhu *Trichoderma harzianum* Rifai, ktorý totálne likviduje kultúru *Ophiostoma* spp. po 6 – 8 dňoch po naočkovaní (FASSATIOVÁ *et al.* 1993).

O možnostiach využitia húb z rodu *Trichoderma* na biologickú ochranu voči širokému spektru fytopatogénnych organizmov pojednáva mnoho autorov (PAPAVIZAS 1985, VELDEMAN 1993, SAMUELS 1996).

Najčastejšie sa na biologickú ochranu využívajú druhy *Trichoderma harzianum* a *T. viridae* Pers. (SAMUELS 1996). Práve *T. harzianum* v kombinácii s inými druhmi rodu *Trichoderma* sa využíva na biologickú ochranu proti niekoľkým ochoreniam, napr. proti hubám rodov *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Pythium* spôsobujúcich padanie rôznych poľnohospodárskych plodín (KOMMEDAHL *et al.* 1981, ELAD *et al.* 1995).

Druhy *Pythium* sp. sú všeobecne rozšírené pôdne huby, ktoré primárne kolonizujú zvyšky rastlín. K svojej výžive využívajú predovšetkým jednoduché cukry a iné organické látky, ktoré čerpajú zo zvyškov rastlín v pôde. Patrí sem niekoľko parazitov rastlín napr. *P. oligadrum* (DEACON 1976, VESELÝ 1997). Uvedení autori podrobne študovali biológiu pomocou ochorenia a možnosti ochrany. Zistili, že *Pythium oligandrum* Drechsler má vynikajúce antagonistické vlastnosti, ktoré sa dajú využiť v ochrane rastlín, pritom parazituje aj na viacerých druhoch rodu *Pythium*.

V podmienkach lesného hospodárstva na Slovensku doposiaľ k intenzívnejšiemu využívaniu antagonistických húb z rodu *Trichoderma* nedošlo. V súčasnom decéniu boli na slovenskom trhu registrované dva prípravky na báze vzdušných spór húb rodu *Trichoderma* a to Trichodex a Trichomil, avšak len pre poľnohospodárske plodiny. Z tohto hľadiska predstavuje testovanie antagonistických húb rodu *Trichoderma* voči hospodársky najvýznamnejším pôvodcom ochorenia v lesnom hospodárstve významný prínos.

Cieľom práce bolo zhodnotenie biologickej účinnosti antagonistických húb rodov *Trichoderma* a *Pythium* a overenie možnosti ich využitia v boji proti fytopatogénnym organizmom v lesnej prevádzke.

2. Materiál a metódy

Testovanie biologickej účinnosti biopreparátov na rast a vývoj húb podmieňujúcich ochorenia sa vykonávalo v laboratórnych podmienkach na živných pôdach. Na testovanie sa používali čisté kultúry jednotlivých bioagens. Nakoľko sa nám nepodarilo zabezpečiť čisté kultúry komerčne vyrábaného biopreparátu Polyversum (*Pythium oligandrum*), testovanie sa vykonávalo na kmeňoch huby *Trichoderma* (tab. 1).

Tabuľka 1. Použité kmene *Trichoderma* sp. testované v laboratórnych podmienkach
Table 1. *Trichoderma* strains tested in vitro

Por. číslo ¹⁾	Biopreparát ²⁾	Pôvod ³⁾
1	<i>Trichoderma harzianum</i>	FYTOVITA, s. r. o.
2	I6-II SAV	Chemický ústav, SAV Bratislava
3	I2-SAV	Chemický ústav, SAV Bratislava
4	<i>Trichoderma</i> sp.	Čifáre, dub, beľ. drevo

¹⁾No., ²⁾Biopreparation, ³⁾Origin

K *in vitro* pokusom sa použila metóda podvojných kultúr, pri ktorej sa testované skupiny (patogén + účinný kmeň antagonistu), naočkovali proti sebe na Petriho misky. Ako médium sa použila 2 % agarová pôda (MEA 2) obsahujúca pivovarnícku sladinu 800 ml, glukózu 1,5 g, agar 19,0 g, H₂O do 1 000 ml.

Testované huby sa pestovali samostatne na MEA 2 pôde s upraveným pH 5 – 6. Po 10 – 14 dňoch boli prenesené za sterilných podmienok v aseptickom boxe, na živnú pôdu, kde sa ukladali dvojice inokulačných kociek o priemere 5 × 5 mm, pričom na jednej kocke boli pôvodcovia ochorenia (*Ophiostoma* sp., *Graphium* sp., *Fusarium* sp., *Botrytis cinerea*, *Armillaria* sp., *Nectria galligena*, *Phomopsis* sp.) a na druhej bol účinný kmeň antagonistu (*Trichoderma* sp.). Dvojice inokulačných kociek sa ukladali vždy ku okrajom Petriho misiek, navzájom proti sebe.

Následne sa podvojnú kultúru kultivovali v klimatizačnom boxe (WTB Binder) pri teplote +20 až +25 °C. V priebehu kultivácie sa každých 24 hodín zaznamenávala rýchlosť rastu hýf mycélia a tvorba inhibičných zón. Rýchlosť rastu sa merala pomocou posuvného mikrometra.

