

## UČINEK HERBICIDOV IN FUNGICIDOV NA RAST MICELIJA ENTOMOPATOGENE GLIVE *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

Franci Aco CELAR<sup>1</sup>, Špela SEKNE<sup>2</sup>, Daša MESEC<sup>3</sup>, Katarina KOS<sup>4</sup>

### IZVLEČEK

V laboratoriju smo *in vitro* preučevali učinek metribuzina (Sencor WG 70), flurokloridona (Racer 25-EC), fluazinama (Shirlan 500 SC) in propineba (Antracol) na rast micelija entomopatogene glive *Beauveria bassiana*. Glivo smo gojili na PDA gojišču z dodatkom posameznih fitofarmaceutskih sredstev v različnih koncentracijah (100, 75, 50, 25 in 0 % poljskega odmerka) pri 15 in 25 °C. Metribuzin pri vseh koncentracijah signifikantno zavira rast micelija, flurokloridon ga popolnoma zavre pri 100, 75 in 50 % koncentraciji, šibka rast je opazna šele pri 25 % poljski koncentraciji. Fungicida fluazinam in propineb prav tako fungistatično delujeta na glivo, vendar je učinek nekoliko manjši kot pri herbicidih. Inhibicija rasti micelija je v korelaciji s količino herbicida oziroma fungicida v gojišču. Temperatura vpliva na prirast micelija ne pa tudi na samo inhibicijo.

**Ključne besede:** *Beauveria bassiana*, metribuzin, flurokloridon, fluazinam, propineb

### ABSTRACT

#### EFFECT OF SELECTED HERBICIDES AND FUNGICIDES ON MYCELIAL GROWTH OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGUS *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

In the laboratory test the effect of two herbicides; metribuzin (Sencor WG 70) and fluorochloridone (Racer 25-EC), and two fungicides; fluazinam (Shirlan 500 SC) and propineb (Antracol), on the mycelial growth of *Beauveria bassiana* was evaluated *in vitro*. The fungus was cultured on PDA medium where pesticides at different concentrations (100, 75, 50, 25 and 0 % of normal field application rate) were added at two temperatures, 15 and 25 °C. All concentrations of herbicide metribuzin significantly inhibited the mycelial growth, meanwhile fluorochloridone caused total growth inhibition at concentrations 100, 75 and 50 %, and only at 25 % of normal field rate a slight mycelial growth was detected. The fungicides, fluazinam and propineb, have less fungistatic effect on *B. bassiana* than selected herbicides. Inhibition of the mycelial growth was positively correlated with herbicide and fungicide concentration in the growth medium. The temperature can affect the mycelial growth, but it does not affect the inhibition by the pesticides.

**Key words:** *Beauveria bassiana*, metribuzin, fluorochloridone, fluazinam, propineb

### 1 UVOD

Preizkušanje stranskih učinkov agrokemikalij, med temi tudi fitofarmaceutskih sredstev (FFS), na koristne organizme je v Evropski skupnosti vedno bolj pomembno in se upošteva pri razvoju novih učinkovin (aktivnih snovi) in ponovni registraciji starih. Pri mikrobioloških agensih kot so entomopatogene ali antagonistične glive za zatiranje talnih patogenov, se

---

<sup>1</sup> prof., dr. agr. znan., Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

<sup>2</sup> dodiplomska študentka, prav tam

<sup>3</sup> dodiplomska študentka, prav tam

<sup>4</sup> asist., univ. dipl. inž. agr., prav tam

preizkuša dve stvari, in sicer stranske učinke FFS, predvsem fungicidov, na same agense in delovanje agensov na druge koristne organizme (Sterk in sod., 2003).

Številne entomopatogene glive imajo pomembno vlogo pri naravnem oziroma biotičnem zatiranju škodljivih členonožcev (Keller, 1991). Kemična FFS so antropogen okoljski dejavnik, ki sinergistično oziroma antagonistično deluje tako na škodljivce kot njihove patogene (entomopatogene glive). (Benz, 1987). S pravilno odbiro FFS je mogoče zmanjšati njihovo škodljivo delovanje na entomopatogene glive (Luz in sod., 2007; Sterk in sod., 1999). Zaradi kompleksnosti, stroškov in trajanja poljskih poskusov, je potrebno prve tipalne poskuse opraviti *in vitro* v laboratoriju, kjer lahko nadzorujemo vse dejavnike. Seveda dobljenih rezultatov ne moremo nekritično neposredno prenašati v kmetijsko prakso (Moorhouse in sod., 1992). Izbrana FFS moramo obvezno preizkusiti tudi v poljskih razmerah *in vivo*, kjer dokončno potrdimo ali zavrremo ugotovitve laboratorijskih poskusov.

