

BAROSS-EA-KFI-2008-0086
(OMFB-00151/2010)

A gyökérrontó tapló elleni biológiai növényvédelmi készítmény kidolgozása

1. munkaszakasz (2009. augusztus 1. – 2010. július 31.)

Nemaform Kutató, Szolgáltató Kft.
Erdészeti Tudományos Intézet
NEFAG Nagykunsági Erdészeti és Faipari Zrt.

Projektvezető: Dr. Lakatos Tamás

I. Az 1. munkaszakaszban elvégzett munka részletes ismertetése

A jelen projekt megvalósításával a szakmai konzorcium célja egy olyan, a *Phlebiopsis gigantea* gomba inokulumait tartalmazó biológiai növényvédelmi készítmény kidolgozása, amely hatékonyan képes megakadályozni a gyökérrontó tapló (*Heterobasidion annosum*) kártételét, és ezzel megoldani a fenyőerdők egyik legjelentősebb erdővédelmi problémáját. A munka magában foglalja az Erdészeti Tudományos Intézet birtokában lévő *Phlebiopsis* törzsgyűjtemény mellett a konzorciumi tagok erdőiből új izolátumok begyűjtését, a kórokozó gomba populációinak felmérését, a növényvédelmi célra alkalmas *Phlebiopsis* izolátumok ipari előállításának megoldását, és a kísérleti készítmény beillesztését az erdészeti technológiába. A projekt sikeres megvalósítása esetén létrejövő készítmény hiánypótló lenne a hazai erdőgazdálkodók számára, hiszen a gyökérrontó tapló kártételének megakadályozására nincs hatékonyan alkalmazható megoldás. Az alábbiakban a projekt első munkaszakaszában elvégzett munkáról adunk áttekintést.

I/1.1. A konzorciumi partnerek erdőterületeiről *Heterobasidion annosum* és *Phlebiopsis gigantea* izolátumok begyűjtése

A részfeladat célja: Az erdei ökoszisztémákban kiemelten nagy jelentősége van a szelektív vagy biológiai védekezési technológiáknak. Ilyen növényvédelmi technológia a kórokozók ellen alkalmazott antagonista gombafajok vagy más mikroorganizmusok alkalmazása. A hazai fenyvesek egyik legveszélyesebb kórokozója, a gyökérrontó tapló (*Heterobasidion annosum*) ellen egy antagonista gombafaj, az óriás területgomba (*Phlebiopsis gigantea*) alkalmazásával próbáljuk meg a hatékony biológiai védekezést fenyő állományokban. A megfelelő oltóanyag előállításának első lépése a hazai fenyvesekben természetes módon előforduló gombafajok termőtesteinek begyűjtése és ezekből a termőtestekből izolátumok és törzstenyészetek előállítása a további vizsgálatokhoz.



1. kép: *Heterobasidion annosum* által fertőzött kiritkuló erdőfenyő állomány



2. kép: *Heterobasidion annosum* termőteste az elhalt fa gyökérfőjében

Módszerek: A *Heterobasidion annosum* és *Phlebiopsis gigantea* termőtesteket különféle korú, gyökérrontó taplóval fertőzött fenyvesekből gyűjtöttünk (1. kép). A területbejárások során a már korábban elhalt fák gyökérfőjében a felszín közelében vagy az avartakaróval fedett gyökérfőben lehet a gyökérrontó tapló jellegzetes vöröses szegélyű, piszkosfehér termőrétegű

termőtesteit (2. kép) begyűjteni. A termőtesteket laboratóriumban, nedves kamrában steril tárgylemezre helyeztük, majd 24 órát rajta hagytuk sporulálni. A tárgylemezről a spórákat petricsészében, szélesztéses módszerrel vittük fel a gomba tenyésztésére általánosan használt 1%-os Difco maláta kivonatot tartalmazó 1,5%-os agar táptalajra. Az így nyert heterokarióta tenyészeteket használtuk a további vizsgálatokhoz.

