

**VPLIV DODAJANJA ALTERNATIVNIH FUNGICIDOV NA RAST MICELIJA  
GLIVE *Nectria galligena* Bresad. GOJIŠČU V PETRIJEVKAH**

Mario LEŠNIK<sup>1</sup>, Marinka TREHTAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakulteta za kmetijstvo Maribor

<sup>2</sup>Srednja Zdravstvena šola Maribor

**IZVLEČEK**

V laboratorijskih razmerah smo preučevali vpliv dodajanja alternativnih fungicidov v gojišče (krompirjev dekstrozni agar) na razvoj glive *Nectria galligena* Bres. gojene v petrijevkah. Alternativne fungicide (AF) na podlagi izločkov alg (*Ascophyllum* sp.), preslice (*Equisetum* sp.), mineralov glin, žvepla in bakra smo dodajali neposredno v gojišče ob pripravi v štirih različnih koncentracijah. Razvoj micelija v petrijevki smo spremljali 14 dni na način, da smo merili površino priraslega micelija (cm<sup>2</sup>). Na podlagi primerjave prirastkov micelijev v petrijevkah z dodanimi ali brez dodanih fungicidov smo določili obseg zaviralnih ali pospeševalnih učinkov na rast micelija. Zaviralni učinki dodanih AF na prirast micelija glive *N. galligena* v čisti kulturi so bili podobni zaviralnemu učinku anorganskih fungicidov na podlagi bakra in žvepla. Pri dodajanju AF v visokih koncentracijah se je prirast glive zmanjšal za več kot 80 %. Rezultati nakazujejo možnost uporabe preučevanih biotičnih pripravkov za zatiranje boleznj jablanovega raka v ekoloških nasadih jablan.

Ključne besede: *Nectria galligena*, alternativni fungicidi, izločki alg, izločki preslice, minerali glin, baker, žveplo, zatiranje

**ABSTRACT**

**THE INFLUENCE OF ADDING ALTERNATIVE FUNGICIDES INTO GROWING  
MEDIA ON THE GROWTH OF *Nectria galligena* Bresad. FUNGUS  
GROWN IN PETRI DISHES**

The impact of adding biological fungicides into the potato dextrose agar growing media on the growth of the mycelium of fungus *Nectria galligena* Bresad. was studied in laboratory conditions in Petri Dishes. Fungicides based on extracts of sea algae (*Ascophyllum* sp.), horsetail weed (*Equisetum* sp.) and mixtures of clay minerals, copper and sulphur were added to growing media in four concentrations. The growth of fungal mycelium was quantified by measurements of mycelium colony surface area (cm<sup>2</sup>) in 14-day period of time. According to comparisons of mycelium growth in Petri Dishes with or without added fungicides the conclusions about inhibition or acceleration effects of added fungicides were made. Adding of fungicides to growing media caused in most cases significant decrease in mycelium growth. At highest studied concentrations more than 80% decrease in mycelial growth was observed. The inhibition of mycelial growth after adding copper and sulphur based fungicides was similar to the one achieved when adding fungicides based on weed and algae extracts or clay mineral mixtures. The results of our experiment indicate the possible use of studied alternative fungicides for control of European Nectria Apple Canker disease in ecologically maintained plantations of apples.

Key words: *Nectria galligena*, alternative fungicides, apple, equisetum extracts, algae extracts, clay-mineral fungicides, copper fungicides, sulphur fungicides