V R Sloveniji je registriranih nekaj FFS na podlagi mikroorganizmov (*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Trichoderma* spp., *Ampelomyces quisqualis* Ces., *Bacillus subtilis*), vendar se jih uporablja v majhnem obsegu. Tržni pridelovalci pogosto zavračajo uporabo biotičnih FFS zaradi njihove slabše učinkovitosti, ki je pogosto posledica uporabe drugih varstvenih in agrotehničnih ukrepov (gnojenje). V navodilih za uporabo pripravkov na podlagi mikroorganizmov tudi ni podatkov o možnosti souporabe s kemičnimi FFS oz. foliarnimi gnojili in njihovimi potencialnimi negativnimi vplivi na učinkovitost biotičnih pripravkov.

Leta 2010 smo v poljskem poskusu ugotovili zelo slabo učinkovitost biotičnega pripravka Naturalis (aktivna snov je entomopatogena gliva *B. bassiana*) proti strunam v krompirju (neobjavljeni podatki). V tem poskusu smo proti boleznim in plevelom uporabili običajno kemično varstvo. Zaradi suma, da lahko uporabljena kemična FFS vplivajo na učinkovitost biotičnega pripravka Naturalis, smo v fitopatološkem laboratoriju *in vitro* preučili njihov učinek na rast in razvoj entomopatogene glive *B. bassiana*.

## 2 MATERIAL IN METODE

Testna metoda temelji na navodilih za testiranje stranskih učinkov FFS na glivo *B. bassiana* (Coremans-Pelseneer, 1994), s tem, da smo namesto konidijev uporabili koščke micelija in ga dali na agarne plošče z različno vsebnostjo izbranih FFS. V poskusu smo uporabili dva herbicida in dva fungicida, ki se jih v krompirju uporablja za zatiranje bolezni in plevelov (preglednica 1).

Preglednica 1: Osnovni podatki o FFS uporabljenih v laboratorijskem preizkušanju (Uporaba: H – herbicid, F – fungicid)

PRIPRAVEK	Učinkovina	Delež (%)	Uporaba	Odmerek/ha	PORABA VODE (L)		PROIZVAJALEC
					priporočeno	poskus	
SENCOR WG 70	metribuzin	70	H	1,5 kg	300-600	1000	BAYER CS
RACER 25 EC	flurokloridon	25	H	4 L	300-600	1000	MACTESHIM AGAN
SHIRLAN 500 EC	fluazinam	50	F	0,4 L	300-500	1000	ISK BIOSCIENCE
ANTRACOL WG 70	propineb	70	F	2,5 kg	400-600	1000	BAYER CS

Priporočena poraba vode za posamezne pripravke niha med 300 in 600 litri (povprečje okoli 500 l). V poskusu smo kot osnovo za pripravo raztopin FFS za vse vzeli enotno porabo 1000 litrov vode na hektar. Tako so bile začetne laboratorijske koncentracije v agarnih ploščah v povprečju enkrat nižje kot bi bile v dejanski škropilni brozgi. Za to smo se odločili, da bi bile

začetne, in pa tudi zmanjšane koncentracije med različnimi pripravki med seboj primerljive. Drugi razlog za tako ravnanje je dejstvo, da gliva *B. bassiana*, ki jo vdelamo v tla, ni nikoli izpostavljena osnovni koncentraciji pripravka. Preden pride z njo v neposreden stik se del pripravka oz. njegove aktivne snovi, veže na glinene in humozne delce, del pa se ga lahko zaradi padavinske vode razredči ali celo izpere. Kasnejši rezultati so potrdili, da je bila naša odločitev pravilna.