Za účelom overenia tolerancie biopreparátov voči pôsobeniu fungicídnych látok sa vykonali laboratorné testy účinnosti fungicídov voči čistým kultúram patogénnych húb a antagonistickej huby *Trichoderma* sp. Testovanie sa robilo na živnej pôde (MEA 2). Z filtračného papiera sa vystrihol krúžok s priemerom 1 cm, vysterylizoval sa a namočil do namiešaného fungicídneho roztoku. Následne sa 3 rôzne fungicídne krúžky poukladali na povrch živnej pôdy a 4. krúžok namočený v destilovanej vode pre kontrolu. Do stredu Petriho misky sa položilo očko patogénnej, resp. antagonistickej huby. Vzdialenosť fungicídnych krúžkov od testovanej huby bola 1,5 cm. V priebehu nasledujúcich dní sa sledovala rýchlosť rastu hýf mycélia smerom k fungicídny krúžkom a ku kontrolnému krúžku. Vyhodnocovalo sa po 72 hodinách kultivácie pri teplote +24 °C. Testovalo sa 10 fungicídov (tab. 2), a 8 druhov húb (*Graphium* sp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp., *Nectria galligena*, *Phomopsis* sp., *Ophiostoma* sp., *Armillaria* sp.) a 1 kmeň antagonistickej huby *Trichoderma* sp.

Tabuľka 2. Charakteristika fungicídov vybraných pre pokusy s patogénnymi hubami a antagonisticou hubou *Trichoderma* sp.

Table 2. Description of fungicides selected for cultivation test of fungal pathogens and antagonistic strains of *Trichoderma* sp.

Por. číslo ¹⁾	Názov fungicídu ²⁾	Účinná látka ³⁾	Koncentrácia ⁴⁾
1	Aliette 80 WP	osetyl-Al	0,3 %
2	Amistar	azoxystrobin	0,1 %
3	Bumper Super	prochloraz, propiconazole	0,1 %
4	Dithane M 45	mancozeb	0,3 %
5	Fundazol 50 WP	benomyl	0,1 %
6	Merpan 80 WDG	captan	0,2 %
7	Pomarsol Forte	thiram	0,3 %
8	Previcur 607 SL	propamocarb	0,15 %
9	Sulka 80 WP	síra	0,5 %
10	Switch 62,5 WG	cyprodinil, fludioxonil	0,1 %

¹⁾No., ²⁾Name of fungicide, ³⁾Active ingredient, ⁴⁾Concentration

Testovanie biologickej účinnosti biopreparátov sa v terénnych podmienkach vykonávalo v škôlkarskom stredisku Čermošná. Stredisko sa nachádza v blízkosti Rožňavy (310 m n. m.). Pokusy sa vykonávali v priebehu rokov 2006 až 2008 na semenáčikoch duba letného. Testovala sa biologická účinnosť prípravkov Supresivit, Polyversum a dvoch vodných suspenzií vybraných kmeňov *Trichoderma* sp. I–2 a I–6II, ktoré poskytol Biochemický ústav SAV Bratislava. V priebehu pokusov sa testoval vplyv uvedených bioagens na zdravotný a kondičný stav semenáčikov duba v polyetylénovom kryte, v podmienkach JIFFY technológie. Súbežne bol založený pokus aj na voľných záhonoch, kde boli semenáčky umelo infikované hubami rodov *Ophiostoma* a *Fusarium*. Výsevy semien sa uskutočnili začiatkom mája, po 72 hodinách od výsevu boli záhony ošetrené biopreparátmi. Ošetrovanie sa ešte 2-krát zopakovalo v 2-týždňových intervaloch. K jednotlivým variantom boli založené aj kontrolné plochy bez ošetrovania. Vyhodnotenie biologickej účinnosti, ako aj vplyv na kondičný stav semenáčikov sa vykonávalo podľa mortality semenáčikov, hrúbky koreňového krčka, dĺžky hlavného koreňového systému (len pri voľnoko-

renných semenáčikoch) a dĺžky nadzemnej časti. Zároveň sa počítal aj počet vyklíčených semenáčikov. Na aplikáciu boli použité biopreparáty: Supresivit (5 g/10 litrov vody, koncentrácia spór $1,4 \cdot 10^{10}/g$), Polyversum (5 g/10 litrov vody, koncentrácia spór $1,10^7/g$), vodný roztok spór kmeňa I-2 (40 ml/ 10 litrov vody, koncentrácia spór $4,375 \cdot 10^8/ml$) a vodný roztok spór kmeňa I-6II (40 ml/ 10 litrov vody, koncentrácia spór $1,36 \cdot 10^8/ml$). V polyetylénovom kryte bolo ošetrovaných každým prípravkom 640 semenáčikov, na záhonoch sa ošetrovali plochy o výmere 14 m².

V rokoch 2006 – 2008 prebehlo testovanie biologickej účinnosti vybraných kmeňov *Trichoderma* sp. I2 a I6-II proti patogénnym hubám a zároveň ich vplyv na rastové vlastnosti semenáčikov duba. Testovanie prebehlo v lesnej škôlke Jovice (okres Rožňava). Výsevy semien sa vykonali začiatkom mája, zároveň krátko po výseve boli záhony ošetrované roztokom so spórami testovanými kmeňmi *Trichoderma* sp. Aplikovaná koncentrácia spór kmeňa I2 a I6-II bola 40 ml spórovej suspenzie na 10 litrov vody. Ošetrovanie sa dvakrát po 2 týždňoch zopakovalo. Vyhodnotenie sa uskutočnilo na konci vegetačnej sezóny. K jednotlivým variantom boli založené aj kontrolné plochy bez ošetrovania.

Vplyv testovaných biopreparátov na mortalitu a rastové parametre sadeníc sa analyzoval pomocou regresnej analýzy, analýzou variácie. Štatistická významnosť jednotlivých veličín sa testovala na hladine významnosti $P < 0,05$ (Tuckey test). Vyhodnocovali sa znaky: hrúbka koreňového kččka, dĺžka koreňa, výška sadenice. Zároveň sa počítal počet vyklíčených semenáčikov na 1 m². Počet vyklíčených semenáčikov bol hodnotiacim kritériom pre zhodnotenie ich napadnutia patogénnymi hubami.

