Wpływ wybranych fungicydów na przeżywalność *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn w różnych rodzajach gleb

STANISŁAW BERCZYŃSKI¹,

ZOFIA MACHOWICZ-STEFANIAK², PIOTR SOBICZEWSKI¹

¹ Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice

² Katedra Fitopatologii, Akademia Rolnicza, ul. Leszczyńskiego 58, 20-068 Lublin
Berczyński S., Machowicz-Stefaniak Z., Sobiczewski P. (¹ Research Institute of Pomology
and Floriculture, Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice, Poland,

² University of Agriculture in Lublin, Department of Plant Pathology,
Leszczyńskiego 58, 20-068 Lublin, Poland).

The effect of selected fungicides on survival of *Agrobacterium tumefaciens*
in various kinds of soils.

(Otrzymano dn. 10 czerwca 2002)

Summary

The effect of 10 fungicides on survival of *A. tumefaciens* in various types of soils was studied. In fertile, nonsterile soil Dithane M-45 (mancozeb), Euparen 50 WP (tolyluanid), Kaptan 50 WP (captan) and Ridomil Gold 80 WP (metalaxyl) at concentration of 1000 ppm showed the highest antibacterial activity. Similar trends in activity of these fungicides occurred in fertile, sterile soil, however a little lower in case of Kaptan and Euparen. In most of investigated soils Befran 25 SL (iminoctadyne), Syllit 65 WP (dodine) and Thiram Granulfo 80 WG (thiram) increased bacteria number. In sandy acidic soil (pH 3.5) all tested fungicides totally eliminated bacteria. On the other hand in sandy neutral soil only Dithane, Euparen, Kaptan and Ridomil showed such activity. Ten fold decrease of fungicides concentration generally did not influence Kaptan and Ridomil effectiveness but it decreased the activity of Dithane and Euparen.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, survival, soil, fungicides.

WSTĘP

Guzowatość korzeni powodowana przez *Agrobacterium tumefaciens* występuje powszechnie na wielu gatunkach roślin, zwłaszcza dwuliściennych i to zarówno drzewiastych, jak i zielnych. W Polsce atakuje głównie drzewa owocowe i róże powodując straty o znaczeniu gospodarczym. W niektórych gospodarstwach, szczególnie w uprawach gruszy, mogą one sięgać nawet 80%. Szacuje się, że z powodu guzowatości dyskwalifikowanych jest corocznie co najmniej kilkaset tysięcy roślin w szkółkach.

Ze względu na genetyczne podłoże choroby powodowanej przez *A. tumefaciens* i brak możliwości wyleczenia roślin porażonych, ich ochrona jest oparta głównie na profilaktyce. Spośród wszystkich związków chemicznych testowanych pod kątem zapobiegania porażeniu drzew owocowych i krzewów róży przez *A. tumefaciens*, najczęściej badano związki miedziowe. Copac E (amoniakalny roztwór miedzi) w stężeniu 5%, a także tlenochlorek miedzi w stężeniu 2% obniżały porażenie podkładek M9 z 37% do 2% (G r i m m 1987). Badania te nie dostarczyły jednak informacji o ewentualnym fitotoksycznym działaniu związków miedzi, co zaobserwowali S o b i c z e w s k i i in. (1991) po zastosowaniu tlenochloru miedzi w stężeniu 2% na siewkach czereśni ptasiej, oraz U t k h e d e i S m i t h (1993) po zastosowaniu tego związku w stężeniu 0,5% na siewkach Antonówki. W doświadczeniu wazonowym na siewkach czereśni ptasiej, tlenochlorek miedzi (Miedzan 50 WP) nie wykazał żadnego działania ochronnego, zaś w doświadczeniach polowych, na podkładkach drzew pestkowych powodował w prawie wszystkich przypadkach obniżenie porażenia szyjki korzeniowej i korzenia głównego. W większości przypadków związek ten chronił również częściowo podkładki drzew ziarnkowych przed guzowatością (S o b i c z e w s k i i in., 1991). O r o s (1983) stwierdził, że spośród przetestowanych około 150 pestycydów zdecydowana większość nie wykazywała ani bezpośredniego, ani pośredniego wpływu na wzrost *A. tumefaciens* na agarze odżywczym. Autor ten twierdzi jednak, że w warunkach naturalnych takie preparaty jak: Basamid (dazomet), Dinoseb (4,6-dinitro-2-F-butyphenol), Dithane (mankozeb), Euparen (dichlofluanid), Ferbam (ferbam), Orthocid (kaptan), Panocrine (quazatine) i TMTD (tiuram) mogą wpływać hamująco na *Agrobacterium*. Niektóre fungicydy i herbicydy stosowane w produkcji sadowniczej i szkółkarskiej wykazały działanie bakteriobójcze w stosunku do wybranych szczepów *A. tumefaciens* i szczepu K84 *A. radiobacter* w warunkach *in vitro* (S o b i c z e w s k i, 1995). Jednak nie wszystkie z tych preparatów podobnie działały na bakterie w glebie (B e r c z y ŋ s k i i S o b i c z e w s k i, 1999).

