

TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI VYBRANÝCH FUNGICIDŮ PROTI *DIPLOCARPON CORONARIAE* V *IN VITRO* PODMÍNKÁCH

IN VITRO EVALUATION OF EFFICACY OF SELECTED FUNGICIDES AGAINST *DIPLOCARPON CORONARIAE*

Zuzana Haňáčková, Adéla Zahradníčková, Pavlína Jaklová

VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s. r. o.,
Holovousy 129, 508 01 Holovousy

e-mail: zuzana.hanackova@vsuo.cz, ORCID ID: 0000-0003-3449-7011

ABSTRAKT

Skvrnitost listů jabloně, choroba, která je způsobena houbou *Diplocarpon coronariae* (také známé jako *Marssonina coronaria* – označení nepohlavního stádia) patří v oblastech s optimálními podmínkami pro její rozvoj k vážným patogenům jabloní. Houba napadá především listy jabloní a důsledkem toho dochází k předčasnému opadu listů, který nepřímo ovlivňuje velikost a barvu plodů, výnos a vývoj letorostů jabloně. V této práci byla testována účinnost vybraných fungicidů (Sercadis – úč. látka fluxapyroxad, Belanty – úč. látka mefentriflukonazol, Topas 100 EC – úč. látka penkonazol, Delan 700 WDG – úč. látka dithianon, Bellis úč. látka boscalid a pyraclostrobin, Geoxe 50 WG – úč. látka fludioxonil, Kumulus WG – úč. látka síra, Cyflamid 50 EW – úč. látka cyflufenamid) na inhibici růstu *D. coronariae* pomocí metody kultivace kolonií patogenu na médiu PDA s přidavkem fungicidu. Nejlepších výsledků dosáhly fungicidy Topas 100 EC, Bellis, Sercadis a Belanty s účinností 98–100 %. Nižší redukci růstu vykazoval Delan 700 WDG s účinností 68 %. Kumulus WG, Geoxe 50 WG a Cyflamid 50 EW jen omezeně redukovaly růst patogenu s účinností 37, 22 a 15 %. U některých kmenů tyto fungicidy neměly žádný účinek na redukci růstu.

Klíčová slova: *Diplocarpon mali*, diplokarponová skvrnitost listů a plodů jabloně, fungicidy, jabloň, *Marssonina coronaria*

ABSTRACT

Apple leaf blotch, a disease that is caused by the fungus *Diplocarpon coronariae* (also known as *Marssonina coronaria*) is a serious apple tree pathogen in areas with optimal conditions for its development. The fungus mainly attacks the leaves of apple trees, resulting in defoliation, which indirectly affects fruit size and color, yield and development of the apple tree shoots. In this experiment, the effectiveness of selected fungicides was tested (Sercadis – active ingredient fluxapyroxad, Belanty – active ingredient mefentrifluconazole, Topas 100 EC – active ingredient penconazole, Delan 700 WDG – active ingredient dithianon, Bellis – active ingredient boscalid and pyraclostrobin, Geoxe 50 WG – active ingredient fludioxonil, Kumulus

WG – active ingredient sulphur, Cyflamid 50 EW – active ingredient cyflufenamid) for inhibiting the growth of *D. coronariae* using the pathogen colony cultivation method on PDA medium with addition of the fungicide. The best results were achieved by fungicides Topas 100 EC, Bellis, Sercadis and Belanty with the effectiveness of 98–100 %. Lower growth reduction was shown by Delan 700 WDG with an efficiency of 68 %. Kumulus WG, Geoxe 50 WG and Cyflamid 50 EW limited the growth of the pathogen with a reduced efficiency of 37, 22 and 15 %, respectively. There was no effect of these fungicides on growth reduction of some fungal strains.

Keywords: *Diplocarpon mali*, Marssonina leaf and fruit blotch, fungicides, apple tree, *Marssonina coronaria*

ÚVOD

Skvrnitost listů jabloně způsobená houbou *Diplocarpon coronariae* (také známé jako *Marssonina coronaria* – označení nepohlavního stádia) představuje jedno ze závažných onemocnění, které ovlivňuje zdraví a produktivitu jabloní. Všechny komerčně dostupné kultivary jabloní jsou náchylné k této chorobě, což představuje výzvu pro pěstitele (Chauhan *et al.*, 2023). Patogen postihuje především listy a způsobuje předčasný opad listů jabloní během vegetačního období, což může stromy oslabit. Zdrojem primární infekce jsou apothecia produkovaná na přezimovaných listech.