3. Výsledky

3.1. Rast mycélia húb *Trichoderma* sp.

Rast hýf mycélia jednotlivých kmeňov húb rodu *Trichoderma* nebol vo všetkých prípadoch rovnomerný. Napriek tomu, že *Trichoderma* sp., je schopná rásť v extrémnych teplotách aj pri teplotách okolo 3 – 5 stupňov, najlepšie rastové ukazovatele dosahovala pri teplotách od +20 do +24 °C. Najrýchlejšie rástli izoláty č. 6, 9, 15. Naopak najlepšia tvorba konídií sa zaznamenala pri kmeňoch I6-II SAV a I2 – SAV (tab. 3). Na základe vyššie zistených skutočností najlepšie parametre vykazoval biologický preparát s obsahom konídií *Trichoderma* sp. z izolátu č. 36 označený ako I2-SAV. Rýchlosť rastu nie je najväčšia, avšak má veľmi dobrú tvorbu konídií a zároveň rast mycélia nie je inhibovaný pôsobením mycélia patogénov.

Rovnako vhodné boli aj ďalšie 2 izoláty a to I6-II SAV a 26.

Izoláty I2 a I6-II sa nasledovne využili na testovanie v lesných škôlkach v priebehu rokov 2006 až 2008.

3.2. Testovanie biologickej účinnosti biopreparátov v laboratórnych podmienkach

V laboratórnych pokusoch sa hodnotilo niekoľko parametrov rastu hýf mycélia čistých kultúr húb *Trichoderma* sp. Vybrali sa 4 kmene húb rodu *Trichoderma*. Jeden sa získal z čistej kultúry producenta, 2 kmene z Chemického ústavu SAV Bratislava a jeden z izolácie z beľovej časti dreva. (tab. 4). Biologická účinnosť sa testovala na podvojných kultúrach s 8 rôznymi kmeňmi patogénnych húb. Účinnosť *Trichoderma* sp. sa overovala podľa rýchlosti rastu mycélia, tvorba konídií a inhibície mycélia v podvojných kultúrach s patogénnymi hubami.

Rast hýf mycélia jednotlivých kmeňov húb z rodu *Trichoderma* nebol vo všetkých prípadoch rovnomerný. Napriek tomu, že *Trichoderma* sp., je schopná

Tabuľka 3. Rýchlosť rastu mycélia *Trichoderma* sp., tvorba konídií po 3 dňoch kultivácie pri +24 °C a 12 hodinovom svetelnom režime a tvorba inhibičných zón *Trichoderma* sp. v podvojných kultúrach s patogénmi

Table 3. Speed of *Trichoderma* mycelial growth, conidiogenesis after 3 days under 24 °C and 12 hours light regime and creation of inhibition zones of *Trichoderma* in double cultures with pathogens

Por. číslo ¹⁾	Kmeň ²⁾	Izolát č. ³⁾	Rýchlosť rastu [cm] ⁴⁾	Tvorba konídií ⁵⁾	Inhibícia mycélia <i>Trichoderma</i> sp. ⁶⁾
1	<i>Trichoderma</i> sp.	6	6,2	+	+
2	<i>Trichoderma</i> sp.	9	5,2	++	-
3	<i>Trichoderma</i> sp.	10	2,9	-	-
4	<i>Trichoderma</i> sp.	12	3,1	++	++
5	<i>Trichoderma</i> sp.	14	0,6	-	-
6	<i>Trichoderma</i> sp.	15	5,0	+	-
7	<i>Trichoderma</i> sp.	23	2,5	++	-
8	<i>Trichoderma</i> sp.	26	2,4	+++	-
9	<i>Trichoderma</i> sp.	33	2,7	++	-
10	I6–II SAV	35	2,6	+++	-
11	I2–SAV	36	2,7	+++	-
12	<i>Trichoderma</i> sp.	37	2,6	+++	+

Vysvetlivky – Explanatory notes:

a) – konídie sa netvorvia – *Conidiogenesis*: – no presence of conidia, + slabá tvorba nezrelých bielych konídií – slight occurrence of white not ripe conidia, ++ slabá tvorba už zrelých zelených konídií – slight occurrence of green ripe conidia, +++ intenzívna tvorba už zrelých zelených konídií – strong occurrence of green ripe conidia; b) sivým podfarbením sú označené vhodné izoláty podľa jednotlivých kritérií – grey colour of cells shows selected strains with good quality; c) – bez inhibície mycélia *Trichoderma* sp. – *Inhibition*: – without inhibition of *Trichoderma* mycelium, + slabá inhibícia – slight inhibition, ++ stredne silná inhibícia – moderate inhibition, +++ silná inhibícia – strong inhibition

¹⁾No, ²⁾Genus, ³⁾Strain, ⁴⁾Speed of growth, ⁵⁾Conidiogenesis, ⁶⁾Inhibition of mycelial growth of *Trichoderma* sp.

rásť v extrémnych teplotách aj pri teplotách okolo 3–5 stupňov, najlepšie rastové ukazovatele dosahovala pri teplotách od +20 do +24 °C. Najrýchlejšie rástol izolát č. 15 a 37. Naopak najlepšia tvorba konídií sa zaznamenala pri kmeňoch I6–II SAV a I2 – SAV (tab. 4). Na základe vyššie zistených skutočností najlepšie parametre vykazoval biologický preparát s obsahom konídií *Trichoderma* sp. z izolátu č. 36 označený ako I2–SAV.