Fumigacja gleby mieszaniną chloropikryny z bromkiem metylu przed sadzeniem drzew migdała i krzewów róży pozwoliła na zmniejszenie występowania guzowatości korzeni o 70% (R o s s i in., 1970). Podwojenie dawki preparatów fumigujących nie spowodowało jednak całkowitej eliminacji choroby. Pewien stopień zmniejszenia porażenia siewek czereśni ptasiej przez *A. tumefaciens* uzyskali także D e p i in. (1968) po fumigacji gleby bromkiem metylu, chloropikryną i trzema preparatami eksperymentalnymi. Natomiast traktowanie zakażonej gleby siarczanem

streptomycyny lub dichlonem spowodowało nawet wzrost liczby porażonych siewek czereśni ptasiej uzyskanych z wysianych do tej gleby nasion. Piotrowski i Suski (1993) nie stwierdzili, aby odkażanie gleby dazometem lub bromkiem metylu miało wpływ na porażenie podkładek M26, M9 i F12/1. Istotnie zmniejszało natomiast i tak niewielkie porażenie podkładek P22. Niejednoznaczne wyniki dotyczące fumigacji gleby i porażenia korzeni przez *A. tumefaciens* są spowodowane różną wilgotnością gleby, która ma zasadnicze znaczenie przy fumigacji. Dickey (1962) udowodnił, że populacja *A. tumefaciens* w glebie na głębokości 7,5, 22,5 i 37,5 cm po fumigacji mieszaniną bromku metylu i chloropikryny, zmniejszyła się o ponad 99%. Jednak nawet niewielkie inokulum w glebie może się w pewnych warunkach odbudować, co z kolei ma określone znacznie epidemiologiczne i praktyczne (Ross i in., 1970).

Celem przedstawionej pracy było określenie wpływu wybranych fungicydów na przeżywalność bakterii *Agrobacterium tumefaciens* w dwu rodzajach gleb - żyznej i piaszczystej o różnych poziomach kwasowości. Badano także antybakteryjną aktywność fungicydów w glebie żyznej po jej uprzednim wyjałowieniu.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły próbki gleb, pobrane ze stanowisk użytkowanych pod uprawy roślin ogrodnich i rolniczych, do których wprowadzano bakterie szczepu AT 2.1 *A. tumefaciens*, a następnie dodawano do nich każdy z 10 badanych fungicydów. Liczbę bakterii w traktowanych fungicydami próbkach gleb określano po 3, 7 i 14 dniach inkubacji.

Badania przeprowadzone w laboratorium obejmowały następujące kombinacje: A/ przeżywalność *A. tumefaciens* w glebie żyznej o pH 6,75, niejałowej, z dodatkiem fungicydów (1000 ppm s.a.), B/ przeżywalność *A. tumefaciens* w glebie żyznej o pH 6,75, jałowej, z dodatkiem fungicydów (1000 ppm s.a.), C/ przeżywalność *A. tumefaciens* w glebie piaszczystej o pH 6,4, niejałowej, z dodatkiem fungicydów (1000 ppm s.a.), D/ przeżywalność *A. tumefaciens* w glebie piaszczystej o pH 3,75, niejałowej, z dodatkiem fungicydów (1000 ppm s.a.), E/ przeżywalność *A. tumefaciens* w glebie żyznej o pH 6,25, niejałowej z dodatkiem fungicydów (100 ppm s.a.).

1. Charakterystyka szczepu AT 2.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Szczep AT 2.1 *A. tumefaciens*, użyty do zakażenia gleby, jest spontanicznym mutantem opornym na streptomycynę (500 ppm) i rifampicynę (100 ppm), wyselekcjonowanym z reprezentatywnych kolonii szczepu AT-4, który został wyizolowany z guzów na korzeniach czereśni ptasiej. Jest on obecnie zdeponowany w kolekcji kultur bakterii fitopatogenicznych Laboratorium Bakteriologii Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach. Trwałość mutacji szczepu AT 2.1 sprawdzano przez określenie zdolności wzrostu bakterii na pożywce King B z antybiotykami /20g pepton bakteriologiczny (Bacto Peptone, Difco), 1,5g K_2HPO_4 , 1,5g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 10ml glicerol, 15g agar (Bacto Agar Difco), 1000ml woda destylowana, 500 ppm streptomycyna, 100 ppm rifampicyna/, po pięciokrotnym

pasażowaniu w płynnej pożywce King B nie zawierającej antybiotyków. Morfologia kolonii bakterii szczepu AT 2.1 i AT-4 na pożywce King B nie zawierającej rifamicyny i streptomycyny nie różniła się.

Patogeniczność tego szczepu sprawdzano przed zakażaniem próbek gleby na siewkach słonecznika i pomidora (S o b i c z e w s k i, 1996).

