

A CGA 64250 *Rhizobium japonicum*-gátló hatásának tanulmányozása laboratóriumi modellkísérletben

OROS GYULA, H. HEINONEN-TANSKI és KECSKÉS MIHÁLY

MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, Budapest, Helsinki Egyetem Mikrobiológiai Tanszéke, Helsinki (Finnország) és MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

Előző munkánkban beszámoltunk a pillangós növényeknél alkalmazott növényvédőszer-ek (elsősorban gombaölő- és gyomirtószer) különböző helyekről származó *Rhizobium trifolii* törzsekre gyakorolt gátló hatásáról [4]. A vizsgált 57 készítmény közül csak néhány gátolta jelentős mértékben növekedésüket in vitro, némelyek pedig szubletális dózisokban serkentették növekedésüket (1. táblázat). Ezen eredményeink összhangban vannak más szerzők által közölt idevágó adatokkal [1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12].

A vizsgált szerek közül az egyik legaktívabbnak a triazolszármazék szisztemikus fungicidok közé tartozó új készítmény, a 25 WP formában kiszerezelt CGA 64250 (1. ábra) bizonyult. Mivel gombaölő hatásáról eddig kevés közlemény jelent meg [5, 10, 13, 14, 15], ezért baktériumölő hatása mellett fungicid hatásspektrumát is megvizsgáltuk. Ezen toxikológiai adatainkra támaszkodva próbáltuk felderíteni a CGA 64250 hatását fitopatogén gombák és *Rhizobium japonicum* közötti kompetíciós kölcsönhatásokra.

Anyagok és módszerek

A kísérletekhez használt növényvédőszer kereskedelmi minőségűek voltak. A baktériumölő hatást a következő módon határoztuk meg: A *Rhizobium* törzseket beef extract, pepton, NaCl, agar-agar (rendre: 1,0; 5,0; 5,0; 15 g l⁻¹) táptalajon neveltük. Ugyanezen táptalaj 30 ml-ébe kevertük be megszilárdulás előtt a vizsgálni kívánt növényvédőszer 3 mg hatóanyagot tartalmazó mennyiségét, s a táptalajt két Petri-csészébe öntöttük. A baktériumokat 25 tüskés oltólemezzel oltottuk le, s 23–25 °C-on inkubáltuk. A növekedést 48 és 72 óra múlva értékeltük.

A más baktériumnemzetségekbe (*Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* és *Corynebacterium*) tartozó fajokat Agar portáptalajon (Human OEV) neveltük, illetve vizsgáltuk. Az eljárás megegyezett a fentebb ismertetettel. Az eredményeket a nemzetségekre vonatkoztatott legkisebb hatékony (MEC) és legkisebb gátló (MIC) koncentrációértékekben megadva közöljük (mg l⁻¹), ami esetünkben azt jelenti, hogy az adott koncentrációértéknél a nemzetség valamely faja vagy törzse már nem nő (MEC), illetve a vizsgált fajok egyike sem nő (MIC). A gombaölő hatást burgonya-dextróz táptalajon meghatározott telepátmérenövekedés gátlása alapján értékeltük. A toleranciaszinteket probit-log papíron határoztuk meg.

A fitopatogén gombák és a *Rhizobium japonicum* közötti kompetíciós viszonyt a következő módon határoztuk meg: 90 mm átmérőjű Petri-csészé egyik felében a 2. ábrán látható módon, körhúrként vonalba leoltjuk a baktériumot faltól-falig. A másik téréfélbe centrálisan elhelyezzük a gomba agarizált tenyészetének 5 mm átmérőjű korongját. A tenyészeteket 22 °C-on fénytől védve inkubáltuk. Naponta értékeltük, megmérve a gombatelep baktériumkolóniára merőleges és azzal párhuzamos átmérőjét. A kölcsönhatást a gombatelep alakjának torzulása, illetve a baktériumkolónia vizuálisan megfigyelhető elváltozásának alapján értékeltük. E vizsgálatok során a növényvédőszer a mikroorganizmusok leoltása előtt 0,1 mg l⁻¹ végkoncentrációban inkorporáltuk a táptalajba, s a növényvédőszer-mentes tenyészetekhez viszonyított eltérések alapján következtettünk a növényvédőszer hatására.