Az óriás terülőgomba termőestei elsősorban kidőlt, elhalt faanyagon gyűjthetők. Mivel kevés kidőlt fát találtunk, és ezek többsége légszáraz állapotban volt, kis számú termőtestet tudtunk csak begyűjteni. A *Phlebiopsis* termőtestekből hasonló szélesztéses módszerrel készítettünk törzstenyészetet. A tenyészeteket 24 °C-on tároltuk, de a hosszabb idejű megőrzésre desztillált vizes eprüvettákban tenyészetkorongokat helyeztünk, melyet hűtőszekrényben tárolunk 4-5 °C -on. Ebben a formában a tenyészetek több évig életképesek maradnak.

Eredmények: A munkát 2009-ben kezdtük a NEFAG Erdészeti Zrt. erdeiben, valamint a nyírségi homoki termőhelyeken létesített erdei és lucfenyő állományokban. Összesen 28 erdőrészből sikerült termőtesteket gyűjteni. A Monori Erdészet területén 12, a Nyírerdő fenyveseiből 4 *Heterobasidion annosum* törzset sikerült izolálni, míg a *Phlebiopsis gigantea* gombából összesen 4 új törzstenyészetet tudtunk létrehozni, mivel a kérdéses időszakban csak igen kevés termőtestet találtunk. (A begyűjtött minták erdőrészből származó adatait, GPS koordinátáit a mellékletek tartalmazzák.)

I/1.2. *Heterobasidion* biotípusok elkülönítése

A részfeladat célja: A gyökérrontó tapló (*Heterobasidion annosum*) elleni biológiai védekezés egyik sarkalatos pontja, hogy megállapítsuk mely biotípusok fordulnak elő a hazai fenyő állományokban. Ennek ismeretében lehet egyértelműen meghatározni mely *Phlebiopsis gigantea* törzsek azok, amelyek megfelelő antagonista hatásúak és ennek megfelelően alkalmasak a biológiai védekezéshez.

Módszerek: A termőtestekből szélesztéssel készült heterokarióta tenyészeteket BULLER (1931) által leírt és CHASE (1988) által továbbfejlesztett módszerrel vizsgáltuk. Ennek során az ERTI törzstenyészeiből származó „P” és „S” jelű teszttereket használtuk. Ennek során a homokarióta tesztter törzseket párosítottuk az általunk begyűjtött heterokarióta tenyészetekkel. A fentiekben említett módszer szerint 3-6 heti inkubálást követően vizsgáltuk a csatképződést valamint a morfológiai változásokat a konfrontációs zónában. Amennyiben a tesztterben csatképződés és jelentősebb morfológiai változások láthatóak (pl. a konfrontációs zónában csak ritka micélium képződés alakult ki) abban az esetben a vizsgált heterokarióta tenyészet azonos típusú lehet.

Eredmények: A vizsgálatok során megerősítettük azt a korábban is már publikált eredményt miszerint a gyökérrontó taplónak a hazai fenyvesekben megtalálható az „S” valamint „P” biotípusa is. Ugyanakkor egyértelműen beigazolódott a finn és a hazai kutatók azon korábbi megállapítása miszerint a *Pinus* féléken (pl. az erdei és feketefenyőn) csak a „P” biotípus található, míg a lucfenyőn a „P” valamint az „S” biotípus egyaránt előfordul.

I/1.3. A korábban meglévő és az újonnan begyűjtött *Phlebiopsis* izolátumok közül a felszaporításra alkalmasak kiválasztása

A részfeladat célja: Megállapítani, hogy a begyűjtött és a törzstenyészeteinkben lévő *Phlebiopsis gigantea* gomba törzsek megfelelő antagonistái-e az adott *Heterobasidion annosum* biotípusainak és izolátumainak. Továbbá kiválasztani a védekezési technológiához legalkalmasabbnak tűnő izolátumokat, melynek két alapfeltétele, hogy az adott törzs erős antagonista hatású legyen, másrészt a tömegszaporítás során megfelelő mennyiségű és minőségű spóraszámot, fragmentumot produkáljon.