2. Charakterystyka gleb

Glebę do badań pobrano z warstwy ornej, z dwóch różnych stanowisk użytkowanych pod uprawy roślin rolniczych i ogrodnich. Z każdego stanowiska pobrano po 3 jednokilogramowe próby, które po oczyszczeniu z kamieni i grubszych zanieczyszczeń przy użyciu sita, przekazano do Laboratorium Zakładu Chemii Rolnej Pola Doświadczalnego SGGW w Skierniewicach w celu przeprowadzenia analiz na zawartość dostępnych dla roślin składników pokarmowych.

Glebę pobraną ze stanowiska użytkowanego pod uprawy roślin ogrodnich uznano za żyzną. Charakteryzowała się ona średnią zawartością próchnicy, miała odczyn zbliżony do obojętnego (pH 6,75), była bardzo zasobna w fosfor, średnio zasobna w magnez i mangan, zasobna w potas, miedź i cynk. Zawartość poszczególnych składników pokarmowych w glebie wynosiła: 16,1 mg P/100g gleby, 22,2 mg K/100g gleby, 5,84 mg Mg/100g gleby, 10,6 mg Cu/kg gleby, 88,9 mg Mn/kg gleby, 670 mg Fe/kg gleby, 61,1 mg Zn/kg gleby, 1,39 mg N/g gleby, zawartość węgla 1,6%, stosunek C:N - 11,6; pH 6,75.

Gleby pobrane ze stanowisk użytkowanych pod rośliny rolnicze określono jako piaszczyste. Charakteryzowały się średnią zawartością próchnicy (dla tego rodzaju gleb) i były zasobne w fosfor przyswajalny. Gleba o pH 3,5 była średnio zasobna w potas i bardzo mało zasobna w magnez. Zawartość potasu w glebie o pH 6,4 określono jako niską, a magnezu - średnią

3. Przygotowanie wodnej zawiesiny bakterii

Bakterie szczepu AT 2.1 hodowano na pożywce King B. Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 26°C wyrosłą murawę bakterii zmywano z powierzchni pożywki sterylną wodą destylowaną. Transmitancję wodnej zawiesiny bakterii ustalono na spektrokolorymetrze SEMCO S91E przy długości fali 630 nm. na 70%, co odpowiadało około 10^9 komórek bakterii w jednym mililitrze zawiesiny. Ponadto, dokładną liczbę bakterii w zawiesinie oznaczano metodą seryjnych rozcieńczeń i posiewów płytkowych na pożywkę King B.

4. Wprowadzanie bakterii do gleby

Świeżo pobrane próby gleby, o średnim nawilgoceniu podzielono na 2 części. Do pierwszej z nich dodano wodną zawiesinę szczepu AT 2.1, stosując 1 ml zawiesiny (o koncentracji ok. 10^9 /ml) na 100g gleby. Drugą próbę poddano wyjaławianiu sterylizując ją przez trzy kolejne dni w temperaturze 121°C i pod ciśnieniem 1 atmosfery, przez 20 minut. Po 7 dniach przetrzymywania w temperaturze pokojowej, dodawano do gleby bakterie w taki sam sposób jak do próbki niejałowej. Bakterie w glebie rozprowadzano i mieszano przy użyciu elektrycznego miksera. Następnie odważano po 100 g próbek gleby i umieszczano w sterylnych kolbkach Erlenmayera o pojemności 250 ml.

5. Badane fungicydy

Do badań wybrano 10 fungicydów, powszechnie stosowanych w ochronie roślin, prawie wszystkie z nich są stosowane w uprawach sadowniczych i szkółkarskich: Aliette 80 WP (80% fosetyl glinu), Befran 25 SL (25% iminoktadyna), Dithane M-45 80 WP (80% mankozeb), Euparen 50 WP (50% dichlofluamid), Kaptan zaw. 50 WP (50% kaptan), Miedzian 50 WP (50% tlenochlorek miedzi), Ridomil Gold MZ 68 WP (4% metalaksyl i 64% mankozeb), Saprool 190 EC (19% triforyna), Syllit 65 WP (65% dodyna), Thiram Granuflo 80 WG (80% tiram).

6. Traktowanie próbek gleby fungicydami

Po upływie jednej godziny od wprowadzenia bakterii do gleby dodawano odpowiedni fungicyd w dawce odpowiadającej końcowej koncentracji jego substancji aktywnej w glebie 1000 lub 100 ppm. Odpowiednie ilości poszczególnych fungicydów rozprawdzano w 5 ml sterylnej wody destylowanej, wlewano do kolbek Erlenmayera z próbką gleby i rozprawdzano sterylną bagietką szklaną. W kombinacji kontrolnej do kolbki z próbką gleby wlewano 5 ml sterylnej wody destylowanej. Kolbki przykrywano folią aluminiową i umieszczono w ciemnym pomieszczeniu laboratoryjnym w temperaturze około 20°C.

