

Výzkum alternativních způsobů ochrany obilnin proti houbovým patogenům (Research of alternative methods in cereals protection against fungal diseases)

Matušinsky¹, P., Zouhar², M., Pavela³, R., Nový², P.

¹Agrotest fyto, s.r.o., Kroměříž; ²Česká zemědělská univerzita, Praha;

³Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Praha

Souhrn: Rostliny jsou během svého života atakovány různými fytopatogenními houbami. V mnoha specializovaných laboratořích probíhá vývoj nových látek na ochranu rostlin. Vedle vývoje látek syntetických jsou testovány takzvané botanické pesticidy, tedy látky získané z vyšších rostlin. V současné době je registrováno a komerčně dostupno jen velmi málo pesticidů získaných nebo odvozených z rostlin či produktů jejich látkového metabolismu. V naší studii byly testovány esenciální oleje extrahované z pěti aromatických rostlin a jejich vliv na potlačení růstu mycelia pěti významných fytopatogenních hub napadajících obiloviny. Všechny esenciální oleje ovlivnily růst mycelia všech testovaných hub. Nejvíce redukoval růst hub olej z *Thymus vulgaris*. Chemické složení testovaných substancí bylo analyzováno pomocí plynové chromatografie.

Klíčová slova: biologická ochrana, botanické pesticidy, houbové choroby obilovin

Abstract: Plants are attacked by various phytopathogenic fungi. In many specialized laboratories are developing new plant protection substances. Besides the development of synthetic chemicals there are tested so-called botanical pesticides, substances derived from plants. Currently is registered and commercially available very few pesticides obtained or derived from plants, or products of their metabolism. In our study we tested essential oils extracted from five aromatic plants and their effect on inhibition of mycelium growth of five important phytopathogenic fungi attacking cereals. All essential oils affected the mycelial growth of all tested fungi. The best antifungal activity was demonstrated by *Thymus vulgaris*. Chemical composition of test substances was analysed by gas chromatography.

Key Words: biological control; botanical pesticides; cereal diseases

Úvod

Látky získané nebo odvozené z rostlin mají potenciál k využití v ochraně rostlin. Mohou svou strukturou a funkcí inspirovat vývoj nových fungicidů či pesticidů obecně. Není žádným překvapením, že rostliny obsahují ve svých tkáních látky, které je chrání proti okusu zvířel napadení hmyzem, napadením houbami či bakteriemi. Jsou to např. alkaloidy, terpeny, saponiny, fenolické látky, atd. Asi nejznámějším příkladem využití botanických pesticidů v zemědělské praxi jsou insekticidy s obsahem syntetických pyretroidů. Předlohou pro jejich přípravu byly pyrethryny původem z kopretiny (*Pyrethrum*). Důležitou součástí mnoha rostlin jsou vonné látky, které nazýváme esenciální či éterické oleje. Tyto oleje jsou těkavé, silně aromatické a v rostlinách jsou lokalizovány většinou v žláznatých trichomech nebo siličných kanálcích. Mohou prostupovat všechna pletiva jako u jehličnanů nebo se koncentrují do kůry, květů či semen. Plní v rostlinách převážně ochrannou funkci, většinou proti hmyzu, ale i proti napadení bakteriemi či houbami. Z chemického hlediska se esenciální oleje skládají z komplexních směsí monoterpenů, fenolů, diterpenů a sesquiterpenů zastoupených v různých poměrech. Přestože jsou esenciální oleje složeny z několika desítek komponent, obvykle obsahují 1–3 látky, které převažují a jsou pro určitý rostlinný druh typické. Např. u bazalky pravé (*Ocimum basilicum*) tvoří až 88 % z celkového zastoupení složek v oleji estragol u máty (*Mentha piperita*) 50–60 % mentol a u pomerančovníku (*Citrus sinensis*) 85 % limonen.