K fungicídum, ktoré boli najúčinnnejšie proti testovaným hubám a teda prejavili najširšie spektrum účinnosti, patrili Bumper Super, Fundazol 50 WP a Switch 62,5 WG (tab. 5). Tieto fungicídy nie sú teda vhodné pre použitie v kombinácii s biopreparátmi na báze *Trichoderma* sp., pretože veľmi účinne inhibovali aj rast jej mycélia. Na druhej strane, len pri chemickej ochrane sú tieto tri fungicídy veľmi vhodné k aplikáciám a kombináciám, keďže sú schopné účinne pôsobiť proti širokému spektru patogénov.

Tabuľka 4. Rýchlosť rastu hýf mycélia *Trichoderma* sp., tvorba konídií po 72 hodinách kultivácie pri +24 °C, 12 hodinovom svetelnom režime a tvorba inhibičných zón bioagens v podvojných kultúrach s patogénmi

Table 4. Speed of growth of *Trichoderma* culture, conidiogenesis after 72 hours in 24 °C and 12 hours light regime, and inhibition zones formation in double cultures (pathogen and bioagents)

Por. číslo ¹⁾	Kmeň ²⁾	Izolát č. ³⁾	Rýchlosť rastu [cm] ⁴⁾	Tvorba konídií ⁵⁾	Inhibícia hýf mycélia <i>Trichoderma</i> sp. ⁶⁾
1	<i>T. harzianum</i>	15	6,2	++	+
2	I6-II SAV	35	2,6	+++	+
3	I2-SAV	36	2,7	+++	+
4	<i>Trichoderma</i> sp.	37	3,1	++	++

Poznámka – Notes:

Tvorba konídií – *Conidiogenesis*: + slabá tvorba nezrelých bielych konídií – *slight occurrence of white not ripe conidia*, ++ slabá tvorba už zrelých zelených konídií – *slight occurrence of green ripe conidia*, +++ intenzívna tvorba už zrelých zelených konídií – *strong occurrence of green ripe conidia*.

Inhibícia hýf mycélia *Trichoderma* sp. – bez inhibície mycélia – *Inhibition*: – *without inhibition of Trichoderma mycelium*, + slabá inhibícia – *slight inhibition*, ++ stredne silná inhibícia – *medium inhibition*, +++ silná inhibícia – *strong inhibition*.

¹⁾No., ²⁾Genus, ³⁾Strain, ⁴⁾Speed of growth, ⁵⁾Conidiogenesis, ⁶⁾Inhibition of pathogen mycelia by *Trichoderma* sp.

Tabuľka 5. Výsledky hodnotenia rastu hýf mycélia jednotlivých patogénov a zoznam fungicídov, ktoré najintenzívnejšie inhibovali rast hýf mycélia jednotlivých húb

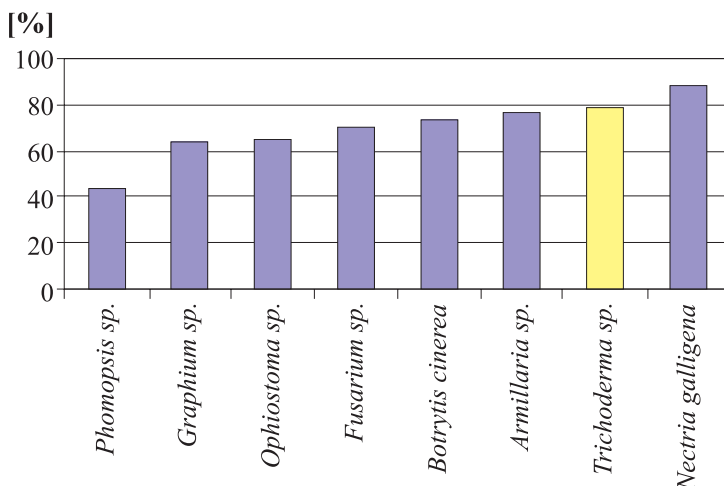
Table 5. Results of the assessment of mycelium growth of pathogens and list of fungicides that inhibited mycelia growth of tested pathogens

Pôvodca ¹⁾	Dĺžka hýf mycélia v cm ²⁾		Zoznam najúčinnějších fungicídov ⁵⁾
	kontrola bez fungicídov ³⁾	priemer z 10 fungicídov ⁴⁾	
<i>Graphium</i> sp.	2,3	1,14	Switch 62,5 WG Fundazol 50 WP
<i>Botrytis cinerea</i>	2,77	2,04	Bumper Super
<i>Fusarium</i> sp.	1,58	1,11	Fundazol 50 WP Switch 62,5 WG
<i>Nectria galligena</i>	1,23	1,08	Bumper Super
<i>Ophiostoma</i> sp.	1,21	0,78	Fundazol 50 WP Bumper Super
<i>Armillaria</i> sp.	0,5	0,37	Switch 62,5 WG Bumper Super
<i>Phomopsis</i> sp.	2,58	1,14	Bumper Super Switch 62,5 WG
<i>Trichoderma</i> sp.	2,27	1,77	Bumper Super Fundazol 50 WP

¹⁾Pathogen, ²⁾Length of mycelia colony, ³⁾Without fungicides, ⁴⁾Average from 10 fungicides, ⁵⁾Most effective fungicides

Určitá tolerancia bola zistená voči fungicídny prípravkom, Dithane M 45 a Pomarsol Forte. Naopak počas laboratórnych testov najširšie spektrum účinnosti voči rastu *Trichoderma* sp. mali fungicídne prípravky Bumper Super a Fundazol 50 WP a Switch 62,5 WG (tab. 5). Teda tieto fungicídy nie sú vhodné pre použitie s biopreparátmi na báze *Trichoderma* sp., nakoľko veľmi účinne inhibovali rast jej mycélia.