Módszerek: A begyűjtött gyökérrontó tapló törzstenyészetek valamint az összes rendelkezésre álló óriás terülő gomba törzstenyészet bevonásával petricsészés vizsgálatokat végeztünk (3. kép). Ennek során a két gomba tenyészeteiből agar korongokat helyeztünk egymástól azonos távolságra, majd háromheti inkubáció után vizsgáltuk a konfrontációs zóna jellegzetességeit. Ennek alapján meghatároztuk melyek azok, amelyek a legerősebb antagonista hatást mutattak a gyökérrontó taplóval szemben.



3. kép: *P. gigantea* és *H. annosum* törzsek kompetíciós vizsgálata petricsészében

Eredmények: A petricsészés vizsgálati eredmények igazolták, hogy a *Peniophora gigantea* gomba törzsek valamennyi vizsgált biotípusú *Heterobasidion annosum* törzsre nézve antagonista hatást gyakorolnak, azaz az óriás terülőgomba szempontjából mindegy melyik típusú gyökérrontó taplóval találja szembe magát, arra nézve antagonista hatással bír. Eltérés az antagonista hatás mértékében mutatkozik csupán, de ez sem jelentős.

A kompetíciós vizsgálatok során 10, antagonista hatás szempontjából megfelelőnek tűnő *Phlebiopsis* törzset választottunk ki. Az így kiválasztott törzsekkel kezdtük meg a tömegszaporítási vizsgálatokat. Ezen munka eredményéről a 2.1. részfeladatnál számolunk be.

I/2.1. A *Phlebiopsis gigantea* laboratóriumi léptékű felszaporítási kísérletei

A részfeladat előzményei, célja: Az 1.3. részfeladat során kiválasztott, részben újonnan begyűjtött, részben pedig az ERTI törzsgyűjteményében meglévő *Phlebiopsis* izolátumokkal megkezdni azokat a kísérleteket, amelyek eredményeinek felhasználásával ipari léptékű előállítási technikát lehet kidolgozni, ill. a 3.1. részfeladat kispárcellás kezeléseire a kísérleti anyagot biztosítani.

Az ipari léptékű előállítási technológiaként elvileg két megoldás jöhet szóba: egyrészt a gomba természetes életmódját jobban modellező szilárd fázisú fermentáció, másrészt a teljesen mesterséges életkörülményeket jelentő folyadékfázisú fermentáció. Az előbbi viszonylag egyszerű műszaki feltételeket követel meg, ugyanakkor az automatizálás lehetőségei, valamint a léptéknövelés megvalósíthatósága korlátozott. A folyadékfázisú

fermentáció jelentősen bonyolultabb technikai megoldás, viszont teljes mértékben automatizálható, és a léptéknövelés is könnyebben megoldható. Tekintettel arra, hogy rendelkezünk laboratóriumi, ill. félüzemi léptékű folyadékfázisú fermentorokkal, így egyértelműen a folyadékfázisú fermentáció lehetőségeit vizsgáltuk. Ennek megfelelően a részfeladat közvetlen célja az volt, hogy a rendelkezésre álló izolátumok közül kiválasszuk azokat, amelyek folyadékfázisban is kellő mértékben szaporodnak, valamint vizsgáljuk a folyadékfázisú előállítás optimális körülményeit.