V naší studii jsme se zaměřili na testování antifungální aktivity esenciálních olejů z mateřídoušky (*Thymus vulgaris*), rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*), muškátu (*Pelargonium graveolens*), bedrníku (*Pimpinella anisum*) a fenýklu (*Foeniculum vulgare*). Pro testování byly vybrány důležité fytopatogenní druhy hub napadající obiloviny jako *Oculimacula yallundae* (stéblolam), *Microdochium nivale* (plíseň sněžná), *Mycosphaerella graminicola* (braničnatka pšenice), *Pyrenophora teres* (hnědá skvrnitost ječmene) a *Fusarium culmorum* (fuzariózy klasu).

Materiál a metody

Esenciální oleje použité v této studii byly zakoupeny u Essential Oil University, 16224 Charlestown-Bethlehem Rd, Charlestown, IN 47111 USA. Standardy pro stanovení složek esenciálních olejů byly zakoupeny u Sigma-Aldrich. Chemické složení esenciálních olejů bylo analyzováno plynovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) použitím Agilent 7890A GC, Agilent 5975C (hmotnostní detektor) a Agilent HP-5MS (kapilára 30 m × 0.25 mm, 0.25 μm film) (Santa Clara, CA, USA). Jako rozpouštědlo při analýzách byl použit, hexane (Merck).

Bylo testováno pět fytopatogenních druhů hub *Oculimacula yallundae*, *Microdochium nivale*, *Zymoseptoria tritici*, *Pyrenophora teres* a *Fusarium culmorum*. Od každého druhu byly do testu zařazeny vždy dva různé kmeny. Kmeny hub byly získány ze vzorků rostlin pšenice a ječmene (listy, stébla, zrno) z provozních pěstebních ploch na území České republiky. Inhibiční efekt esenciálních olejů byl testován měřením redukce růstu kolonií mycelia hub na médiu s odstupňovanými dávkami jednotlivých olejů. Připravené fragmenty mycelia o průměru 1.5 mm byly umístěny na Petriho misky s bramboro-dextrosovým agarem (3.9 %), streptomycinem (50 mg.l⁻¹) a smáčedlem Tween 80 (1 μl.ml⁻¹). Byly připraveny čtyři koncentrace média s esenciálními oleji (0.0, 1.0, 5.0 a 10.0 μl.ml⁻¹). Každý izolát byl testován v osmi opakováních. Po inkubaci při 18°C byly u rychle rostoucích hub po 3 dnech (*M. nivale*, *F. culmorum* and *P. teres*) a pomalu rostoucích hub po 14 dnech (*Z. tritici* and *O. yallundae*) měřeny průměry kolonií a byla vypočteno procento inhibice vzhledem k neošetřené kontrole.

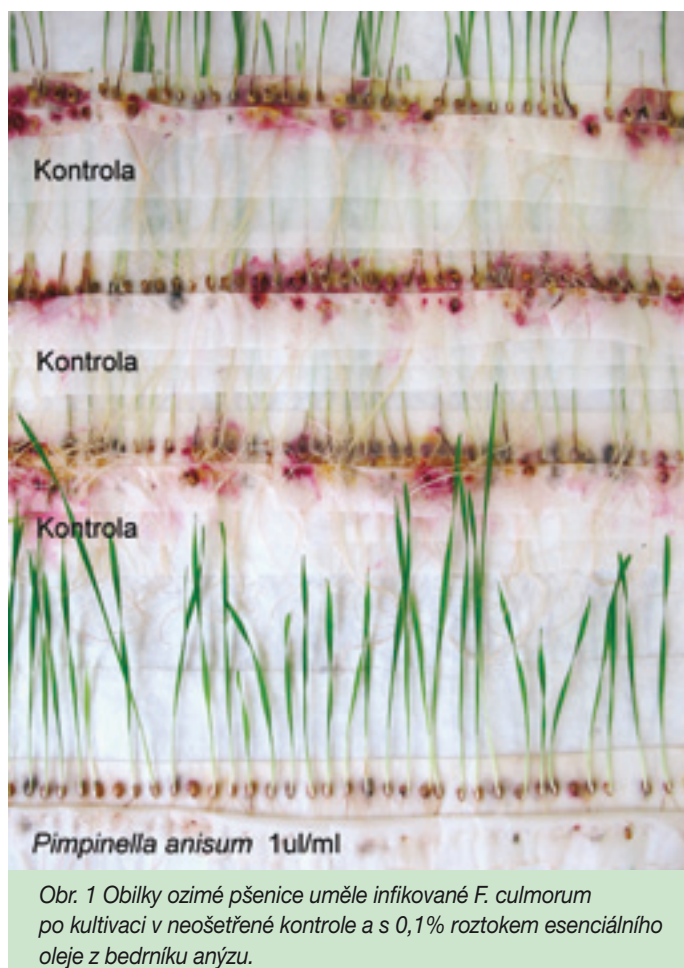
Dále byl proveden inhibiční test na uměle infikovaném osivu pšenice ozimé (Potenzial). Nejprve byly klasy v době kvetení rostlin uměle infikovány konidii houbou *Fusarium culmorum*. Z takto získaných klasů bylo na filtrační papír kladeno 50 obilek v jedné řadě. Filtrační papír byl svinut do svitku a spodní částí