Odczyn (pH) wodnych zawiesin lub roztworów badanych fungicydów przed ich wprowadzeniem do gleby wnosili: Aliette 80 WP (2,3); Befran 25 SL (5,6); Dithane M-45 (7,4); Euparen 50 WP (10,2); Kaptan zaw. 50 WP (8,5); Miedzian 50 WP (7,5); Ridomil Gold MZ 68 WP (6,9); Saprool 190 EC (5,0); Syllit 65 WP (6,5); Thiram Granuflo 80 WG (7,8); woda (kontrola; 5,8).

7. Określanie przeżywalności bakterii w glebie z dodatkiem fungicydów

Po 3, 7 i 14 dniach inkubacji, z każdej kombinacji pobierano aseptycznie 3 próbki po 5 g gleby. Każdą z nich przenoszono do kolbki Erlenmayera o pojemności 100 ml z 45 ml sterylnej wody. Po ręcznym wymieszaniu gleby z wodą przez wstrząsanie przez około 1 minutę, wykonano dziesięciokrotne rozcieńczenia i posiewy na pożywkę King B z dodatkiem 100 ppm rifampicyny i 500 ppm streptomycyny. Po 3 dobach inkubacji w temperaturze 26°C liczono wyrosłe na pożywce kolonie *A. tumefaciens*.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji na danych transformowanych ($y = \log(x+1)$), a istotność różnic między średnimi określono za pomocą testu t-Duncana.

WYNIKI

1. Przeżywalność *A. tumefaciens* w glebie żywej, niejałowej, o pH 6,75, z dodatkiem fungicydów (1000 ppm s.a.)

W okresie prowadzenia badań stwierdzono zmiany liczebności populacji *A. tumefaciens* w glebie zarówno nie traktowanej, jak i traktowanej fungicydami (tab. 1). Trzy dni po zakażeniu gleby, fungicydy Befran 25 SL i Miedzian 50 WP nie spowodowały istotnego obniżenia populacji bakterii w porównaniu z kontrolą.

Natomiast w kombinacji z Thiram Granuflo 80 WG stwierdzono nawet wzrost populacji. Spośród badanych fungicydów największe antybakteryjne działanie wykazały: Kaptan zawieszinowy 50 WP, Euparen 50 WP i Dithane M-45. W siedem dni po rozpoczęciu doświadczenia stwierdzono wzrost populacji bakterii w próbkach gleby traktowanych fungicydami Thiram Granuflo, a także Befran i Saprol. W tym samym czasie Kaptan, Dithane i Ridomil Gold MZ 68 WP całkowicie wyeliminowały *A. tumefaciens* z gleby. Ta antybakteryjna zdolność wymienionych fungicydów utrzymała się przez co najmniej 14 dni trwania doświadczenia. Podobne, choć nieco gorsze działanie wykazał Euparen, natomiast w glebie traktowanej Syllitem zaobserwowano gwałtowny wzrost liczebności bakterii w okresie między 7 a 14 dniem trwania doświadczenia.

Tabela 1

Liczba bakterii *Agrobacterium tumefaciens* w 1 gramie gleby żyznej (niejałowej, pH 6.75), traktowanej wybranymi fungicydami (1000 ppm substancji aktywnej)

Table 1

Number of *Agrobacterium tumefaciens* cells in 1 gram of fertile soil (nonsterile, pH 6.75) treated with selected fungicides (1000 ppm a.i)

Kombinacja Treatment	Liczba dni po wprowadzeniu bakterii do gleby Days after introduction of bacteria into soil		
	3	7	14
Kontrola (woda) Check (water)	2 010 000 g	1 195 000 de	944 000 e
Alliette 80 WP	1 141 000 ef	794 000 d	479 000 de
Befran 25 SL	1 632 000 fg	12 315 000 g	659 000 e
Dithane M-45	281 000 c	0 a	0 a
Euparen 50 WP	170 000 b	520 b	10 b
Kaptan zaw. 50 WP	1 800 a	0 a	0 a
Miedzian 50 WP	1 319 000 efg	251 000 c	182 000 d
Ridomil Gold MZ 68 WP	534 000 d	0 a	0 a
Saprol 190 EC	941 000 e	1 739 000 ef	50 000 c
Syllit 65 WP	6 937 000 i	1 122 000 de	12 781 000 f
Thiram Granuflo 80 WG	3 137 000 h	2 060 000 f	698 000 e

Analizę statystyczną przeprowadzono oddzielnie dla każdego terminu badań; wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się przy poziomie 5% według testu Duncana

Statistical analysis was made separately for each term of investigation; mean values followed by the same letter(s) do not differ at 5% level of significance

2. Przeżywalność *A. tumefaciens* w glebie żyznej, jałowej, o pH 6,75 z dodatkiem fungicydów (1000 ppm s.a)

Trzy dni po zakażeniu gleby, we wszystkich kombinacjach stwierdzono istotnie mniejszą liczbę bakterii po traktowaniu fungicydami niż w kontroli (tab. 2). Najsilniejsze antybakteryjne działanie wykazały Ridomil i Dithane, które całkowicie eliminowały bakterie z gleby. Utrzymywało się ono przez cały okres doświadczenia.