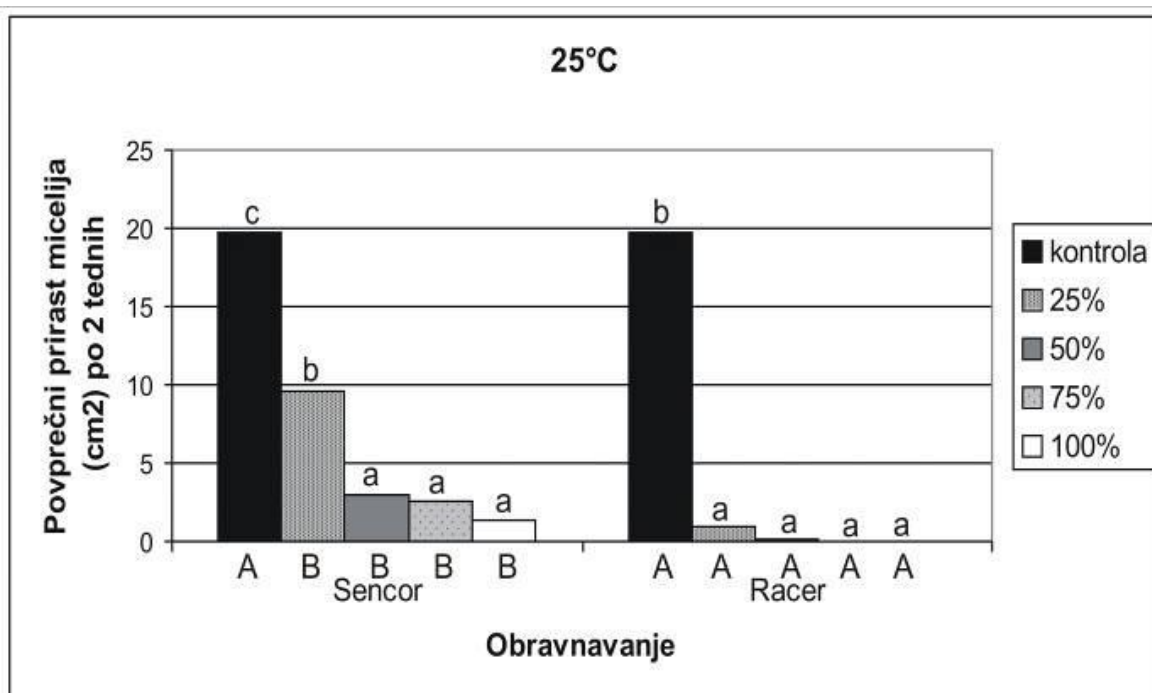
Glivo *B. bassiana* smo z metodo redčenja izolirali v čisti kulturi na krompirjevem agarju (PDA) iz pripravka Naturalis (INTRACHEM Bio Italia S.p.A.).

V hranljivo PDA gojišče (Merck) smo pred strijevanjem (55 °C) dodali različne koncentracije izbranih FFS; 100 % hektarski odmerek, 75 %, 50 % in 25 %. Koncentracije so bile preračunane na uporabo 1000 litrov vode na hektar. Npr., če je hektarski odmerek Antracola 2,5 kg, je bila začetna koncentracija 0,25 %. Kontrolno obravnavanje je bilo brez dodatka FFS.

Na pripravljene agarne plošče smo nacepili koščke (Ø 5 mm) 14 dni stare kulture glive *B. bassiana* gojene na PDA gojišču pri temperaturi 25 °C. Za vsako obravnavanje smo imeli šest ponovitev. Inokulirane agarne plošče smo v popolni temi inkubirali v rastni komori pri 25 in 15 °C ter 60 % r. v. z. Površinske priraste micelija smo ugotavljali po 7 in 14 dneh s pomočjo analizatorja slike (Nikon NIS Elements BR 2.30). Dobljene rezultate smo statistično iz vrednotili s pomočjo Student-Newman-Keuls testa pri 5 % tveganju.