Módszerek: Az 1.3. részfeladat eredményeként kiválasztott 10 izolátumot glükóz-maláta táplemezeken (20 g glükóz, 30 g maláta kivonat, 2 g KH_2PO_4 , 15 g agar-agar 1000 ml desztillált vízben), 28 °C-on tartottuk fenn. A tenyészetekből oltókacccsal kb. 5 mm x 5 mm felületű, hifákkal benőtt agardarabokat vágunk ki, s ezeket 50 ml glükóz-maláta táplevessel (20 g glükóz, 30 g maláta kivonat, 2 g KH_2PO_4 1000 ml desztillált vízben) telt 100 ml-es Erlenmeyer lombikokba helyeztük. A lombikokat 28 °C-on, 160 rpm sebességgel rázattuk. A különböző izolátumokból egy-egy alkalommal három párhuzamos lombikot indítottuk, az így beállított kísérleteket minden izolátummal két alkalommal megismételtük. A gombák növekedését a lombikokban vizuálisan figyeltük meg, ill. a táplevesből vett mintákat időszakosan mikroszkóp segítségével is megvizsgáltuk. A gombák növekedésének jellemzését két (az előzetes megfigyelések alapján jól növekvőnek bizonyuló izolátum esetén) tömegméréssel is elvégeztük. Ehhez 500 ml-es Erlenmeyer lombikokba 200 ml táplevest tettünk, majd 10 db hifagyönggyel (lásd lentebb) oltottuk be. A lombikokat a korábban megadott körülmények között tartottuk. 10 ill. 20 nap elteltével a párhuzamos lombikok egyikéből a tápleveset szűrőpapíron átszűrtük, és a gomba tömegét (65 °C-on végzett szárítást követően) meghatároztuk.

Három, a szabadföldi kisparcellás kísérletek során használni kívánt *Phlebiopsis* izolátumot laboratóriumi folyadékfázisú bioreaktorban is felszaporítottunk. Ehhez BR021 (Inel Kft.) típusú, 8 liter hasznos térfogatú, belső fordítóhengeres, üveg fermentort használtunk, amelyet glükóz-maláta táplevessel töltöttünk fel. A sterilizálás után a fermentort 200 ml gombaszuszpenzióval inokuláltuk. A tenyésztést 96 órán keresztül, 400 rpm keverési sebesség és 5 l/min levegőbetáplálás mellett 26 °C-on végeztük. A leállítást követően a fermentlevet Waring márkájú, laboratóriumi nedves roncsolóval homogenizáltuk, az inokulumkoncentrációt hígítást követően glükóz-maláta agarlemezekre határoztuk meg.

Eredmények: A *Phlebiopsis* izolátumok folyadékfázisú szaporíthatóságának két kritériuma volt. Egyrészt, a gomba növekedése kellően intenzív-e, viszonylag rövid idő alatt megindul-e a spórázás, vagy kialakulnak-e olyan hifalefűződések, amelyek propagulumként szolgálhatnak. Másrészt, a gomba növekedése megfelel-e a folyadékfázisú fermentorok követelményeinek. Ebből a szempontból a laza fonalas, ill. az erősen tömörödő növekedési formák a berendezések mozgó alkatrészeinek akadályozása miatt nem előnyösek.



4. kép: Különböző telepmorfológiájú *Phlebiopsis* izolátumok glükóz-maláta agarlemezen

A vizsgált izolátumok már agarlemezen is igen eltérő növekedési képet mutattak (lásd 4. kép), s rázatott lombikban is különbözőek voltak. Egyes esetekben erősen tömörödő gombócok alakultak ki (5. a kép), más esetekben szabályos apró gyöngyszerű képletek voltak megfigyelhetők (5. b kép), ill. előfordultak olyan izolátumok, amelyeknél a gyöngyszerű képletek lazák voltak, a fermentfolyadék zavarosodó volt (5. c kép). Mikroszkópos vizsgálattal az első típusnál a fermentfolyadékban csak néhány letöredező hifadarabot lehetett találni, a második csoportba tartozónál valamivel több ilyen hifaág volt megfigyelhető, míg a harmadik típusú izolátumoknál rendkívül sok lefűződő hifafragmentum mellett spórák is előfordultak, esetenként igen nagy mennyiségben. Nyilvánvaló, hogy az ipari léptékű előállítás szempontjából ez utóbbi csoport a leginkább kedvező. Ebbe a csoportba tartozik a 15.20, a 15.24b, a 15.31 és a 15.33K jelzésű izolátum.