Tabela 2

Liczba bakterii *A. tumefaciens* w 1 gramie gleby żyznej (jałowej; pH 6.75), traktowanej wybranymi fungicydami (1000 ppm substancji aktywnej)

Table 2

Number of *A. tumefaciens* cells in 1 gram of fertile soil (sterile, pH 6.75) treated with selected fungicides (1000 ppm a.i)

Kombinacja Treatment	Liczba dni po wprowadzeniu bakterii do gleby Days after introduction of bacteria into soil		
	3	7	14
Kontrola (woda) Check (water)	231 000 000 j	197 000 000 e	165 000 000 d
Alliette 80 WP	1 800 000 fg	48 000 000 d	127 000 000 d
Befran 25 SL	790 000 e	74 000 000 de	270 000 000 e
Dithane M-45	900 b	0 a	0 a
Euparen 50 WP	2 100 000 gh	65 000 b	16 000 000 b
Kaptan zaw. 50 WP	27 000 d	55 000 b	34 000 000 c
Miedzian 50 WP	15 000 c	70 000 b	-
Ridomil Gold MZ 68 WP	0 a	0 a	0 a
Saprol 190 EC	1 100 000 ef	910 000 c	11 000 000 b
Syllit 65 WP	3 300 000 h	139 000 000 de	324 000 000 e
Thiram Granuflo 80 WG	10 900 000 i	110 000 000 de	30 000 000 c

Objaśnienia: patrz tabela 1

Notes: see table 1

Siedem dni po rozpoczęciu doświadczenia Syllit, Thiram i Befran utrzymywały populację bakterii na poziomie nie różniącym się istotnie od kontroli, natomiast po 14 dniach stwierdzono nawet wzrost populacji bakterii w próbkach gleby traktowanych Syllitem i Thiramem.

3. Przeżywalność *A. tumefaciens* w glebie piaszczystej, niejałowej o pH 3,75 z dodatkiem fungicydów (1000 ppm s.a)

Stwierdzono drastyczne zmniejszenie się populacji bakterii w ciągu pierwszych trzech dni inkubacji (tab. 3). W 7 dniu inkubacji populacja bakterii uległa dalszemu zmniejszeniu, a po 14 dniach w ogóle nie wykryto bakterii w kontrolnych próbkach gleby. W tym samym rodzaju gleby traktowanej fungicydami praktycznie nie wykrywano bakterii w ciągu całego okresu badań. Wyjątek stanowiła gleba traktowana Syllitem, w której stwierdzono obecność niewielkiej liczby bakterii w 7 dniu inkubacji.

4. Przeżywalność *A. tumefaciens* w glebie piaszczystej, niejałowej, o pH ok. 6,4 z dodatkiem fungicydów (1000 ppm s.a.)

Fungicydy Befran, Syllit i Thiram stymulowały rozmnażanie się bakterii w glebie przez cały okres badań (tab. 4). Analiza gleby przeprowadzona w 3 dni od rozpoczęcia doświadczenia wykazała, że Kaptan całkowicie eliminował bakterie.

Tabela 3

Liczba bakterii *A. tumefaciens* w 1 gramie gleby piaszczystej (niejałowej, pH 3.5), traktowanej wybranymi fungicydami (1000 ppm substancji aktywnej)

Table 3

Number of *A. tumefaciens* cells in 1 gram of sandy soil (nonsterile, pH 3.5) treated with selected fungicides (1000 ppm a.i)

Kombinacja Treatment	Liczba dni po wprowadzeniu bakterii do gleby Days after introduction of bacteria into soil		
	3	7	14
Kontrola (woda) Check (water)	8 000	500	0
Alliette 80 WP	0	0	0
Befran 25 SL	0	0	0
Dithane M-45	0	0	0
Euparen 50 WP	0	0	0
Kaptan zaw. 50 WP	0	0	0
Miedzian 50 WP	0	0	0
Ridomil Gold MZ 68 WP	0	0	0
Saprol 190 EC	0	0	0
Syllit 65 WP	0	200	0
Thiram Granuflo 80 WG	0	0	0

Objaśnienia: patrz tabela 1

Notes: see table 1

Tabela 4

Liczba bakterii *A. tumefaciens* w 1 gramie gleby piaszczystej (niejałowej, pH 6.4), traktowanej wybranymi fungicydami (1000 ppm substancji aktywnej)

Table 4

Number of *A. tumefaciens* cells in 1 gram of sandy soil (nonsterile, pH 6.4) treated with selected fungicides (1000 ppm a.i)