Na väčšinu fungicídov najcitlivejšie reagovala huba *Phomopsis* sp. Citlivosť húb rodov *Graphium*, *Ophiosstoma* a *Fusarium* voči uvedeným fungicídmi bola na úrovni 50 až 60 % (obr. 1). Fungicídmi sa znížil rast hýf mycélia húb v priemere o viac ako polovicu oproti rastu bez fungicídov. Huba, u ktorej sa prejavila najmenšia citlivosť na fungicídy bola *Nectria galligena*. V priemere došlo k zníženiu rastu len o 12 %. Podobne náročný je aj boj s hubami *Botrytis cinerea*, *Armillaria* sp. a *Trichoderma* sp. V prípade húb rodu *Trichoderma* to znamená určitú odolnosť voči niektorým fungicídmi. Počas testov najviac inhibovali jej rast fungicídy Bumper Super a Fundazol 50 WP.



Obr. 1. Priemerný rast hýf mycélia, vypočítaný z 10 fungicídov, vyjadrený v percentách z rastu hýf mycélia bez použitia fungicídov

Fig. 1. Average mycelial growth counted from interaction of 10 different fungicides described as a percentage of growth without fungicides.

3.3. Testovanie biologickej účinnosti biopreparátov v ŠS Čermošná

Testovanie biologickej účinnosti v polyetylénovom kryte:

V polyetylénov kryte sa v priebehu obdobia rokov 2006 až 2008 zistil pozitívny vplyv biopreparátov na zdravotný a kondičný stav semenáčikov duba. Najlepšie výsledky sa získali s prípravkom Supresivit, ktorý mal pozitívny vplyv nielen na zdravotný stav, ale aj na výškový a hrúbkový prírastok semenáčikov.

Najnižší počet odumretých semenáčikov sa zaznamenal pri použití biopreparátu Supresivit, pri aplikácii ktorého došlo k odumretiu 57 semenáčikov duba čo je 9 % z celkového množstva hodnotených semenáčikov (tab. 6). Pri biopreparáte Polyversum dosahoval počet odumretých semenáčikov 71 (12 %), pri kontrole to bolo 109 semenáčikov, čo predstavuje (17,4 %).

Tabuľka 6. Počet vyklíčených semenáčikov, vplyv biopreparátov na rast nadzemnej časti a koreňového krčka; aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka, hodnoty s rozdielnym písmenom sa odlišujú významne v rámci stĺpca, $P < 0,05$, $n = 640$

Table 6. Number of sprouted seedlings, effect of biopreparation on growth and root collar development; average \pm standard deviation, $P < 0.05$, $n = 640$

Použitý biopreparát ¹⁾	Priemerný počet vyklíčených semenáčikov ²⁾	Priemerná výška sadenice $\pm s_x$ ³⁾	Priemerná hrúbka koreňového krčka $\pm s_x$ ⁴⁾
Supresivit	583 \pm 31 a	33,16 \pm 7,67 a	5,28 \pm 1,07 a
Polyversum	569 \pm 27a	31,49 \pm 7,53 a	4,94 \pm 0,74 ab
Kontrola ⁵⁾	531 \pm 7 a	28,93 \pm 7,28 a	4,31 \pm 0,71 b

¹⁾Biopreparation, ²⁾Average number of sprouted seedlings, ³⁾Average height of saplings, ⁴⁾Average diameter of root collar, ⁵⁾Control

Na rast nadzemnej časti semenáčikov mal najvýraznejší vplyv biopreparát Supresivit, v porovnaní s kontrolou sa zaznamenal v priemere vyšší prírastok o 42 mm. Taktiež pri aplikácii prípravku Polyversum sa dosiahlo vyšších prírastkov ako pri kontrole (tab. 6).

Ošetrenie semenáčikov duba biopreparátom Supresivit priaznivo vplývalo na hrúbku koreňového krčka. Menej významne sa prejavil vplyv biopreparátu Polyversum (tab. 6).

Testovanie biologickej účinnosti biopreparátov na voľnej ploche:

Jednotlivé biopreparáty mali pozitívny vplyv na počet vyklíčených semenáčikov duba. Najviac semenáčikov duba vyklíčilo po použití kmeňa I–6II, Supresivit a Polyversum, a najnižší počet sa zaznamenal pri kontrole (tab. 7).

Priaznivý vplyv jednotlivých biopreparátov na rast nadzemnej časti semenáčikov sa zistil u všetkých prípravkov. Najväčší vplyv na rast nadzemnej časti semenáčikov duba mal kmeň I–6II a biopreparát Polyversum (tab. 7).

V terénnych pokusoch sa zaznamenal pozitívny vplyv jednotlivých kmeňov *Trichoderma* sp. na rast koreňového systému. Na priemer koreňového kĺčka semenáčikov duba mal najvýraznejší vplyv (štatisticky významný) oproti kontrole kmeň I–6II. Vplyv ostatných kmeňov huby *Trichoderma* sp. a biopreparátu Polyversum nebol štatisticky významný, aj keď kontrola v priemere vykazovala menší priemer koreňového krčka (tab. 8).