<sup>1</sup>izr. prof., dr. agr. zn., Vrbanska cesta 30, SI-2000 Maribor

<sup>2</sup>Trg Miloša Zidanška 3, SI-2000 Maribor

## 1. UVOD

Jablanov rak, ki ga povzroča gliva *Nectria galligena* Bres. je dokaj pogosta bolezen v naših nasadih jablan in hrušk. Njen pojav je povezan s sortno sestavo nasadov, z vremenom (npr. ostre zime, zelo deževne jeseni) in s splošno pridelovalno tehnologijo (način obrezovanja, aplikacija pripravkov za varstvo rastlin, ...). Gliva se zaje pod skorjo dreves, kot posledica boja med drevesom in glivo pa se razvijejo rakaste rane obdane z naborki kalusnih obrambnih tkiv. Pri občutljivih sortah se razvijejo globoke odprte rane in ko te objamejo veje in debla se le te posušijo. Pri ekološki pridelavi ne uporabljamo klasičnih fungicidov, ki v rastni dobi vsaj delno zavrejo razvoj glive. Tudi pri klasičnih fungicidih proti tej glivi izvajamo preventivno varstvo, to je preprečevanje kalitve spolnih ali nespolnih trosov skozi rane. Delovanje fungicidov na micelij pod lubjem je slabo. Za zatiranje glive v začetku rastne dobe in ob koncu, takoj po obiranju navadno uporabljamo bakrove pripravke. Ker v ekološko pridelovanje uvajamo vse več biotičnih pripravkov so informacije o njihovem delovanju na to glivo zanimive za sadjarje. Nekatere sorte odporne na škrlup so dokaj občutljive za okužbe z glivo *N. galligena*. Ker pri ekološki pridelavi pogosto izrezujemo poganjke napadene od pepelaste plesni napravimo veliko ran, skozi katere prodre gliva. Dodatno veliko ran naredimo z orodji za mehansko obdelavo tal neposredno ob drevesih. Tudi te rane so pogosta vdorna mesta za glivo. Alternativni pripravki imajo kombinirano delovanje, delno imajo prave zatiralne učinke na glive, delo pa povečujejo odpornost ali pa so snovi s SAR učinkom. Če želimo preučiti njihove neposredno zatiralno delovanje je najbolj primerna metoda uporabe aktivnih snovi na miceliju v čisti kulturi glive. Rezultati dobljeni na tak način seveda niso primerljivi z praktičnim zatiralnim učinkom pri uporabi pripravka v nasadu, imajo pa informativno vrednost o tem ali ima pripravek sploh kakšen neposreden zatiralni učinek.

## 2. MATERIAL IN METODE DELA

Za preučevanje neposrednega zatiralnega učinka biotičnih pripravkov smo uporabili klasično metodo dela, to je dodajanje različnih koncentracij pripravka v gojišče na katerem smo v petrijevkah gojili čisto kulturo micelija glive. V poskusu smo uporabili samo en izolat glive, ki je izviral iz močno okužene jablane sorte "Kanadka" rastoče v travniškem nasadu na Ptujski Gori. Patogenost izolata smo potrdili z okužbami vejic v naravi rastočih jablan. Na mestih, kjer smo v aprilu v umetno povzročene rane vstavili micelij glive so se po 6 mesecih razvile spremembe značilne za bolezen jablanov rak. Koncentracije alternativnih fungicidov, ki smo si jih izbrali za izvedbo poskusa so gotovo nekaj višje od tistih katerim je izpostavljena gliva v naravi v nasadu. Pri biotičnih pripravkih pogosto ne moremo natančno določiti koncentracije aktivnih snovi, zato smo za prikaz uporabili kar koncentracije dodanih raztopin pripravkov.

### 2.1 Uporabljeni pripravki

V poskusu smo preučevali naslednje pripravke:

**Cosan** (proizvajalec Pinus TKI) je anorganski fungicid v obliki močljivih zrn (WG) rjave barve. Vsebuje 80 % čistega žvepla ( $\pm 4$  %). **Cupro 190 SC** (proizvajalec Agroruše d.d.) je anorganski fungicid v obliki koncentrirane suspenzije (SC) zeleno modre barve. Aktivna snov je baker v koncentraciji 190 g/l  $\pm 6$  % iz bakrovega oksisulfata (350 g/l  $\pm 5$  %). **Myco-Sin** (proizvajalec BIOFA) je biotični fungicid v obliki izjemno finega rjavega prahu (WP) z dodatkom močil naravnega porekla (rastlinska olja). Je kombinacija izbranih kamenih mok in glin, vsebuje 10-12 % Al-oksida, 80 % Si-oksida ter 2 % Ti-oksida. **Ulmasud B** (proizvajalec BIOFA) je biotični fungicid v obliki izjemno finega rjavega prahu (WP) z dodatkom močil naravnega porekla (rastlinska olja). Vsebuje Al-oxid, Si-oxid (kamena moka) in žveplo (žveplov sulfat). **Algo-Plasmin** (proizvajalec CUXIN-Naturdüngerwerk Johannsen) je biotični fungicid v obliki finega sivega prahu. Je 100 % naravni proizvod iz vitaliziranih rdečih morskih alg (*Lithothamnium calcareum*, *Ascophillum nodosum*) in sedimentnih mineralov.

**Biofa Equisetum** (proizvajalec BIOFA) je biostimulator v obliki temno rjave suspenzije, pridobljen iz izvlečkov preslice (*Equisetum arvense*) z dodatki silicijeve kisline in različnih žveplovih spojin.

## 2.2 Priprava gojišč in postopek dodajanja pripravkov

Glivo smo gojili v petrijevkah premera 15 cm. Kose micelija (0,25 cm<sup>2</sup>) iz prvobitne čiste kulture smo nacepljali na običajen krompirjev dekstrozni agar (PDA - 17/83, proizvajalec DIFCO), ki smo ga pripravili po običajnem postopku in smo mu tik pred ohladitvijo in strjevanjem dodali raztopino alternativnih fungicidov. Segret tekoči agar predhodno pripravljen v 250 ml erlenmajericah smo nalili v petrijevke (30 mililitrov v vsako) nato pa smo tik pred strjevanjem v delno ohlajen agar vbrizgali z avtomatsko pipeto 3 ml raztopine fungicida in vsebino krožno pretresli, da sta se agar in fungicid pomešala. Raztopine fungicidov smo pripravili v sterilnih pogojih z mešanjem destilirane vode in fungicidov iz na novo odprtih originalnih embalaž, zunanje površinsko steriliziranih z alkoholom in UV svetlobo. Pripravki niso bili kontaminirani z mikrobi, ki bi uspevali v pripravljenem gojišču, saj se je z neželenimi mikrobi okužil le zelo majhen delež petrijevk (z izjemo ene serije). Temperatura agarja ob dodajanju pripravkov je bila nizka in ni vplivala na razgradnjo aktivnih snovi v njih. Vse preučevane pripravke smo dodali v treh koncentracijah (prikaz v glavi vsake preglednice).

## 2.3 Razvoj glive in ugotavljanje učinkovitosti dodanih fungicidov

Za vsako preučevano koncentracijo dodanega fungicida (K1, K2, K3) smo pripravili 10 petrijevk. Poskus je potekal v naključnih skupinah v desetih ponovitvah. Petrijevke okužene z neželenimi mikrobi smo izločili iz ocenjevanja. Po nacepljanju micelija smo petrijevke inkubirali pri sobni temperaturi (18 – 22 °C) in zračni vlagi približno 60%. Obrnjene navzdol smo jih postavili na delovni pult v laboratoriju. Pri vsakodnevnem, 14 dni trajajočem spremljanju prirasta površine micelija smo jim spreminjali položaj na pultu. Velikost prirasle površine micelija smo določili z zarisovanjem roba micelija na dnu petrijevke s pisalom in nato z uporabo merila za merjenje povprečnega premera, čemur je sledil izračun prirasle površine.