První příznaky onemocnění se projevují v polovině léta ve formě červenavých skvrn na horní straně listů (Obrázek 1). Postupně se na napadených površích začínají vyvíjet černé plodnice známé jako acervuli, které jsou zdrojem sekundární infekce. V případě závažných infekcí může dojít k výraznému snížení množství a kvality produkovaných jablek (Lee *et al.*, 2011). Proti této chorobě je proto nutné přijmout vhodná preventivní opatření a monitorovat stav porostů s cílem minimalizovat škody způsobené tímto patogenem.

Tento houbový patogen je rozšířen celosvětově. Poprvé byl popsán v USA (1903) a v Japonsku, kde je známý od roku 1904 (Davis, 1903; Engler, 1906). V Evropě byl výskyt zaznamenán poprvé v letech 2001–2002 (Tamietti a Matta, 2003). První výskyt v ČR byl zaznamenán v roce 2015 (Topičová, 2019).

Opatření proti onemocnění způsobené houbou *D. coronariae* zahrnují mimo jiné včasnou aplikaci fungicidů. V současné době však není v ČR registrován žádný přípravek na ochranu proti této houbě. Je ale možné využít určité fungicidy, které jsou schválené proti strupovitosti jabloně. V ekologické produkci je možné použít přípravky na bázi hydrogenuhličitanu draselného (Topičová, 2019).

V této práci byla zjišťována účinnost fungicidů, povolených v ČR pro použití u jabloní, na redukci růstu *D. coronariae* v *in vitro* podmínkách. Výběr fungicidů byl cílen na různé chemické skupiny aktivních látek, včetně přihlédnutí na praxi jejich využívání v ČR během letního období, kdy může docházet k optimálním podmínkám pro rozvoj skvrnitosti listů jabloně. Testovanými fungicidy byly: Sercadis – úč. látka fluxapyroxad, Belanty – úč. látka mefentriřlukonazol, Topas 100 EC – úč. látka penkonazol, Delan 700 WDG – úč. látka dithianon, Bellis - úč. látka boskalid a pyraklostrobin, Geoxe 50 WG – úč. látka fludioxonyl, Kumulus WG – úč. látka síra a Cyflamid 50 EW – úč. látka cyflufenamid.

Obrázek 1. Příznaky skvrnitosti listů jabloně způsobené houbou *Diplocarpon coronariae*
Figure 1. Apple leaf blotch symptoms caused by the fungus *Diplocarpon coronariae*



(Autor fotografie: Zuzana Haňáčková)

MATERIÁL A METODY

Izolace *D. coronariae* a získání monosporických kultur

V roce 2023 byly odebrány listy infikované houbou *D. coronariae* na lokalitách Brodek, Doubravice, Hořice, Miletínské Lázně a Třebanice. Z infikovaných listů byly následně extrahovány spory houby a ty byly suspendovány ve sterilní vodě. Takto získaná suspenze byla poté aplikována na vodní agar v Petriho miskách. Po 24 hodinách kultivace v laboratoři při teplotě 21 ± 2 °C byly pod mikroskopem pomocí izolátoru odebírány jednotlivé klíčící spory, které byly přeneseny na čistý bramborovo-dextrozový agar (PDA) a kultivovány v laboratoři. Tímto byly získány monosporické kultury z různých lokalit. Potvrzení izolace *D. coronariae* bylo následně prokázáno sekvenací DNA.

Laboratorní testy – růst kolonií na agaru s přidavkem fungicidu

Screening účinnosti vybraných fungicidů byl pro účely sledování redukce růstu *D. coronariae* založen na pevném médiu. Pro experiment byly použity Petriho misky (Ø 10 cm) obsahující PDA agar obohacený o koncentraci fungicidů odpovídající koncentraci polních dávek. Celkem bylo testováno devět variant, včetně kontroly (čistý PDA agar) pro každý kmen patogenu (Tabulka 1). Do testu bylo zahrnuto celkem 12 kmenů patogenu.

Na každou Petriho misku byly naočkovány čtyři kousky mycelia patogenu o velikosti přibližně 1×1 mm. Jedna varianta experimentu byla testována v 10 opakováních. To znamená, že pro každý testovaný fungicid a kmen bylo testováno 10 misek po 4 koloniích mycelia. Jednotlivá mycelia byla inkubována ve fytotronu. Kultivační podmínky byly stanoveny na teplotu 23 °C a světelný režim 16 hod. světlo/8 hod. tma.

Vyhodnocení experimentu proběhlo po 30 dnech kultivace, kdy byly na analytických vahách zváženy jednotlivé kolonie patogenu. Účinnost přípravků proti *D. coronariae* v *in vitro* podmínkách byla stanovena dle Abbotta (1925) na základě hmotnosti růstu kolonií v testované variantě a jejího srovnání s kontrolou rostoucí na médiu bez fungicidu.