Tabuľka 7. Počet vyklíčených semenáčikov na voľných záhonoch na m² a výška sadeníc; aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka, hodnoty s rozdielnym písmenom sa odlišujú významne v rámci stĺpca, P < 0,05

Table 7. Number of sprouted seedlings on seedbeds [m²] and height of saplings; average ± standard deviation, P < 0.05

Použitý biopreparát ¹⁾	Priemerný počet vyklíčených semenáčikov ²⁾	Dĺžka nadzemnej časti semenáčikov [mm] ³⁾
I2	88 ± 7 ab	164,3 ± 41,6 c
I-6II	101 ± 15 b	137,4 ± 14,1 ab
Supresivit	94 ± 17 b	142 ± 23,1 b
Polyversum	91 ± 14 b	151 ± 17,1 b
Kontrola ⁴⁾	68 ± 7 a	129,1 ± 20,2 a

¹⁾Biopreparation, ²⁾Average number of sprouted seedlings, ³⁾Length of aboveground parts of seedlings, ⁴⁾Control

Tabuľka 8. Hrúbka koreňového krčka; aritmetický priemer ± smerodajná odchýlka, hodnoty s rozdielnym písmenom sa odlišujú významne v rámci stĺpca, P < 0,05, n = 500

Table 8. Root collar diameter; average ± standard deviation, P < 0.05, n = 500

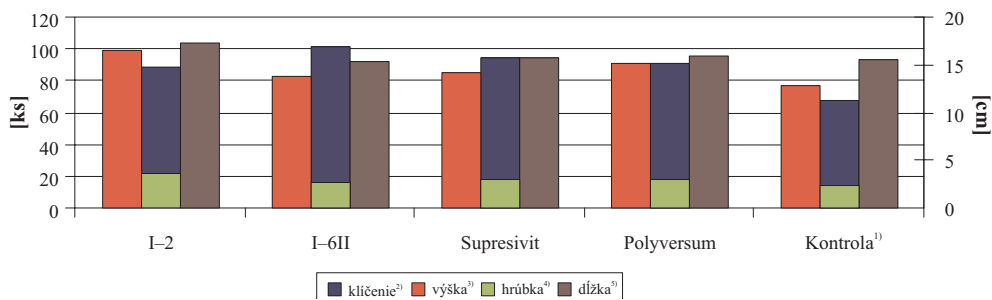
Použitý biopreparát ¹⁾	Priemer koreňového krčka ²⁾	Dĺžka koreňového systému ³⁾
	[mm]	
I-6II	4,04 ± 0,6 a	173,5 ± 24,1 a
I2	2,88 ± 0,6 b	153,0 ± 30,2 a
Supresivit	3,36 ± 0,6 b	157,0 ± 28,9 a
Polyversum	3,51 ± 0,6 b	159,0 ± 26,7 a
Kontrola ⁴⁾	2,86 ± 0,63 b	155,7 ± 27,2 a

¹⁾Biopreparation, ²⁾Diameter of root collar, ³⁾Length of roots system, ⁴⁾Control

Štatisticky významný vplyv jednotlivých biopreparátov na dĺžku hlavného koreňa semenáčikov sa nezistil (tab. 8). Najlepší rast koreňového systému vykazovali semenáčky ošetrované suspenziou vodných spór kmeňa I – 6II a biopreparátom Polyversum.

Vplyv jednotlivých testovaných biopreparátov na klíčenie semien, rast koreňového systému, hrúbku koreňového krčka a rast nadzemnej časti sadeníc v škôlkarskom stredisku Čermošná je zobrazený na obrázku 2.

Získané výsledky pri aplikácii biopreparátov pri ochrane sadbového materiálu v lesnej škôlke Čermošná poukazujú na pozitívny vplyv biopreparátov na zdravotný a kondičný stav semenáčikov duba. Priaznivý vplyv po aplikácii biopreparátmi sa prejavil tak v polyetylénovom kryte, ako aj na voľnom záhone. Najlepšie výsledky sa v polyetylénovom kryte získali s prípravkom Supresivit, ktorý mal pozitívny vplyv nielen na mortalitu semenáčikov, ale aj na ich výškový a hrúbkový prírastok.



Obr. 2. Vplyv ošetrenia biopreparátmi na klíčenie, rast, hrúbku a dĺžku koreňového krčku (voľný záhon)

Fig. 2. Effect of biopreparation on germination, growth, thickness and length of root collar (open seedbed)

¹⁾Control, ²⁾Germination, ³⁾Height, ⁴⁾Diameter, ⁵⁾Length

4. Diskusia

Rast testovaných izolátov *Trichoderma* sp. na živných pôdach bol nerovnomerný. Sporulácia závisela od jednotlivého kmeňa, najintenzívnejší rast sa potvrdil pri čerstvých izolátoch. Tak teplota, ako aj dĺžka svetelnej periódy, výraznejšie neovplyvnila rýchlosť rastu. Výsledky potvrdzujú, že tesná vzdialenosť hyperparazita od patogéna nedáva možnosť pre vznik patogenézy, nakoľko hyperparazit veľmi rýchlo obrastá kolóniu patogéna. Rast patogénov v čistých kultúrach bol v porovnaní s *Trichoderma* sp. v priemere 2-krát pomalší. Inhibícia rastu pri podvojných kultúrach bola najvyššia pri vzdialenosti do 2 cm, pri vzdialenosti 5 cm bola nižšia o 30 % a pri vzdialenosti 10 cm o 50 %.

Použitie kmene húb rodu *Trichoderma* boli schopné v laboratórnych podmienkach prerásť všetky patogény. LYNCH (1989) uvádza, že schopnosť *Trichoderma* sp. konkurenčne využívať substrát pre svoj rast závisí od kultivačných podmienok. Upozorňuje aj na to, že kým v podmienkach *in vitro* na nutrične bohatom agare môže potenciónalny antagonista produkovať antibiotické látky, rizosféra rastlín mu na to nemusí poskytovať potrebné živiny. Taktiež mechanizmus účinku antagonistu na patogéna (napríklad mykoparazitizmus, produkcia antibiotík alebo enzýmov) pozorovaný *in vitro*, nemusí byť rozhodujúci pre skutočný účinok.