Kombinacja Treatment	Liczba dni po wprowadzeniu bakterii do gleby Days after introduction of bacteria into soil		
	3	7	14
Kontrola (woda) Check (water)	3 450 000 ef	1 879 000 e	1 040 000 d
Alliette 80 WP	3 967 000 ef	2 337 000 e	1 187 000 d
Befran 25 SL	5 621 000 ef	6 814 000 f	4 283 000 f
Dithane M-45	1 600 c	3 900 b	0 a
Euparen 50 WP	50 b	0 a	0 a
Kaptan zaw. 50 WP	0 a	0 a	0 a
Miedzian 50 WP	1 193 000 de	955 000 d	501 000 c
Ridomil Gold MZ 68 WP	2 200 c	4 100 b	0 a
Saprol 190 EC	416 000 d	675 000 c	176 000 b
Syllit 65 WP	11 191 000 f	12 315 000 g	10 515 000 g
Thiram Granuflo 80 WG	7 956 000 ef	5 339 000 f	1 661 000 e

Objaśnienia: patrz tabela 1

Notes: see table 1

Nieco mniej skuteczne okazały się Euparen, Dithane i Ridomil. W próbkach gleby traktowanych skutecznymi fungicydami nie wykryto bakterii w 14 dniu od założenia doświadczenia.

5. Przeżywalność *A. tumefaciens* w glebie żyznej, niejałowej o pH 6,25, z dodatkiem fungicydów (100 ppm s.a.)

Najwyższą aktywność antybakteryjną wykazały Kaptan i Ridomil (tab. 5). W przypadku tego drugiego bakterii nie wykrywano w glebie przez cały okres badań. Nieco mniej skuteczny okazał się Euparen, natomiast Dithane i Miedzian 50 praktycznie nie wykazały antybakteryjnej aktywności, bowiem po traktowaniu gleby tymi fungicydami liczebność populacji bakterii w prawie wszystkich przypadkach nie różniła się istotnie od kontroli.

Tabela 5

Liczba bakterii *A. tumefaciens* w 1 gramie gleby żyznej (niejałowej, pH 6.75) traktowanej wybranymi fungicydami (100 ppm substancji aktywnej)

Table 5

Number of *A. tumefaciens* cells in 1 gram of fertile soil (nonsterile, pH 6.75) treated with selected fungicides (100 ppm a.i)

Kombinacja Treatment	Liczba dni po wprowadzeniu bakterii do gleby Days after introduction of bacteria into soil		
	3	7	14
Kontrola (woda) Check (water)	20 967 000 c	8 926 000 d	6 077 000 c
Dithane M-45	1 081 000 b	210 000 c	268 000 c
Euparen 50 WP	1 562 000 b	5 500 b	7 800 b
Kaptan zaw. 50 WP	6 000 a	30 a	10 a
Miedzian 50 WP	12 063 000 c	5 937 000 d	1 966 000 c
Ridomil Gold MZ 68 WP	0 a	0 a	0 a

Objaśnienia: patrz tabela 1

Notes: see table 1

DYSKUSJA

Wpływ pestycydów na populacje różnych mikroorganizmów zasiedlających glebę był przedmiotem zainteresowania wielu badaczy. Stosunkowo mało spotyka się jednak informacji na ten temat w odniesieniu do *Agrobacterium tumefaciens*. Uzyskane w ramach przedstawionej pracy wyniki wskazują, że niektóre fungicydy stosowane w ochronie upraw sadowniczych i szkółkarskich przed chorobami wykazały antybakteryjne działanie wobec sprawcy guzowatości korzeni w środowisku glebowym. Przeprowadzone badania mają przede wszystkim wartość dla praktyki;

umożliwiły bowiem wskazanie związków chemicznych toksycznie oddziałujących na *A. tumefaciens*. Nabiera to z kolei szczególnego znaczenia w sytuacjach niemożności zastosowania biologicznej metody ochrony roślin przed guzowatością korzeni. Aktywne fungicydy mogłyby stanowić cenny substytut jedynych - jak dotychczas - preparatów miedziowych polecanych - oprócz Polagrocyny - przeciwko tej chorobie. Coraz częściej wskazuje się na konieczność wycofania miedzi z ochrony roślin, która jako metal ciężki kumuluje się w glebie i może stanowić zagrożenie z ekologicznego punktu widzenia. Jednocześnie pojawiają się głosy o celowości podjęcia badań nad innymi, mniej toksycznymi, związkami chemicznymi, które w sytuacjach koniecznych mogłyby być użyte do zwalczania guzowatości korzeni i innych bakterioz roślinnych.

Badania przeprowadzone w glebie żyznej niejałowej wykazały, że największą aktywność w ograniczaniu *A. tumefaciens* wykazały Kaptan, Dithane, Euparen i Ridomil. Podobne tendencje w działaniu wymienionych fungicydów (nieco słabsze w przypadku Kaptanu i Euparenu) wystąpiły w glebie żyznej wyjałowionej. Stwierdzone różnice w działaniu fungicydów w obu rodzajach gleb mogły być spowodowane obecnością w pierwszej z nich mikroorganizmów antagonistycznych wobec sprawcy guzowatości korzeni, które mogły spotęgować uzyskany antybakteryjny efekt w tej glebie. Ponadto zaobserwowano, że w większości badanych prób gleby, zarówno wyjałowionej jak niejałowej, do których wprowadzono takie fungicydy jak Thiram, Syllit czy Befran wystąpił wzrost populacji *A. tumefaciens*. Mógł on być spowodowany zmianami w składzie mikrobiologicznym gleby poprzez eliminację mikroorganizmów konkurencyjnych, zwiększenie źródła pokarmu wskutek zamarcia i rozkładu pewnych mikroorganizmów pod działaniem fungicydów, a także ich dezaktywacją przez biotyczne i abiotyczne składniki środowiska glebowego (Kreutzer, 1963; Curl i Truelove, 1986; Paul i Clark, 2000; Niewiadomska i Sawicka, 2001).