Učinkovitost fungicidov za zaviranje razvoja micelija glive smo izračunali na podlagi Abbotove formule. V Abbotovo enačbo, ki se običajno uporablja za izračunavanje učinkovitosti delovanja fitofarmaceutskih pripravkov smo vnesli podatek o prirasli površini micelija v petrijevkah, ki smo jim dodajali fungicide in v petrijevkah, ki jim fungicidov nismo dodajali. Iz razmerja med obema podatkomā dobimo podatek o učinkovitosti fungicida v odstotkih.

$$\text{Učinkovitost (\%)} = \left( \frac{a - b}{a} \right) \times 100$$

a = površina micelija v kontrolnih petrijevkah

b = površina micelija v petrijevkah z dodanimi fungicidi

### 3. REZULTATI IN RAZPRAVA

Dodajanje bakrovega in žveplovega pripravka v najvišji koncentraciji je popolnoma zavrlo razvoj micelija glive (preglednica 1). Pri koncentraciji K3 se je gliva na začetku pričela razvijati, vendar se je razvoj po tednu dni tudi tam skoraj popolnoma ustavil. Po 14 dneh je učinkovitost fungicidov znašala nad 90%. Med zaviralnim učinkom bakrovih in žveplovih pripravkov so se pri najnižji koncentraciji pojavile manjše razlike. Učinek bakrovih pripravkov se je zmanjšal hitreje, kot učinek žveplovih. Verjetno bi pri desetkrat manjši koncentraciji že prišlo do občutnega zmanjšanja učinkovitosti, vendar žal manjših koncentracij nismo preizkušali.

Preglednica 1: Učinkovitost pripravkov Cosan in Kupro (Abbot, %) za zaviranje razvoja micelija glive *N. galligena* gojene v petrijevkah

Table 1: Biological efficacy (% Abbot) of added fungicide (Cosan and Kupro) solutions for inhibition of growth of *N. galligena* fungus grown in Petri Dishes

Obdobje meritev (dnevi), Time (days)	Koncentracija in vrsta dodanega fungicida in učinkovitost:					
	K1 = 3 ml raztopine na 30 ml agarja (raztopina 1 g ali ml fungicida na 10 ml vode) K2 = 3 ml raztopine na 30 ml agarja (raztopina 1 g ali ml fungicida na 100 ml vode) K3 = 3 ml raztopine na 30 ml agarja (raztopina 1 g ali ml fungicida na 1000 ml vode)					
	COSAN (sulphur fungicide)			KUPRO (copper fungicide)		
	K1	K2	K3	K1	K2	K3
1.	0,0	0,0 a	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0 a
2.	99,5 a	38,7 b	25,8 c	99,5 a	48,0 b	4,4 d
3.	100 a	73,2 b	22,5 c	100 a	83,8 b	0,0 d
4.	100 a	80,6 b	19,1 d	100 a	89,5 c	0,0 d
5.	100 a	81,2 b	47,3 d	100 a	90,9 c	0,0 e
6.	100 a	85,0 b	60,6 d	100 a	93,0 c	25,3 e
7.	100 a	87,7 b	67,7 d	100 a	94,6 c	33,8 e
8.	100 a	88,9 b	73,1 d	100 a	95,5 a	41,5 e
9.	100 a	91,1 b	78,2 d	100 a	96,3 a	47,9 e
10.	100 a	92,3 b	82,8 c	100 a	96,9 a	54,2 e
11.	100 a	94,0 b	87,3 c	100 a	97,5 a	63,6 e
12.	100 a	95,0 a	90,5 b	100 a	97,9 a	71,8 c
13.	100 a	96,4 b	93,5 b	100 a	98,5 a	80,5 c
14.	100 a	96,7 a	94,3 b	100 a	98,6 a	82,6 c

\* povprečja označena z enako črko v posamezni vrstici se med seboj ne razlikujejo statistično značilno po HSD testu ( $\alpha = 0,05$ ).