1. táblázat

**Pillangósokban használható növényvédőszer
hatása *Rhizobium trifolii* törzsekre**

Hatás módja	Növényvédőszer	
	gombaölőszer	gyomirtószer
Serkent*	<i>kaptán</i> <i>karboxin</i> <i>fenarimol</i> <i>oxikarboxin</i> <i>fuferidazol</i> <i>triforin</i>	<i>dimetaklór</i> <i>butilát</i> <i>vernolát</i>
Gátol	<i>kaptán**</i> <i>folpet**</i> CGA 64250** <i>fuferidazol**</i> <i>F-849***</i> <i>tiabendazol***</i> <i>triforin***</i>	<i>dinoseb-acetát**</i> <i>linuron**</i> <i>diuron**</i> <i>deiquat</i> <i>paraquat***</i> <i>difenzoquat***</i>

* szubletális dózisokban;

** MIC <100 mg/l

*** MIC ~100 mg/l

Eredmények és megvitatásuk

A Tilt 25 WP (CGA 64250) baktériumölő mellékhatása, összehasonlítva a Tachigaren 70 WP (hymexazole) és a HPMTS bactericid hatásával, nem jelentős (2. táblázat). A *Rhizobium* törzsek azonban a többi baktériumokkal összevetve különösen érzékenyek mutatkoztak iránta. A baktericidként forgalmazott HPMTS-nél kb. tízszer hatékonyabb in vitro.

A fungicid hatásvizsgálatok adatai szerint a CGA 64250 gombaölő hatása nem korlátozódik egyetlen családra, bár a *Phycomyces* osztály tagjai jobban tolerálják e vegyületet,

2. táblázat

A CGA 64250 antibakteriális hatásának összevetése más vegyületekével

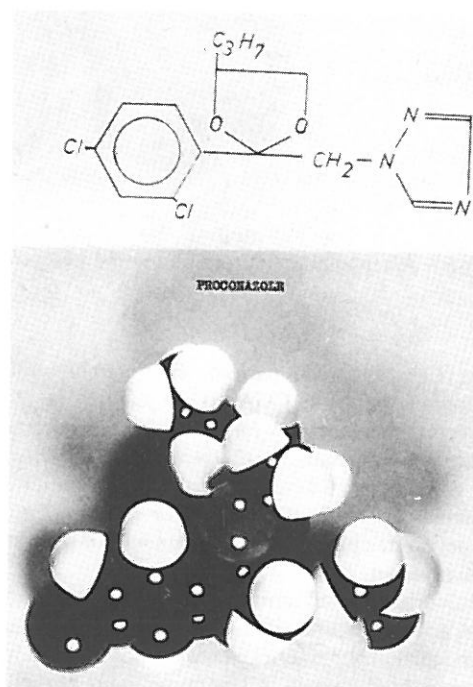
Baktériumnemzetség	Vizsgált fajok/törzsek száma	Vegyületek		
		CGA 64250	HPMTS	Hymexazol
A legkisebb hatékony (MEC) és a legkisebb gátló (MIC) koncentráció-határértékek, mg l ⁻¹				
<i>Agrobacterium</i>	2/4	50— 250	50—100	250— 500
<i>Corynebacterium</i>	7/9	1— 250	1—100	100—1000
<i>Erwinia</i>	3/4	1—1000	1—100	—
<i>Pseudomonas</i>	2/5	250—1000	25—200	250—1000
<i>Rhizobium</i>	2/26	1— 10	100	1000
<i>Xanthomonas</i>	4/4	5— 100	1—100	250— 500

3. táblázat

Növényi kórokozó gombák toleranciaszintje CGA 64250 iránt

Minimális inhibitor koncentrációértékek, mg proconazole/liter táptalaj				
> 1000	1000—100	100—10	10—1	< 1
<i>Mucor mucedo</i> *	<i>Pythium ultimum</i> *	<i>Phytophthora cactorum</i> *	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> *	<i>Macrophomina phaseolina</i> *
<i>Rhizopus oryzae</i> *	<i>Phytophthora megasperma</i> *	<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Nectria cinnabarina</i>	<i>Chetomium sp.</i>	<i>Penicillium sp.</i>		
	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i> *	
	<i>Colletotrichum dematium</i>	<i>Fusarium nivale</i>		
		<i>Ceratostomella basicola</i> *		
		<i>Colletotrichum atramentarium</i>		
		<i>Diaporthe phaseolorum</i> *		
		<i>Botrytis cinerea</i> *		
		<i>Alternaria sp.</i>		
		<i>Trichotecium roseum</i>		
		<i>Stemphylium radicum</i>		

* a fajt bevontuk a *Rhizobium japonicum*mal végzett kölcsönhatás-vizsgálatokba.