Znaczenie glebowego kompleksu sorpcyjnego zostało szczególnie zmanifestowane w glebie piaszczystej, kwaśnej, w której praktycznie wszystkie z badanych fungicydów całkowicie eliminowały bakterie poniżej poziomu ich wykrywania.

Gleba jest tworem bardzo złożonym, a jej skład mechaniczny i stopień uwodnienia są ważnymi czynnikami determinującymi zdolności sorpcyjne (Paul i Clark, 2000). Poza tym zwiększona zawartość materii organicznej w glebie podnosi pojemność sorpcyjną gleby. Wprowadzony związek chemiczny podlega interakcjom zarówno z glebową biofazą, jak i fizykochemicznymi składnikami gleby. Czynniki te decydują więc czy ilość danego związku chemicznego pozostanie toksyczna w danym miejscu w stosunku do danego mikroorganizmu (Kreutzer, 1960).

Warunki panujące w środowisku glebowym mogą więc znacznie modyfikować antybakteryjne działanie pestycydów wprowadzanych do niego celowo lub też przypadkowo, na przykład wskutek spływania z traktowanych nimi nadziemnych części roślin. Dlatego informacje o antybakteryjnym działaniu jakiegoś środka chemicznego uzyskane na podstawie badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* mają głównie znaczenie poznawcze. Wskazują one na bezpośrednie działanie

bakteriobójcze czy bakteriostatyczne danego środka, ale nie można ich bezpośrednio przenosić do warunków naturalnego bytowania bakterii (Fisher, 1976; Fisher i Hayes, 1982; Greaves i in., 1980; Sobiczewski, 1995). Nierzadko zdarza się, że jakiś preparat wykazuje dużą aktywność w ograniczaniu wzrostu bakterii na sztucznej pożywce, a w glebie jest nieaktywny lub nawet stymuluje wzrost bakterii. Przykładem mogą tu być wspomniane już fungicydy Thiram Granuflo 80 WG i Syllit 65 WP, które w badaniach Sobiczewskiego (1995) całkowicie hamowały wzrost *A. tumefaciens* i *A. radiobacter* w warunkach *in vitro*, a w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy potęgowały rozmnażanie się bakterii w glebie. Z kolei Euparen, Dithane i Kaptan okazały się aktywne zarówno na sztucznej pożywce jak i w glebie. Na uwagę zasługuje także preparat Aliette, który drastycznie obniżał odczyn sporządzonej z jego dodatkiem wodnej zawiesiny. W warunkach *in vitro* preparat ten ograniczał rozmnażanie się „agrobakterii” (Sobiczewski, 1995), w glebie zaś nie wykazał antybakteryjnego działania, a niekiedy nawet stymulował wzrost bakterii.

Warto także podkreślić, że różne izolaty tego samego gatunku bakterii mogą podobnie reagować na ten sam związek chemiczny, na inny zaś różnie. Wykazał to w przypadku wybranych fungicydów i herbicydów wobec kilku izolatów *A. tumefaciens* i szczepu K84 *A. radiobacter* Sobiczewski (1995). O zróżnicowaniu wrażliwości różnych izolatów *A. tumefaciens* na pestycydy donosił także Orós (1983), który m.in. udowodnił, że na przykład tlenochlorek miedzi, mankozeb, czy zineb były bardziej toksyczne dla bakterii szczepu K84 niż dla bakterii tumorogennych. Stwierdzenie zróżnicowania wrażliwości omawianych bakterii na działanie pestycydów ma duże znaczenie z punktu widzenia praktyki. Oporność niektórych bakterii na jakiś środek chemiczny może decydować o odbudowaniu się inokulum w środowisku glebowym do poziomu zagrażającego zdrowotności roślin i w stopniu przekraczającym próg ekonomicznej szkodliwości. Orós (1983) uważa, że Dithane i Euparen, a także preparaty dodynowe, mogą skutecznie oddziaływać na *Agrobacterium* w warunkach naturalnego bytowania tych bakterii. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki badań wskazują, że przypuszczenie to okazało się prawdziwe w odniesieniu do dwóch pierwszych z wymienionych preparatów, ale nie do związków dodynowych. O toksycznym działaniu wymienionych preparatów, a także Kaptanu w stosunku do bakterii z rodzaju *Rhizobium* informują Heinonen-Tanski i in. (1982). Także Lopez i in. (1981) uznali Kaptan za preparat posiadający zdolność hamowania wzrostu bakterii tumorogennych oraz zapobiegający porażeniu podkładek róży przez *A. tumefaciens*. Natomiast Sobiczewski (1995) oceniając skuteczność kilku fungicydów (w tym Kaptanu) w zapobieganiu porażenia roślin testowych przez *A. tumefaciens* stwierdził, że dla słonecznika wyróżniły się Miedzian i Euparen, zaś dla pomidora tylko Miedzian.