### 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

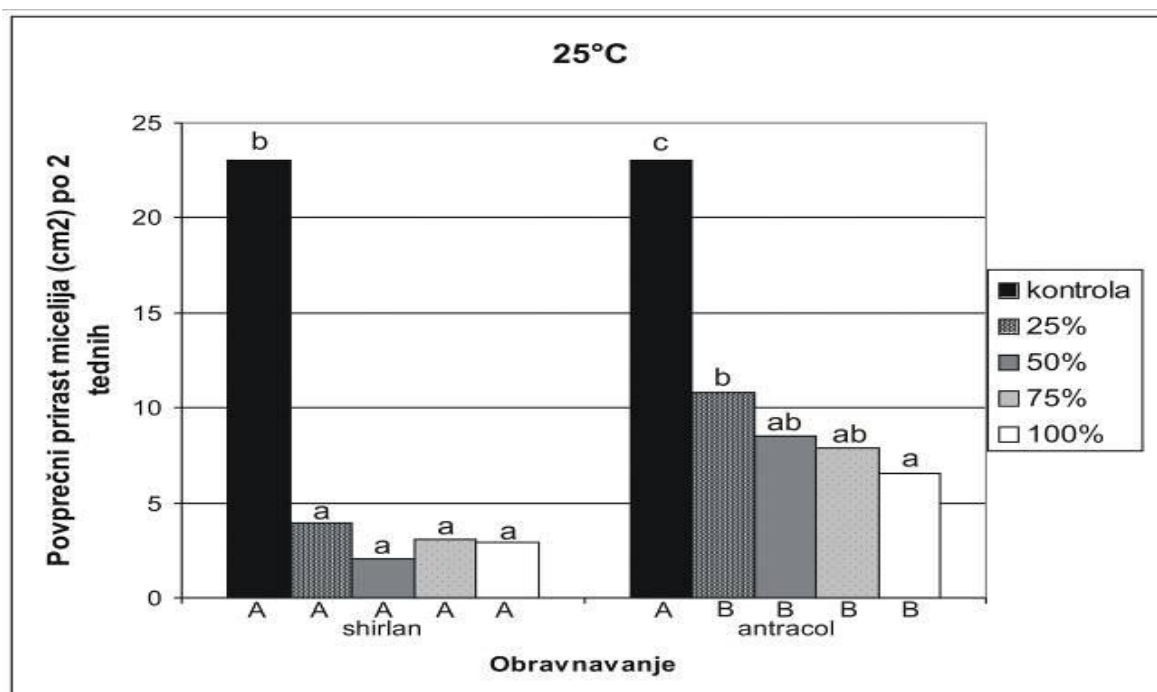
Oba preučevana talna herbicida imata pri vseh uporabljenih koncentracijah močan fungistatičen učinek na rast micelija glive *B. bassiana* (slika 1).



Slika 1: Povprečne površine micelija glive *B. bassiana* pri različnih koncentracijah dveh herbicidov po 14 dneh na temperaturi 25 °C in 60 % r. v. z.

Pri pripravku Racer ni statistično značilnih razlik med uporabljenimi koncentracijami herbicida. Tako ima že 25 % koncentracija enak fungistatičen učinek kot 100 %. Pri 100 in 50 % koncentraciji gliva sploh ne raste. Podobno je pri pripravku Sencor, kjer pa je pri 25 % koncentraciji fungistatičen učinek nekoliko manjši. O negativnem delovanju pripravka Sencor

DF (metribuzin) poroča tudi Petzold s sodelavci (2001). Pri preizkušanju fungicidov smo ugotovili, da ima pripravek Antracol (propineb) manjši fungistatičen učinek na glivo *B. bassiana* kot pripravek Shirlan (fluazinam) (slika 2).



Slika 2: Povprečne površine micelija glive *B. bassiana* pri različnih koncentracijah dveh fungicidov po 14 dneh na temperaturi 25 °C in 60 % r.v.z.

Shirlan ima pri vseh preučevanih koncentracijah (100-25 %) enak zaviralni učinek, pri Antracolu pa se fungistatičnost zmanjšuje s koncentracijo pripravka v gojišču, vendar minimalno. Statistično značilna razlika obstaja samo med prirastom micelija pri 25 in 100 % koncentraciji pripravka, med vmesnimi koncentracijami pa ne.