5. a, b, c kép: Különböző növekedési típusú *Phlebiopsis* izolátumok rázatott lombikos tenyésztést követően (részletes magyarázatot lásd a szövegben)

A gomba rázatott lombikban való növekedésének jellemzésére, a 15.24b jelű izolátummal végzett tömegméréses vizsgálat eredménye igen szemléletes volt. A lombik inokulálásához használt 10 db hifagyöngy száraztömege 0,04 g volt. 10 nap után a gomba tömege 3,42 g, míg 20 nap után 7,51 g volt, ami 187-szerese a kiindulási tömegnek. A gomba tápanyaghasznosítási hatékonyságára jellemző, hogy a lombikba helyezett tápleves teljes szárazanyagtartalma 10,4 g volt, és ennek 72%-a beépült a gomba testanyagaiba.

A bioreaktorban végzett tenyésztési kísérletek legfontosabb eredménye az volt, hogy a rendszer a megadott paraméterekkel működőképesnek bizonyult. A gomba növekedése rendkívül gyors volt, 96 óra múltán a hifatömeg csaknem teljesen meggátolta a folyadék áramlását a fermentortestben. Egyik izolátum sem sporulált az adott körülmények között, de a fermentlében rendkívül sok lefűződött hifadarabkát lehetett találni. A fermentlé inokulumkoncentrációja jellemzően a 10^6 CFU/ml tartományban volt ($8 \times 10^5 - 5 \times 10^6$ értékeket mértünk). A hígítatlan fermentlével, 4 °C-on végzett tárolási kísérlet eredménye szerint a CFU érték csökkenése a fermentálást követő 4 hónap során nem csökkent érdemben. A rázatott lombikos ill. a fermentorban végzett felszaporítási kísérletek eddigi legfontosabb eredménye az volt, hogy igazoltuk, a rendelkezésre álló *Phlebiopsis* izolátumok hatékonyan előállíthatók folyadékfázisú fermentáció segítségével is. A legfontosabb, a munka későbbi szakaszában megoldandó problémának pedig a tiszta tenyészetek fenntartása bizonyult. Laboratóriumi körülmények között, steril munkahelyen is előfordul, hogy a tenyészetek más gombával fertőződnek be. Jellemzően az őszi időszakban, amikor a szabadban rendkívül sok romló gyümölcs van, a különböző penészgombák ill. élesztőgombák spóráinak mennyisége a levegőben rendkívül nagy, a tenyészetek befertőződésének az esélye is jelentős. A kísérleti tenyészetekből az ilyen, fertőzést jelentő gombák kiküszöbölésének lehetősége minimális, eddig ugyanis nem áll rendelkezésünkre szelektív hatású fungicid. A véletlen fertőzésként bekerülő gombák ugyan a növényvédelmi hatást nem befolyásolják (mivel a frissen kivágott fák tuskójának vágáslapja nem megfelelő élettér számukra), azonban a fermentáció

hatékonyságát csökkentik, különösen léptéknövelési lépéseket követően szaporodhatnak fel rendkívüli mértékben.

I/3.1. Kisparcellás szabadföldi kísérletek

A részfeladat célja: A laboratóriumban tesztelt oltóanyag szabadföldi alkalmazási technológiájának kidolgozása. A kiválasztott *P. gigantea* törzsek megeredési erélyének, hatékonyságának vizsgálata a friss tuskókon, valamint a kijuttatandó oltóanyag optimális mennyiségének meghatározása. E mellett a gyakorlati alkalmazás számára legmegfelelőbb kijuttatási technológia kidolgozása.

Módszerek:

1. Kisparcellás kezelés erdeifenyő állományban: 2009. október 20-án a Monori Erdészet területén lévő Csévharaszt 109/D, 28 éves erdeifenyő állományban szabadföldi tuskókezelési kísérletet állítottunk be, három, a tömegszaporítás során legalkalmasabbnak tűnő *P. gigantea* törzsszel. Az inokulumot mindhárom törzs esetében 10^3 - 10^4 - 10^5 CFU/ml töménységűre állítottuk be. A kezeléseket során 10-10 db frissen kivágott fa tuskóját kezeltük, valamennyi változat esetében 10 ml oltóanyagot kijuttatva egy-egy tuskóra (6. kép). A kijuttatás automata pipettával történt. A tuskókra juttatott oltóanyag megeredési vizsgálatát 2010. tavaszán végeztük, korongvágásos módszerrel (9. kép). Ennek eredményi útmutatást adnak a spóraszám és a kijuttatott oltóanyag mennyiségének helyes megválasztásához, a leghatékonyabb védekezési technológia végső kialakításához.