ponořen do kultivačního roztoku. Kultivační roztok obsahoval 0,1% roztok jednotlivých esenciálních olejů. Byl také zařazen kontrolní test pouze s vodou. Každá varianta byla testována v šesti opakováních. Experiment probíhal při teplotě 20°C po dobu 10 dnů.

Výsledky a diskuse

Všechny testované oleje ovlivnily růst mycelia kultivovaných hub. Nejvýraznějšího inhibičního efektu bylo dosaženo použitím oleje z mateřídoušky (*Thymus vulgaris*) a muškátu (*Pelargonium odoratissimum*). Naopak nejnižší inhibiční efekt byl naměřen u variant z oleje z rozmarýnu (*Rosmarinus officinalis*) (Tab. 1). Esenciální olej z mateřídoušky inhiboval růst mycelia všech kmenů hub ze 100 % již při koncentraci 1 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Hodnoty ED_{50} se tedy pohybovaly hluboko pod úrovní 1 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Naopak nejnižší úroveň inhibice byla zaznamenána u oleje z *R. officinalis*, kde se hodnoty ED_{50} pohybovaly např. u *M. nivale* kolem 5.4 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Oleje z *P. anisum* a *F. vulgare* inhibovaly růst všech testovaných hub zhruba na úrovni 5 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. U variant s esenciálním olejem z *P. odoratissimum*, byl růst *O. yallundae*, *P. teres* a *Z. tritici* inhibován již při 1 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ a u *F. culmorum* a *M. nivale* byl zcela zastaven při koncentraci 5 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Esenciální olej z *R. officinalis* zcela inhiboval růst druhu *Z. tritici* při 5 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$, u *P. teres*, *O. yallundae* a jednoho kmene *M. nivale* při 10 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$. Oba kmeny *F. culmorum* a jeden kmen *M. nivale* nebyly zcela inhibovány olejem z *R. officinalis* ani při koncentraci 10 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tab. 1).

U biotestu s osivem infikovaným *F. culmorum* na filtračním papíru bylo zjištěno, že nejlépe inhiboval růst patogenu olej z *Thymus vulgaris*. Tento olej však současně vykazoval silné fytotoxické účinky. Kořeny klíčících rostlin byly inhibovány v růstu a kořenové čepičky byly silně zahnědlé. Naproti tomu olej



Meteorologické varování pro všechny plevele v pšenici, žitu a tritikale!

V jarních měsících očekávejte příchod silného hurikánu, který zasáhne celou Českou republiku. Ohrožena je chundelka metlice a všechny dvouděložné plevele, následně se očekává extrémně vysoká úroda obilnin.