Tabulka 1. Seznam použitých přípravků

Table 1. The list of used products

Přípravek ¹⁾	Dávka ²⁾	Účinná látka ³⁾	Indikace ⁴⁾	Použitá koncentrace v PDA médiu ⁵⁾
SERCADIS	3 l/ha	Fluxapyroxad 300 g/l	strupovitost ⁶⁾	3 ml/l
BELANTY	2 l/ha	Mefentriflukonazol 75 g/l	strupovitost ⁶⁾ , padlí ⁷⁾ , stemfylviová skvrnitost hrušně ⁸⁾	2 ml/l
TOPAS 100 EC	0,5 l/ha	Penkonazol 100 g/l	padlí ⁷⁾ , strupovitost ⁶⁾	0,5 ml/l
DELAN 700 WDG	0,75 kg/ha	Dithianon 700 g/l	strupovitost ⁶⁾	0,75 g/l
BELLIS	0,8 kg/ha	Boskalid 252 g/l Pyraklostrobin 128 g/l	skládkové choroby ⁹⁾ , strupovitost ⁶⁾	0,8 g/l
GEOXE 50 WG	0,45/0,4 kg/ha	Fludioxonyl 500 g/kg	skládkové choroby ⁹⁾	0,45 g/l
KUMULUS WG	4,5–10 kg/ha	Síra ¹⁰⁾ 800 g/kg	padlí ⁷⁾	10 g/l
CYFLAMID 50 EW	0,5 l/ha	Cyflufenamid 50 g/l	padlí ⁷⁾	0,5 ml/l

1) Product, 2) Dose, 3) Active ingredient, 4) Indication, 5) Used concentration in PDA medium 6) Apple scab, 7) Powdery mildew, 8) Pear brown spot caused by *Stemphylium*, 9) Storage diseases, 10) Sulphur

VÝSLEDKY A DISKUZE

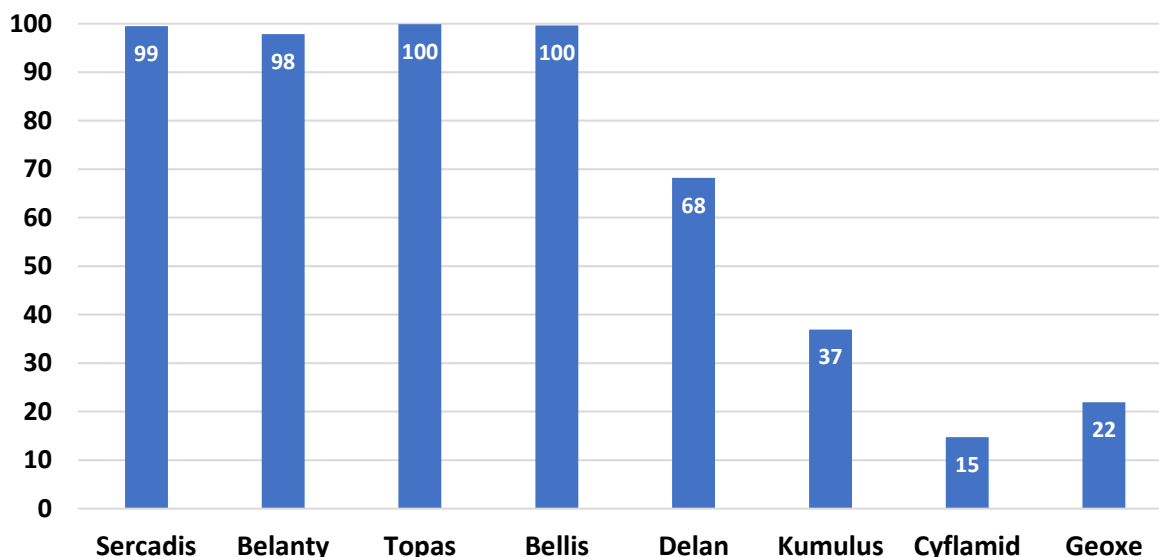
Nejvyšší účinnosti na redukcii růstu kolonie dosáhly přípravky Topas 100 EC a Bellis, jejichž účinnost byla 100%. Dalšími vysoce účinnými fungicidy byly přípravky Sercadis a Belanty s účinností 99 a 98 %. Přípravek Delan 700 WDG dosáhl střední účinnosti 68 %. Minimální efekt na redukcii růstu měly přípravky Kumulus WG, Geoxe 50 WG a Cyflamid 50 EW s účinnostmi 37, 22 a 15 %. Výsledky průměrných účinností jsou uvedeny v grafu 1, ilustrativní fotografie růstu *D. coronariae* na PDA médiu s fungicidy znázorňuje obrázek 2.