6. kép: Különböző töménységű oltóanyag használata a kisparcellás kezelési kísérletben

2. Kisparcellás kezelés lucfenyő állományban: 2010. május 5-én a Gyöngyöspata 46 D 2,1 ha területű, 21 éves lucfenyő állományban végeztünk tuskókezeléseket. A kísérletek során a frissen kivágott egyedek tuskóit kezeltük. Ugyanazokat az ígéretes *P. gigantea* törzseket alkalmaztuk, mint az erdeifenyőnél. Az inokulumot mindhárom törzs esetében 10^3 - 10^4 - 10^5 CFU/ml töménységűre állítottuk be. A kísérlet során törzsenként és változatonként átlagosan 50 db tuskót kezeltünk. A kijuttatás GSC500 (Black & Decker) elektromos permetezővel történt (7. kép).



7. kép: Kísérleti kezelés a lucfenyő állományban, elektromos permetező alkalmazásával

3. Félüzemi kezelés erdeifenyő állományban: 2010. május 6-án a Monori Erdészet területén lévő Csévharaszt 109/D, 28 éves erdeifenyő állományban (a korábbi kisparcellás kísérleti terület közvetlen közelében) az erdészet elvégezte a teljes állományban az üzemtervben előírt növedékfokozó gyérítést. Ezt követően, hasonló módszerekkel, mint a lucfenyő állományban, végrehajtottuk a friss tuskók kezelését az egész erdőrészletben, ami a korábban kezelt részek nélkül mintegy 2 ha területet jelent. Ebben az esetben is három *P. gigantea* törzset alkalmaztunk, de az oltóanyag spóraszámuk mindhárom esetben 10^4 CFU/ml töménységű volt. A kijuttatás háti permetezővel történt (8. kép). A kezelése során mindhárom *P. gigantea* törzs esetében átlagosan 1000 db tuskót kezeltünk.



8. kép: Félüzemi kezelési kísérlet erdeifenyő állományban, az oltóanyag kijuttatása háti permetezővel

Az oltóanyag megeredésének és hatékonyságának vizsgálata korongvágásos módszerrel történt. 2010. június 10-én felkerestük a Monori Erdészet, Csévharaszt 109/D, erdeifenyő állományban 2009. októberében létesített kisparcellás kezeléseket. Itt valamennyi kezelési változat tuskóiból 5-5 db korongot vágunk. A korongokat a laboratóriumban 5 perces áztatás után papírzacskóba majd műanyag zsákba helyeztük és így inkubáltuk 2 hétig. Ezt követően a korongokat megvizsgáltuk és megállapítottuk a *P. gigantea* megeredési intenzitását és borítási %-át a korongon.