Informace:
602 275 038

z *Pimpinella anisum* neměl na růst rostlin negativní vliv, přičemž jeho efekt na potlačení patogenu byl významný (Obr. 1). Tento olej téměř zcela inhiboval růst mycelia *F. culmorum* na obilkách.

Fungicidní účinnost těchto vybraných látek je v laboratorních podmínkách velmi dobrá. Ovšem to, co funguje v laboratoři, nemusí vždy stejně dobře fungovat v polních podmínkách. Zde vstupuje do hry heterogenita podmínek, způsob aplikace, povětrnostní vlivy a to zejména UV záření ze slunečního svitu. Esenciální oleje jsou dobře uzpůsobeny pro přítomnost v rostlinných pletivech a specializovaných útvech. Když jsou pak laboratorně z rostlin extrahovány např. hydrodestilací jejich chemická stálost je ohrožena oxidací a právě UV zářením. Tato „formulace“, užíjeme-li přeneseně termín používaný pro přípravky na ochranu rostlin, je vhodná pro zásobní uložení, nikoli pro přímou aplikaci postřikem na poli. Je úkolem výzkumníků, tuto otázku správně uchopit a využít vynikajících fungicidních vlastností esenciálních olejů. Z praktického hlediska je tedy nutno nalézt vhodný nosič či médium pro aplikaci účinné látky. Jedním ze způsobů, které by mohly zvýšit účinnost těchto látek při praktické aplikaci je systém mikrokapsulace. Látky jsou uzavřeny v mikrokapsulích, které jsou aplikovány do porostu. Kapsule jednak chrání svůj obsah před rozkladem UV zářením a pozvolna se otevírají, čímž uvolňují účinnou látku postupně. Zajímavý směr využití esenciálních olejů je v obalových materiálech potravin. Byla prokázána dobrá antimikrobiální účinnost, pokud jsou tyto látky zakomponovány do syntetických polymerů, z nich jsou následně vyráběny obaly na potraviny. Jejich škodlivost pro konzumenta je pak nižší než u syntetických antimikrobiálních látek. Navíc lze pracovat i s jejich dalšími pozitivními vlastnostmi, takže maso, sýry, ryby nebo ovoce může

být baleno do obalů s aromatem koření či citrusů apod. tak, aby nenarušovaly, ba naopak podpořily smyslové vnímání spotřebitele.

Chemické složení pěti esenciálních olejů metodou GC/MS prokázalo v naší studii přítomnost 22 až 52 komponent v jednotlivých olejích *F. vulgare* (22), *P. anisum* (23), *P. odoratissimum* (52), *R. officinalis* (31) a *T. vulgaris* (34). Převládajícími složkami oleje z *F. vulgare* byly anethol (68,44 %), limonen (11,06 %) a fenchon (6,72 %). Anethol dominoval také u oleje z *P. anisum* (88,53 %), který dále obsahoval poměrně vysoké množství estragolu (4,36%). Hlavními komponenty oleje z *P. odoratissimum* byly β -citronellol (24,86 %), geraniol (12,50 %), citronellyl (7,72 %), isomenthon (6,19 %) a γ -eudesmol (5,95 %), zatímco camphor (22,57 %), eucalyptol (19,94 %), α -pinen (14,57 %), camphen (10,80 %) a β -pinen (5,47 %) tvořily hlavní složky oleje *R. officinalis*. Převládajícími komponenty oleje *T. vulgaris* byly thymol (44,60 %), p-cymen (21,94 %) a γ -terpinen (7,80 %); tudíž, mateřidouškový olej v našem testu patří do tzv. „thymolového chemotypu“ (pozn. u tymiánu rozlišujeme celou

řadu chemotypů dle převládající složky). V předchozích studiích bylo prokázáno, že antifungální aktivita esenciálních olejů nelze dát do přímé korelace s jednotlivými složkami, ale spíše s jejich kombinacemi. Experimenty prokázaly, že i velmi nepatrný obsah jednoho z komponentů významně ovlivňuje fungicidní účinnost. Zdá se, že synergismus v působení jednotlivých složek je klíčem k sestavení přípravku s optimální účinností.