**Preglednica 2:** Učinkovitost fungicidov Algo-Plasmin in Biofa Equisetum (Abbot, %) za zaviranje razvoja micelija glive *N. galligena* gojene v petrijevkah

**Table 2:** Biological efficacy (% Abbot) of added fungicide (Algo-Plasmin and Biofa Equisetum) solutions for inhibition of growth of *N. galligena* fungus grown in Petri Dishes

Obdobje meritev (dnevi), Time (days)	Koncentracija in vrsta dodanega fungicida:					
	K1 = 3 ml raztopine na 30 ml agarja (raztopina 1 g ali ml fungicida na 10 ml vode) K2 = 3 ml raztopine na 30 ml agarja (raztopina 1 g ali ml fungicida na 100 ml vode) K3 = 3 ml raztopine na 30 ml agarja (raztopina 1 g ali ml fungicida na 1000 ml vode)					
	Algo-Plasmin			Biofa Equisetum		
	K1	K2	K3	K1	K2	K3
2.	60,0 c	0,0 a	0,0	51,8 c	37,8 b	0,0
3.	82,9 c	0,0 a	0,0	87,6 c	41,8 b	0,0
4.	84,8 c	0,0 a	0,0	93,0 d	36,4 b	0,0
5.	85,1 c	0,0 a	0,0	91,6 d	58,7 b	0,0
6.	85,3 c	0,0 a	0,0	93,8 d	67,9 b	3,5
7.	87,9 c	0,0 a	0,0	95,1 d	74,2 b	3,5
8.	87,5 c	0,1 a	0,0	95,4 d	74,5 b	3,5
9.	88,7 c	11,9 a	0,5	95,2 d	77,8 b	5,5
10.	88,8 c	20,6 a	1,5	95,2 c	80,0 b	5,5
11.	90,0 c	34,2 a	2,3	95,7 c	82,5 b	5,8
12.	91,1 c	48,0 a	2,5	95,6 c	86,9 b	5,7
13.	93,5 b	63,3 a	2,5	96,2 b	91,0 b	5,7
14.	94,1 b	67,8 a	2,5	96,2 c	92,1 b	5,7

\* povprečja označena z enako črko v posamezni vrstici se med seboj ne razlikujejo statistično značilno po HSD testu ( $\alpha = 0,05$ ).

Pri dodajanju pripravka Algoplasmin smo dosegli nenavadno velike zaviralne učinke, če upoštevamo, da je sestavljen zgolj iz ostankov alg in glede na deklarirano sestavo nima dodatkov za glive škodljivih snovi (npr. žveplo, baker, aluminij, ...). Z manjšanjem koncentracije se je značilno zmanjšal zaviralni učinek.

Pri pripravku Biofa Equisetum se je učinkovitost s padanjem koncentracije zmanjševala nekaj počasneje, vendar je pri koncentraciji K3 tudi značilno padla. Nekaj manj, kot pri pripravku Algoplasmin je verjetno padla zato, ker pripravek vsebuje tudi nekaj silicijeve kisline in žvepla. Pri koncentraciji K3 ni bilo mogoče več zaslediti značilnih zaviralnih učinkov. Pri petrijevkah z najnižjo koncentracijo pripravka Biofa Equisetum smo imeli težave saj je bilo veliko okuženih, tako pri prvi seriji, kot pri ponovljeni seriji zato podatki za to koncentracijo niso popolnoma zanesljivi.

Preglednica 3: Učinkovitost fungicidov Myco-Sin in Ulmasud (Abbot, %) za zaviranje razvoja micelija glive *N. galligena* gojene v petrijevkah.