Ve studii Dang *et al.* (2017) azolové účinné látky (tebukonazol, hexakonazol, propikonazol a směs tebukonazolu a benziotiazolinonu) a strobilurin kresoxim-methyl významně inhibovaly růst mycelia *D. coronariae*. Nicméně jejich účinek byl nižší v inhibici klíčivosti spor patogenu. To odpovídá i našim výsledkům, kdy nejúčinnějšími přípravky byly azoly, strobilurin a SDHI fungicid.

Zatímco preventivní aplikace fungicidů mohou být proti patogenu *D. coronariae* dostatečně efektivní, jejich postinfekční účinek nemusí patogen eliminovat. Uspokojujících

postinfekčních účinností v podmínkách *in vivo* bylo dosaženo ve studii Kumar a Sharma (2016) u strobilurinů; s nejlepším účinkem u látky kresoxym-metyl (v ČR přípravek Discus). Azolové látky měly v této studii střední účinnost, dithiokarbamáty, kaptan a oxychlord měďnatý měly pouze nízkou účinnost.

Graf 1. Průměrná účinnost fungicidů na inhibici růstu kolonií *D. coronariae* v podmínkách *in vitro*
Graph 1. Average efficacy of fungicides on *in vitro* growth inhibition of *D. coronariae* colonies



Ačkoliv průměrná účinnost síry v přípravku Kumulus WG byla v naší studii poměrně nízká, v polních testech v Německu dosahovala minimálně 67% účinnosti a maximálně i 94% účinnosti (Bohr *et al.*, 2020). Málo účinný fungicid byl v naší studii také Geoxe 50 WG s účinnou látkou fludioxonil, který je pro jabloně indikován proti skládkovým hnilobám jako je *Botrytis* spp., *Monilinia* spp., *Nectria* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. nebo *Neofabraea vagabunda*. Ačkoliv se tato látka široce používá pro před sklizňové a posklizňové ošetření zeleniny a ovoce, mechanismus jejího působení není zcela objasněn. Předpokládalo se, že způsobuje nadměrnou tvorbu glycerolu, což má za následek praskání buněk houby a dále pak byl účinek fludioxonilu srovnáván s reakcí na osmotický stres (Brandhorst a Klein, 2019, Bersching a Jacob, 2021). Nejméně účinným fungicidem byl Cyflamid, jehož účinná látka cyflufenamid se využívá proti různým druhům padlí. Jeho mechanismus účinku není také zcela objasněn (FRAC, 2024), ale předpokládá se, že se liší od běžných fungicidů, což může omezovat jeho účinek jen na specifické druhy hub.

Vyhodnocení účinnosti fungicidů běžně používaných pěstiteli v jabloňových sadech ČR na inhibici růstu *D. coronariae* může pomoci s výběrem vhodných látek do aplikačních plánů v případě epidemie této choroby. Nicméně výsledky *in vitro* pokusů inhibice růstu slouží obecně pouze k předběžnému vyhodnocení účinnosti dostupných látek proti specifickým patogenům. K celkovým závěrům jsou důležité další testy sledující účinnost na klíčivost, skleníkové testy účinku preventivních a postinfekčních aplikací, a především polní testování přímo v sadech.

Obrázek 2. Ilustrační fotografie růstu *D. coronariae* na PDA agaru s přidavkem různých fungicidů o koncentraci odpovídající polním dávkám na 1 ha. Kontrolní varianta (= KONTROLA) zobrazuje růst na čistém PDA agaru.

Figure 2. Illustrative pictures of *D. coronariae* growth on PDA agar with addition of various fungicides corresponding to field doses per 1 ha. The control treatment (= KONTROLA) displays the growth only on PDA agar. Other treatments are marked according to the commercial names of fungicides in Czechia.



(Autor fotografie: Adéla Zahradníčková)

ZÁVĚR

Při testování účinnosti inhibice růstu původce listové skvrnitosti jabloně *D. coronariae* vybranými fungicidy v podmínkách *in vitro*, bylo dosaženo nejlepších výsledků u přípravků Topas 100 EC, Bellis, Sercadis a Belanty. Střední účinnost vykazoval přípravek Delan 700 WDG, zatímco jako minimálně účinné byly vyhodnoceny přípravky Kumulus WG, Geoxe 50 WG a Cyflamid 50 EW. Tyto výsledky je potřeba dále ověřit dalšími *in vivo* a polními testy, nicméně mohou sloužit k orientačnímu výběru fungicidů do aplikačních plánů pro prevenci výskytu listové skvrnitosti jabloně.