V *in vitro* razmerah je od preučevanih FFS na rast micelija najbolj zaviralno deluje pripravek Racer (fluorkloridon), sledita pa mu Shirlan (fluazinam) in Sencor (metribuzin). Še najmanjši negativni vpliv na rast micelija je imel Antracol (propineb), čeprav je bila pri 100 % koncentraciji rast micelija v primerjavi s kontrolnim obravnavanje v povprečju manjša za več kot 50 %. Rezultatov rasti micelija glive *B. bassiana* pri 15 °C nismo predstavili, ker temperatura vpliva samo na prirast micelija, ne pa tudi na samo inhibicijo.

V eni od prejšnjih raziskav so ugotovili, da na fungicidno delovanje pripravkov, poleg aktivne snovi, vpliva tudi formulacija pripravka (Morjan in sod., 2002), iz česar sledi, da rezultatov raziskav ne moremo posploševati oziroma prenašati na vse pripravke z isto aktivno snovjo.

#### 4 SKLEPI

Metribuzin pri vseh koncentracijah signifikantno zavira rast micelija, fluorkloridon ga popolnoma zavre pri 100, 75 in 50 % koncentraciji, šibka rast je opazna šele pri 25 % poljski koncentraciji.

Fungicida fluazinam in propineb prav tako fungistatično delujeta na glivo, vendar je učinek nekoliko manjši kot pri herbicidih.

Inhibicija rasti micelija je v korelaciji s količino herbicida oziroma fungicida v gojišču.

## 5 ZAHVALA

Za finančno pomoč pri izvedbi raziskav se zahvaljujemo Fitosanitarni upravi Republike Slovenije v okviru Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.

## 6 LITERATURA

- Benz, G. 1987. Environment. V: Epizootiology of Insect Diseases (Ured. Fuxa, R. in Tanada, J.), Willey, New York, 177-214.
- Coremans-Pelseneer, J. 1994. Laboratory tests on the entomopathogenic fungus *Beauveria*. Bulletin of the IOBC/WPRS 17, 10: 147-154.
- Keller, s. 1991. Les maladies fongiques des ravageur et leur importance pratique. Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture, 23: 299-310.
- Luz, C., Bastos, N., Nunes R. 2007. In vitro susceptibility to fungicides by invertebrate-pathogenic and saprobic fungi. Mycopathologia, 164, 1: 39-47.
- Moorhouse, E.R., Gillespie, A.T., Sellers, E.K., Charnley. 1992. Influence of fungicides and insecticides on the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*, a pathogen of the vine weevil, *Othiorhynchus sulcatus*. Biocontrol Science and Technology 2, 49-58.
- Morjan, W.E., Pedigo L.P., Levis L.C. 2002. Fungicidal effects glyphosate and glyphosate formulations on four species of entomological fungi. Environmental Entomology, 31, 6: 1206-1212.
- Petzoldt, C., Kovach, J., Engel, J. .2001. Evaluating Pesticides for Their Impact on Beneficial Organisms. The Ohio State University. Delovno poročilo projekta USDA Northeast IPM Grant 2001-41530-01134. [http://www.nysipm.cornell.edu/publications/eiq/files/ben\\_org\\_eval\\_sum.pdf](http://www.nysipm.cornell.edu/publications/eiq/files/ben_org_eval_sum.pdf) (08-04-2011)
- Sterk, G., Hassan, S.A., Baillod, M., Bakker, F., Bigler, F., Blumel, S., Bogenschutz, H., Boller, E., Bromand, B., Brun, J., Cali, s J.N.M., Coremans-Pelseneer, J., Duso, C., Garrido, A., Grove, A., Heimbach, U., Hokkanen, H., Jacas, J., Lewis, G., Moreth, L., Polgar, L., Roversti, L., Samsoe-Peterson, L., Sauphanor, B., Schaub, L., Staubli, A., Tuset, J.J., Vainio, A., Van de Veire, M., Viggiani, G., Vinuela, E., Vogt, H. 1999. Results of the seventh joint pesticide testing programme carried out by the IOBC/WPRS-Working Group 'Pesticides and Beneficial Organisms'. BioControl, 44, 1: 99-117.
- Sterk, G., Heuts, F., Merck, N., Bock, J. 2003. Sensitivity of non-target arthropods and beneficial fungal species to chemical and biological plant protection products: Results of laboratory and semi-field trials. V: 1<sup>st</sup> International Symposium on Biological Control of Arthropods, Honolulu, 14-18 januar 2002, USDA Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team, 2003: 306-313.