Z hľadiska praktického uplatnenia biologických metód najmä v oblasti výroby sadbového materiálu, je zistenie o odolnosti húb rodu *Trichoderma* voči niektorým fungicídmi povzbudzujúce. Určitá tolerancia bola zistená voči fungicídny prípravkom, Dithane M 45 a Pomarsol Forte. Naopak počas laboratórnych testov najširšie spektrum účinnosti voči rastu *Trichoderma* sp. mali fungicídne prípravky Bumper Super, Fundazol 50 WP a Switch 62,5 WG. Teda tieto fungicídy nie sú vhodné pre použitie s biopreparátmi na báze *Trichoderma* sp., nakoľko veľmi účinne inhibovali aj rast jej mycélia. Počas laboratórnych testov najmenej inhibovali rast *Trichoderma* sp. fungicídne prípravky Bumper Super a Fundazol 50 WP.

Podľa literárnych údajov existujú dva základné spôsoby vzťahov medzi hýfami húb rodu *Trichoderma* a patogéna. Pri prvom spôsobe nastáva po dosiahnutí patogénnych hýf parazita buď cikcakovitý, alebo vlnovitý spôsob rastu pozdĺž hýf hostiteľa. Pri druhom spôsobe mykoparazit vytvára útvary podobné apresóriám alebo hákovitým kontaktným vetvám, ktoré prenikajú do hýf hostiteľa (MAROIS & MITCHELL & SONODA 1981, MICHALÍKOVÁ & MICHŘINA 1996, MURMANIS & HIGHLEY & RICARD 1998).

ŠVECOVÁ *et al.* (1998) uvádza výsledky pokusu testovania rôznych klonov húb rodu *Ophiostoma* na prítomnosť mykoparazitickej huby *Pythium oligandrum*. Dosiiahnuté výsledky hodnotené na základe posúdenia šírky inhibičných zón poukazujú na odlišnú reakciu rôznych kmeňov *Ophiostoma* sp. voči uvedenému mykoparazitu. *P. oligandrum* je však schopné v oblasti mycélia patogéna fruktifikovať a produkovať niekoľkokrát vyšší počet oospór ako kolónie *P. oligandrum*, ktoré rástlo a čerpalo živiny iba z agarovej živnej pôdy, bez prítomnosti druhov rodu *Ophiostoma*. Toto zistenie má významný praktický dosah, najmä na použitie *P. oligandrum* na inokuláciu osiva lesných drevín ešte pred výsevom v rámci predsejbovej prípravy v takom rozsahu, aby tento bol schopný prednostne osídliť povrch osiva, klíčiacich rastlín a koreňov semenáčikov a zamedziť tak osídleniu fytopatogénnymi hubami rodu *Ophiostoma*. Prednostné osídlenie rizosféry semenáčikov lesných drevín týmto antagonistom umožňujú aj zálievky suspenziami oospór.

STRNADOVÁ (1996) uvádza dobrú účinnosť biopreparátu Polyversum na produkciu sadbového materiálu duba. Po dvoch zálievkach uvedeným biopreparátom udáva pri dube až 146,5 % produkciu semenáčikov v porovnaní s kontrolou. Antagonistické huby rodu *Trichoderma* sú jedným z perspektívnych bioagens na ochranu semenáčikov lesných drevín (DUDA & SIEROTA 1987, ČERVINKOVÁ 1990). FOFFOVÁ (1992) uvádza dobré výsledky pri testovaní rôznych druhov rodu *Trichoderma* v podmienkach *in vitro*, ako aj pri testoch v lesných škôlkach.

5. Záver

V laboratórnych pokusoch testované izoláty *Trichoderma* sp. vykazovali na živných pôdach intenzívny a rýchly rast. Sporulácia závisela od jednotlivého kmeňa, najintenzívnejší rast sa potvrdil pri čerstvých izolátoch. Teplota, ani dĺžka svetelnej periódy, výraznejšie neovplyvnila rýchlosť rastu hýf mycélia húb rodu *Trichoderma*. Rast vegetatívnych orgánov patogénov v čistých kultúrach bol v porovnaní s *Trichoderma* sp. v priemere 2-krát pomalší.

Zistila sa určitá tolerancia húb rodu *Trichoderma* voči fungicídny prípravkom, Dithane M 45 a Pomarsol Forte.

Pokusy v lesnej škôlke Čermošná preukázali priaznivý vplyv jednotlivých biopreparátov na voľných záhonoch najmä na počet vyklíčených semenáčikov duba, na dĺžku koreňového systému, priemer koreňového krčka, ako aj na rast nadzemnej časti. Dobré výsledky sa dosiahli nielen s komerčnými prípravkami Supresivit, Polyversum, ale aj s testovanými kmeňmi poskytnutými Chemickým ústavom SAV v Bratislave. Použitie biopreparátov v podmienkach lesného hospodárstva na strane jednej zabezpečuje veľmi šetrný spôsob k prírodnému prostrediu, na strane druhej vyžaduje náročné štúdium

účinnosti a aplikačných foriem a v neposlednom rade treba mať aj na zreteli, že pri použití biopreparátov je nutné očakávať väčšiu variabilitu výsledkov ako pri použití chemických pesticídnych prípravkov (JANČAŘÍK 1995).

Podakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci OP Výskum a vývoj pre projekt „Centrum excelentnosti biologických metód ochrany lesa“ (ITMS: 26220120008) spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

1. DEACON J.W., 1976: Studies on *Pythium oligandrum*, an aggressive parasite of other fungi. Transactions of the British Micological Society, 66: 383–391. – 2. DUDA B., SIEROTA Z.H., 1987: Survival of Scots pine seedlings after biological and chemical control of damping-off in plastic greenhouses. *Eur. J. For. Pathol.*, 17: 110–117. – 3. CHET I., 1987: *Trichoderma* – application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In Innovative Approaches to Plant Disease Control. John Wiley Sons, New York, p. 137–160. – 4. ELAD Y. et al., 1995: Factors influencing control of gray mold by means of *Trichoderma* (*Trichoderma harzianum* T 39) under field conditions. Fifth International *Trichoderma* and *Gliocladium* Workshop, Beltsville, April 1995, abstract. – 5. KOMMEDAHL T. et al., 1981: Variability in performance of biological and fungicidal seed treatments in corn, peas and soybeans. *Protection Ecology*, 3, p. 55–61. – 6. LEONTOVÝČ R., 2000: Využitie biopreparátov v ochrane lesa pri potláčaní pôvodcov tracheomykóznych ochorení. In HLAVÁČ P., REINPRECHT L., GÁPER J. (eds): Drevoznehodnocujúce huby 2000, Zborník referátov, Zvolen: TU Zvolen, p. 27–33. – 7. LYNCH M. J., 1989: Development and interaction between microbial communities on the root surface. In VANČURA V., KUNC F. (eds): Interrelationships between microorganisms and Plants in soil. Praha: Academia, p. 5–12. – 8. MAROIS J.J., MITCHELL D.J., SONODA R.M., 1981: Biological control of fusarium crown rot of tomato under field conditions. *Phytopathology*, 71(12): 1 257–1 260. – 9. MICHALÍKOVÁ A., MICHŘINA J., 1996: Mykoparazitizmus ako jeden z mechanizmov antagonistickeho pôsobenia kmeňa B1 huby *Trichoderma harzianum* Rif. na *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. *Polnohospodárstvo*, (42)11: 855–863. – 10. MURMANIS L.L., HIGHLEY T.L., RICARD J., 1998: Hyphal interaction of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma polysporum* with wood decay fungi. *Mater. u. Organismy*, 23, pp. 271–279. – 11. PAPAVIDAS G.C., 1985: *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 23, p. 23–54. – 12. SAMUELS G., 1996: *Trichoderma* a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.*, 100(8): 923–935. – 13. ŠVECŮVÁ M. et al., 1998: Vliv mykoparazita *Pythium oligandrum* Drechsler na druhy hub z rodu *Ceratocystis* s.l. *Lesnictví – Forestry*, 44(9): 411–420. – 14. VELDEMAN R., 1993: Possibilities of *Trichoderma* for control of tree diseases – 10 years of experience and further perspectives. *Biotechnologia*, 1(20), PAN Poznań, p. 8–13. – 15. VESELÝ D., 1997: Biologická regulace výskytu fytopatogenních hub v lesních ekosystémech. *Lesnictví – Forestry*, 43(10): 464–471. – 16. WERNER A., 1993: Spore germination and mycelium development of *Trichoderma* in oak sapwood. In Proceedings of International Congress “Recent advances in studies on oak decline”. Tipoligrafia Radio- Putignano, Bari, p. 397–404.

Summary

Biological efficiency of some biological preparations against fungal pathogens was tested in vitro. We used 4 different biopreparations (Table 1). Tolerance of these biopreparations to fungicides was tested on 2% malt agar under controlled temperature and light conditions. We also checked the effectiveness of fungicides to control both the selected fungal pathogens and strains of antagonistic fungus *Trichoderma* (Table 2).

The speed of the mycelial growth of selected *Trichoderma* strains varied. In spite the fact that *Trichoderma* can grow under +5 °C, the best growth was measured at +20 °C through +24 °C. The fastest

growth performed isolates no. 6, 9 and 15. The best conidiogenesis performed isolates I6–II SAV and I2–SAV. All three parameters in combination performed the best in isolates no. 36 and I2–SAV. The last one was checked as a solution with 1×10^9 conidia in 1 g of preparation. Speed of growth of both isolates was not the best but it had very good production of ripe spores and its mycelium was not inhibited by pathogens.

Testing the tolerance of *Trichoderma* isolates to fungicides and their effect on pathogens was realized on 4 *Trichoderma* strains (Table 4). The isolate no. 15 comes from commercial preparation Fytovita, no. 37 from the oak sapwood isolated in Banská Štiavnica laboratory. Remaining 2 isolates (I6–II SAV and I2–SAV) come from Chemical Institute SAV Bratislava.

The best biological effectiveness of tested fungicides against tested fungi was obtained from Bumper Super, Fundazol 50 WP and Switch 62,5 WG. These three fungicides were very active not only against fungal pathogens but also against *Trichoderma* strains. The most sensitive fungus was *Phomopsis* sp., then *Graphium* sp., *Ophiostoma* sp. and *Fusarium* sp. (Figure 1). On the contrary, *Trichoderma* strains tolerated Dithane M 45 and Pomarsol Forte. It means the biological control by *Trichoderma* sp. could be used in combination with some fungicides. Of course, more research is necessary in this field.

Field tests of biopreparations to improve health conditions of oak seedlings were done in glasshouse of Čeremošná forest nursery. The best results were obtained after treatment by Supresivit. It had a positive effect on diameter of root collar and length of the above ground parts of plants (Table 6).

Field tests of biopreparations were realized also for seedlings in the open seedbeds of Čeremošná forest nursery. We counted number of sprouted seedlings and the length of above ground parts of seedlings. The best effect on number of sprouted oak seedlings as well as on diameter of root collar performed *Trichoderma* strain I6–II SAV; the highest above ground parts of oaks were measured on plants treated by *Trichoderma* strain I6–II and Polyversum (Table 7). The positive effect of biopreparations upon the length of main root was not proved, however *Trichoderma* I6-II and Polyversum partly improved the root system (Table 8).

Translated by: authors
Revised by: Z. Al-Attasová