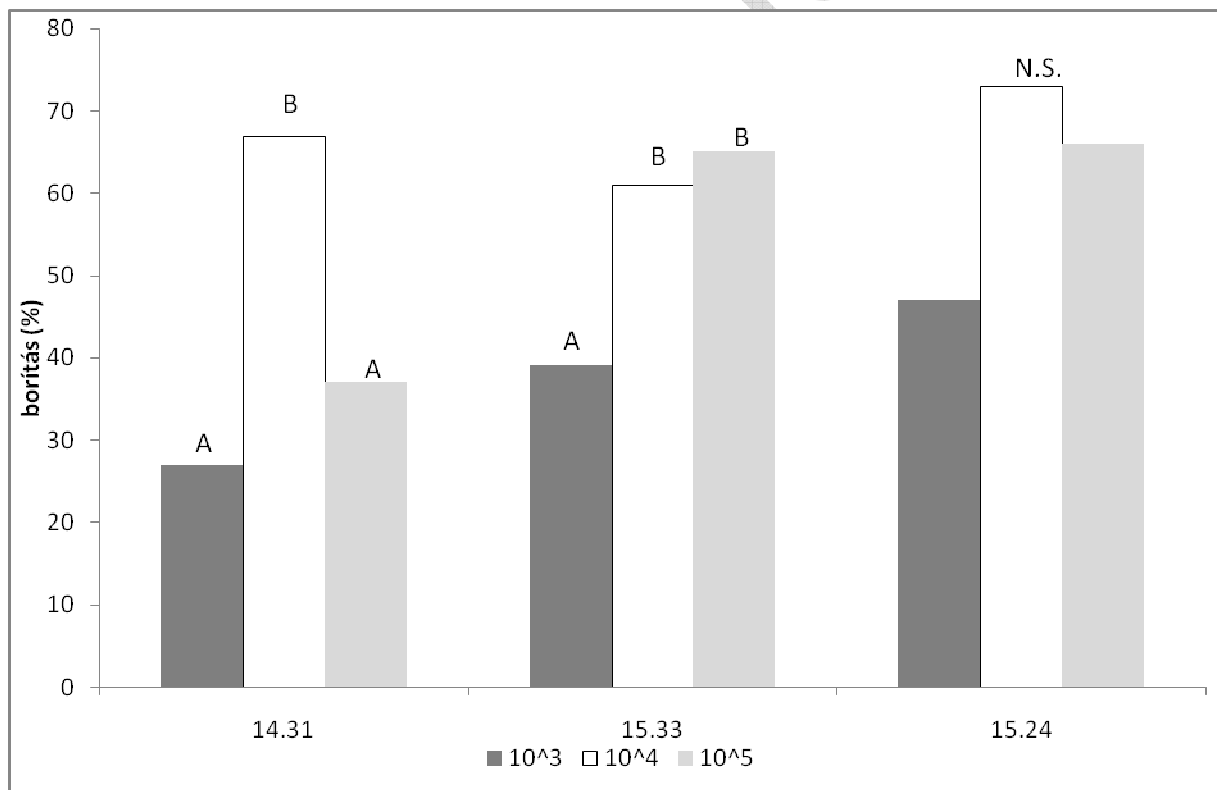
Eredmények:

Az első kisparcellás oltási kísérletből tudunk eddig mintakorongokat gyűjteni, mivel az oltást követően legalább hat hónap szükséges a gombának a tuskó megfelelő mértékű átszövéséhez. A korongvágásos vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy mindhárom, a szabadföldi

kísérletbe bevont *P. gigantea* törzs 100%-os megeredésű, azaz hatékonyan megtelepedett a tuskókon. E mellett mindhárom töménység valamennyi gombatörzs esetében elegendőnek bizonyult a *P. gigantea* sikeres inokulációjához. A különböző koncentrációjú inokulumoknál a gomba borítási értéke eltérő volt ugyan, de nem minden izolátum esetén, ill. nem mindig következetesen. Ez azt is jelenti, hogy a legalacsonyabb töménységű inokulumsuszpenzió is megfelelő lehet a kívánt növényvédelmi hatás eléréséhez, de legalábbis nem indokolható 10^4 CFU/ml-nél nagyobb töménység alkalmazása. Ez a potenciális készítmény területegységre jutó költsége szempontjából kiemelt jelentőségű.



9. kép: A mintakorongokon 2 hetes inkubálás után megjelentek a *P. gigantea* fehér micéliumai és konidiospóriái



1. ábra: Az eltérő *Phlebiopsis* izolátumok különböző koncentrációjú inokulumával kezelt tuskók vágáslapján a gomba átlagos borítási értéke (n=5). Az oszlopok feletti betűjelzés a statisztikai különbségre utal, $p < 0,01$ szignifikancia szinten, egyutas varianciaanalízissel tesztelve. (N.S. – nincs szignifikáns különbség)