PODĚKOVÁNÍ

Tato práce vznikla za finanční podpory Ministerstva zemědělství – projekt QK220219 (Inovace integrované a ekologické produkce ovoce a révy vinné v návaznosti na nově se šířící druhy

škodlivých organismů). Poděkování patří Janě Kupkové za sběr dat a technickou činnost v laboratoři.

LITERATURA

- ABBOTT, W. S. Method of computing the effectiveness of an insecticide. Online. *Journal of Economic Entomology*. 1925, vol. 18, no. 2, p. 265–267. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>. [cit. 2024-03-04].
- BERSCHING, K. a JACOB, S. The molecular mechanism of fludioxonil action is different to osmotic stress sensing. Online. *Journal of Fungi*. 2021, vol. 7, no. 5, p. 393. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/jof7050393>. [cit. 2024-03-04].
- BOHR, A.; BUCHLEITHER, S. a MAYR, U. *Marssonina coronaria* – Fine tuning of direct regulation using acid clay. Short Contribution. In: Foerdergemeinschaft Oekologischer Obstbau e.V. (FOEKO). 19th International Conference on Organic Fruit-Growing: Proceedings to the Conference from February, 17 to February, 19, 2020 at Hohenheim/Germany. Weinsberg: Foerdergemeinschaft Oekologischer Obstbau e.V. (FOEKO), 2020, p. 133–137. ISBN 978-3-9804883-9-6.
- BRANDHORST, T. T. a KLEIN, B. S. Uncertainty surrounding the mechanism and safety of the post-harvest fungicide fludioxonil. Online. *Food and Chemical Toxicology*. 2019, vol. 123, p. 561–565. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.037>. [cit. 2024-03-07].
- DANG, J. L.; GLEASON, M. L.; NIU, C. K.; LIU, X.; GUO, Y. Z.; ZHANG, R. a SUN, G. Y. Effects of fungicides and spray application interval on controlling *Marssonina* blotch of apple in the loess plateau region of China. *Plant Disease*. 2017, vol. 101, no. 4, p. 568–575. Dostupné z: <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0464-RE>. [cit. 2024-03-07].
- DAVIS, J. J. Third supplementary list of parasitic fungi of Wisconsin. *Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts and Letters*. 1903, vol. 14, p. 83–106. ISSN 0084-0505.
- ENGLER, A. Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie Band. Vol. 37. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann, 1906. ISBN 978-0483081222.
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee). *Search Fungicides to find FRAC Recommendations*. Online. Crop Life International, 2024. Dostupné z: <https://www.frac.info/fungicide-resistance-management/by-fungicide-common-name>. [cit. 2024-03-08].
- CHAUHAN, A.; MODGIL, M.; RAJAM, M. V.; SHARMA, J. N. a SIDDAPPA, S. Isolation, cloning and in silico analysis of β -tubulin gene from apple leaf blotch fungus *Marssonina coronaria*. *Indian Phytopathology*. 2023, vol. 76, p. 371–382. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42360-023-00614-z>. [cit. 2024-03-04].
- KUMAR, A. a SHARMA, J. N. Evaluation of post-symptom activities of fungicides against *Marssonina coronaria* causing premature leaf fall in apple. *Indian Phytopathology*. 2016, vol. 69, no. 3, p. 278–285.
- LEE, D. H.; BACK, C. G.; WIN, N. K.; CHOI, K. H.; KIM, K. M.; KANG, I. K.; CHOI, C.; YOON, T. M.; UHM, J. Y. a JUNG, H. Y. Biological Characterization of *Marssonina coronaria* Associated with Apple Blotch Disease. *The Korean Society of Mycology*. 2011, vol. 39, no. 3, p. 200–205. Dostupné z: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2011.39.3.200>. [cit. 2024-03-04].
- TAMIETTI, G. a MATTA, A. First report of leaf blotch caused by *Marssonina coronaria* on apple in Italy. *Plant Disease*. 2003, vol. 87, no. 8, p. 1005. Dostupné z: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.8.1005B>. [cit. 2024-03-04].
- TOPIČOVÁ B. *Diplocarpon mali* – nový původce skvrnitosti listů jableň na území ČR. Online, brožura. In: ÚKZÚZ © 2009–2021 Ministerstvo zemědělství. 2019-07-24. Dostupné z: https://eagri.cz/public/web/file/628812/3_Diplocarpon_mali.pdf. [cit. 2024-03-04].