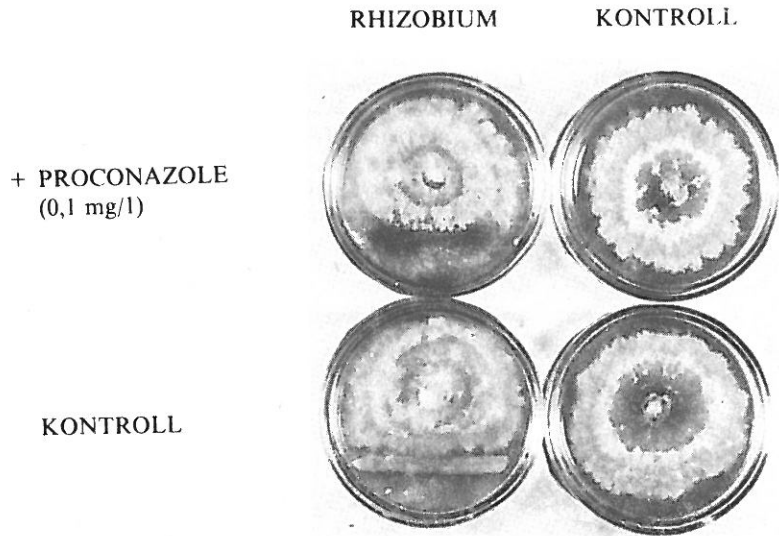


1. ábra

A proconazole (CGA 64250) szerkezete. 1-[2-/2,4-diklórfenil/-4-propil-1,3-dioxolan-2-ilmetil]-1,2,4-triazol

mint a valódi gombák (3. táblázat). Hatásspektruma széles, és különösen hatékony a pillangósok néhány fontos kórokozójával szemben, mint pl. a babfenésedés, száraz gyökérotthadás, szárkorhadás, hervadás stb. A készítmény kipróbálása az in vitro hatástani vizsgálatok alapján a pillangós növények betegségei elleni védekezésben indokoltak tűnik.

A kompetíciós vizsgálatokban csak egyetlen gomba, a *Diaporthe phaseolorum*, befolyásolta megfigyelhető módon a *R. japonicum* kolóniát CGA 64250 jelenlétében. A baktériumkolónia a gombahifák szomszédságában megbarnult s degenerálódott. A többi esetben nem figyeltünk meg elváltozást.



2. ábra

A proconazole befolyása a *Rhizobium japonicum* *Diaporthe phaseolorum*-gátló hatására

A *D. phaseolorum*, *Ceratostomella basicola* és *Pythium ultimum* növekedését a *R. japonicum* gátolta. Ezt a gátló hatást a CGA 64250 jelenléte a *D. phaseolorum* esetében feloldotta, míg a másik két esetben fokozta. A *Rhizoctonia solani* telep növekedését csak a CGA 64250 jelenlétében gátolta a baktérium. A *Colletotrichum dematium* és a *Macrophomina phaseolina* növekedését a szer jelenlététől függetlenül serkentette a *R. japonicum*. A *Colletotrichum lindemuthianum*, *Botrytis cinerea*, *Mucor mucedo*, *Phytophthora cactorum*, *P. megasperma* és *Rhizopus oryzae* telepalakulását a *R. japonicum* nem befolyásolta sem a CGA 64250 jelenlétében, sem hiányában.

Kísérleteinkben elsősorban a baktériumnak a gombákra gyakorolt hatását illetően sikerült adatokat nyerni. A gombák fejlődésében bekövetkezett elváltozások ugyanis mérhető, illetve vizuálisan sokkal megbízhatóbban értékelhetők, mint a baktériumkolónia esetében. Ez kétségtelenül modellünk egyik hiányossága. A növényvédőszer közvetlen hatását valószínűleg kizárhatjuk, mivel az alkalmazott koncentráció a legtöbb esetben sokkal alacsonyabb, mint a MIC-érték (2. táblázat).