Table 3: Biological efficacy (% Abbot) of added fungicide Myco-Sin in Ulmasud solutions for inhibition of growth of *N. galligena* fungus grown in Petri Dishes

Obdobje meritev (dnevi), Time (days)	Koncentracija in vrsta dodanega fungicida:					
	Myco-Sin			Ulmasud		
	K1	K2	K3	K1	K2	K3
1.	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
2.	28,6 b	28,6 b	17,9 a	28,6 b	28,6 b	22,9 a
3.	87,2 b	87,2 b	62,6 a	87,2 b	87,2 b	68,2 a
4.	95,0 b	94,6 b	65,5 a	95,0 b	94,3 b	69,4 a
5.	97,4 b	97,1 b	65,7 a	97,4 b	96,8 b	68,7 a
6.	98,1 b	97,8 b	64,4 a	98,1 b	97,7 b	65,4 a
7.	98,8 b	98,6 b	70,1 a	98,8 b	98,5 b	68,0 a
8.	99,2 b	99,0 b	74,2 a	99,2 b	98,9 b	68,7 a
9.	99,4 b	99,3 b	78,5 a	99,4 b	99,3 b	71,7 a
10.	99,6 b	99,5 b	81,3 a	99,6 b	99,4 b	71,9 a
11.	99,7 b	99,6 b	83,3 a	99,7 b	99,6 b	74,7 a
12.	99,8 b	99,7 b	85,5 a	99,8 b	99,7 b	75,8 a
13.	99,8 b	99,7 b	87,2 a	99,8 b	99,7 b	76,3 a
14.	99,8 b	99,7 b	86,7 a	99,8 b	99,7 b	75,7 a

\* povprečja označena z enako črko v posamezni vrstici se med seboj ne razlikujejo statistično značilno po HSD testu ( $\alpha = 0,05$ ).

Pripravka Ulmasud in Myco-sin sta pri preučevanih koncentracijah izkazala zelo visoko učinkovitost. To je verjetno posledica delovanja kovinskih ionov (npr. Al), ki se sproščajo iz medplastovnih rež mineralov glin in dodanega žvepla. Učinkovitost teh dveh pripravkov je bila popolnoma primerljiva z učinkovitostjo bakrovih in žveplovih pripravkov. Precejšnje učinkovitost bi verjetno izkazala tudi pri ponovni 10-kratni razredčitvi koncentracije. V poskusu smo preučevali učinek na rast micelija. Ni nujno, da je učinek na rast micelija istoveten učinku pri preprečevanju kalitve trosov in razvoja kličnega mešička glive. Biotični pripravki v smislu neposredne toksičnosti delujejo kot zunanje delujoči preventivni kontaktni fungicidi. Učinek na micelij, ki se razvija v kambiju lubja pa je verjetno lahko le tipa SAR učinkov ali je le delno sistemičen (na kisline vezani aluminijevi ioni). Primerljivih podatkov o delovanju alternativnih fungicidov v literaturi nismo uspeli najti zato razprava ne vsebuje sestavin primerjanja z rezultati drugih raziskovalcev.

#### 4. SKLEPI

Rezultate poskusa lahko obravnavamo zgolj kot informativne, saj smo poskus izvedli le z enim izolatom glive *N. galligena*. O variabilnosti njenega odziva na preučevane pripravke nimamo informacij. Ugotovljene učinkovitosti so bile višje od pričakovanih, verjetno zato, ker smo uporabili visoke koncentracije, višje od tistih, katerim so trosi glive izpostavljeni v naravnih razmerah pri praktični uporabi pripravkov. Glede na rezultate preučevanja učinkovitosti biotičnih pripravkov za zaviranje razvoja micelija v čisti kulturi lahko sklenemo, da imajo preučevani alternativni fungicidi upoštevanja vreden zatiralni učinek. Neposreden prenos izsledkov v naravno okolje ni možen, vendar lahko pričakujemo, da imajo biotični pripravki na podlagi obogatenih mineralov glin, izvlečkov preslice in alg ob pogosti uporabi v obdobju intenzivnih okužb s sporami glive primerljiv učinek, kot posamezne aplikacije fungicidov na podlagi bakra in žvepla.

#### 5. ZAHVALA

Podjetjem, ki so nam v preskušanje posredovala biotične pripravke se zanje zahvaljujemo.