Biologické pesticidy jsou dnes již neodmyslitelnou složkou moderního zemědělství. Mohou být alternativou a i přes, v některých případech nižší účinnost, doplněním spektra používaných syntetických fungicidů. Těžiště jejich použití lze vidět rovněž v systémech ekologického hospodaření. Veřejností a spotřebiteli je používání bio pesticidů vnímáno velmi pozitivně. Navíc takové přípravky nezatěžují životní prostředí, vodní zdroje a nehrozí u nich riziko vzniku rezistence.

Poděkování

Studie byla podpořena projekty Národní agentury pro zemědělství a výzkum QJ1310226 a RO0211 a Ministerstvem školství mládeže a tělovýchovy CZ.1.07/2.3.00/30.0040.

Tab. 1: Efekt pěti esenciálních olejů ve čtyřech koncentracích přidaných do média (PDA) na růst kolonií mycelia pěti fytopatogenních hub (vždy dva kmeny od každého druhu) vyhodnocené ANOVA testem (Tukey 95%)

Esenciální olej	Koncentrace [$\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Průměr kolonie [mm]									
		M. nivale		P. teres		F. culmorum		Z. tritici		O. yallundae	
		Mn177	Mn30	Ptt52	Ptt17	Fc107	Fc289	Zt88	Zt96	Oy13	Oy14
<i>Pimpinella anisum</i>	0,00	32,00c	32,00c	21,50c	22,25c	45,13d	48,13c	12,00c	11,38c	27,50c	26,50c
	1,00	21,25b	21,00b	4,13b	9,50b	40,38c	45,75b	6,88b	4,13b	24,25b	15,50b
	5,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	1,38b	0,63a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	10,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	<i>F stat.</i>	291.49	1664.18	864.73	609.46	14445.3	5810.29	277.07	666.93	376.14	2311.2
<i>Thymus vulgaris</i>	0,00	32,00b	32,00b	21,50b	22,25b	45,13b	48,13b	12,00b	11,38b	27,50b	26,50b
	1,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,13a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	5,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	10,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	<i>F stat.</i>	6144.00	6144.00	2588.6	2410.74	29692.4	11926.1	366.55	3864.47	9075.0	1225.0
<i>Pelargonium odoratissimum</i>	0,00	32,00c	32,00c	21,50b	22,25b	45,13c	48,13c	12,00b	11,38b	27,50b	26,50b
	1,00	20,00b	10,50b	0,00a	0,00a	15,00b	16,63b	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	5,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	10,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	<i>F stat.</i>	1496.00	2979.00	2588.6	2410.74	299.11	166.99	366.55	3864.47	9075.0	1225.0
<i>Foeniculum vulgare</i>	0,00	32,00c	32,00c	21,50c	22,25c	45,13c	48,13c	12,00c	11,38c	27,50c	26,50c
	1,00	21,25b	18,75b	8,75b	9,50b	35,38b	39,00b	4,00b	3,13b	12,25b	10,50b
	5,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,63a	0,13a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	10,00	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,13a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	<i>F stat.</i>	1401.91	872.55	516.36	1058.99	4341.28	1631.61	256.00	1141.00	1012.0	15511.1
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0,00	32,00c	32,00c	21,50c	22,25c	45,13d	48,13d	12,00c	11,38c	27,50c	26,50c
	1,00	30,25c	32,00c	16,38c	17,63c	38,63c	39,00c	9,88b	8,63b	25,00c	26,25c
	5,00	22,50b	23,25b	6,63b	11,75b	25,00b	25,50b	0,00a	0,13a	13,75b	10,50b
	10,00	4,75a	0,00a	0,00a	0,00a	5,63a	7,25a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
	<i>F stat.</i>	250.96	256.79	156.75	131.15	546.74	238.80	305.75	274.35	141.69	498.99

Pozn. - P hodnota je ve všech případech rovna 0.000