Következtetések

Eredményeinkből következik, hogy eddig tisztázatlan mechanizmusú kölcsönhatások léteznek a *Rhizobium japonicum* és a talajlakó (soil-born) kórokozó gombák között. Az in vitro eredményeket azonban nem szabad közvetlenül a természetes ökoszisztémákra vonatkoztatni, ezek komplex jellege miatt. A közvetett hatásokat modellkísérletünkben nem tudjuk feltárni, a hatóanyagok a talajszemcséken történő adszorpciója, vagy más mikroorganizmusok jelenléte a közvetlen gátló vagy serkentő hatást is megváltoztathatja. Mivel a CGA 64250 szelektíven igen toxikusnak bizonyult a *Rhizobium*okra, néhány esetben megszüntette a *R. japonicum* és a fitopatogén gombák közötti kompetíciós viszonyt, a pillangósok esetében történő alkalmazása előtt meg kell vizsgálni hatását természetes körülmények között a *Rhizobium*ok megtelepedésére és tevékenységére.

Irodalom

- [1] AFIFI, N. M. et al.: Sensitivity of *Rhizobium* species to certain fungicides. Arch. Mikrobiol. **66**. 121—128. 1969.
- [2] FISCHER, D. J.: Effects of some fungicides on *Rhizobium trifolii* and its symbiotic relationships with white clover. Pestic. Sci. **7**. 10—18. 1976.
- [3] GILBERG, B. O.: On the effects of some pesticides on *Rhizobium* and isolation of pesticide resistant mutants. Arch. Mikrobiol. **75**. 203—208. 1971.
- [4] HEINONEN-TANSKI, H., OROS, Gy. & KECSKÉS, M.: The effect of soil pesticides on the growth of red clover *Rhizobia*. Acta Agric. Scand. **32**. 283—288. 1982.
- [5] HENRY, M. J. & SISLER, H. D.: Inhibition of ergosterol biosynthesis in *Ustilago maydis* by the fungicide 1-/2-/2,4-dichlorophenyl/-4-erthyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl/-1H-1,2,4-triazole. Pestic. Sci. **12**. 98—102. 1981.
- [6] KASZUBIAK, H.: The effect of herbicides on *Rhizobium*. Susceptibility of *Rhizobium* to herbicides. Acta Microbiol. Polon. **15**. 357—363. 1966.
- [7] KASZUBIAK, H.: The effect of herbicides on *Rhizobium*. II. Adaptation of *Rhizobium* to Afalon, Aretit and Liro-Betarex. Acta Microbiol. Polon. **17**. 41—49. 1968.
- [8] KECSKÉS, M. & VINCENT, M. J.: The effect of some fungicides on *Rhizobium leguminosarum* species. I. Laboratory investigations. Agrokémia és Talajtan. **18**. 57—70. 1969.
- [9] MANNINGER, E., BAKONDI, É. & TAKÁTS, T.: The effect of Gramoxon on N-fixing microorganisms. Symp. Biol. Hung. **11**. 401—404. 1972.
- [10] PAULUS, A. O.: New systemic fungicide for control of ornamental and vegetable diseases. Meded. Fac. Landbouwwet Rijksuniv. Gent. **45**. 245—252. 1980.
- [11] STAPHORST, J. L. & STRIJDOM, B. W.: Effects on rhizobia of fungicides applied to legume seed. Phytophylactica. **8**. 47—54. 1976.
- [12] SZEGI, J. et al.: The influence of Gramoxone on N-fixing microorganisms. Trans. 10th Int. Cong. Soil Sci. **III**. 179—184. 1974.
- [13] URECH, P. A. et al.: The control of airborne diseases of cereals with CGA 64250. Proc. Brit. Crop Protection Conference — Pests and Diseases. 508—515. 1979.
- [14] VANGESTEL, J.: Synthesis and screening of a new group of fungicides: 1-/2-/phenyl-1,3-dioxolan-2-ylmethyl/-1,2,4-triazoles. Pestic. Sci. **11**. 95—99. 1980.
- [15] VANREET, G., HEERES, J. & WALS, L.: Antimicrobial and plant-growth regulating triazole derivatives. Janssen Pharmaceutica N. V. CA. **91**. 175361z. 1979.