Dyskusyjna pozostaje sprawa ilości wprowadzanego do gleby środka chemicznego w aspekcie jego działania na sprawcę guzowatości korzeni. Przeprowadzone badania z fungicydami najlepiej działającymi w dawce 1000 ppm wykazały, że jej dziesięciokrotne zmniejszenie nie wpłynęło w zasadniczy sposób na obniżenie antybakteryjnego działania Ridomilu i Kaptanu, słabiej natomiast działały Dithane i Euparen, zaś Miedzian praktycznie nie wpływał hamująco na rozmnażanie

się bakterii w glebie. Generalnie uważa się bakterie patogeniczne dla roślin są trudniejsze do eradykacji niż grzyby. Munnecke i Ferguson (1960) wykazali, że aby zabić *Agrobacterium tumefaciens*, *Corynebacterium michiganense* i *Xanthomonas pelargonii* w porażonych tkankach roślin - gospodarzy umieszczonych w glebie musieli użyć wyższych dawek chloropikryny, bromku metylu czy ditiokarbamatu sodu niż do zwalczania grzybów. Natomiast Winfree i in. (1958) udowodnili, że niemożliwa była eliminacja z gleby bakterii z rodzaju *Erwinia* i *Pseudomonas* powodujących miękkie zgnilizny roślin z gleby przy zastosowaniu standardowej dawki chloropikryny. Problem ten wymaga bardziej szczegółowych badań. Paul i Clark (2000) uważają, że spośród pestycydów jakie są wprowadzane do gleby zarówno w sposób celowy, jak i przypadkowy, największe zakłócenia w składzie populacji organizmów żywych powodują fungicydy, przy czym bakterie należą do najbardziej wrażliwych tak z punktu widzenia toksycznego, jak i stymulującego oddziaływania danego preparatu.

LITERATURA

- Berczyński S., Sobiczewski P., 1999. Wpływ wybranych środków ochrony roślin na *Agrobacterium tumefaciens* - sprawcę guzowatości korzeni. Mat. Ogólnopol. Nauk. Konf. Ochr. Rośl. Sad. Skierniewice 16-17.02.1999: 215-218.
- Curl E.A., Truelove B., 1986. The rhizosphere. Springer-Verlag, Berlin.
- Deep I.W., McNeilan R.A., MacSwan I.C. 1968. Soil fumigants tested for control of crown gall. Plant Disease Rep. 52, 2: 102-105.
- Dickey R.S., 1962. Efficacy of five fumigants for the control of *Agrobacterium tumefaciens* at various depths in the soil. Plant Disease Rep. 46: 73-76.
- Fisher D.J., 1976. Effects of some fungicides on *Rhizobium trifolii* and its symbiotic relationship with white clover. Pesticide Science 7: 10-18.
- Fisher D.J., Hayes A.L., 1982. Effects of some systemic imidazole and triazole fungicides on white clover and symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium trifolii*. Ann. Appl. Biol. 101: 19-24.
- Greaves M.P., Poole N.J., Domsch K.H., Jagnow G., Verstraette W., 1980. Recommended tests for assessing the side-effects of pesticides on the soil microflora. Technical Report Agricultural Res. Council Weed Research Organization (59), 15 s.
- Grimm R., 1987. Control of crown gall in Swiss apple nurseries. Bull. EPPO 17: 269-272.
- Heinonen-Tanski H., Oros G., Kecskes M., 1982. The effect of soil pesticides on the growth of red clover rhizobia. Acta Agric. Scandinavica 32: 283-288.
- Kreutzer W.A., 1960. Soil treatment. W: „Plant Pathology III” (J.G. Horsfall and A.E. Dimond Eds. Academic, New York): 431-476.
- Kreutzer W.A., 1963. Selective toxicity of chemicals to soil microorganisms. Ann. Rev. Phytopath. 1: 101-126.
- Lopez M.M., Miro M., Orive R., Temprano F., Poli M., 1981. Biological control of crown gall on rose in Spain. Proc. Fifth Int. Conf. Pl. Path. Bacteria. Cali, Columbia: 538-548.
- Munnecke D.E., Ferguson J., 1960. Effect of soil fungicides upon soil-borne plant pathogenic bacteria and soil nitrogen. Plant Disease Rep. 44: 552-555.

- Niewiadomska A., Sawicka A., 2001. Wpływ karbendazymu i imazetapiru na wiązanie azotu, plon i skład chemiczny seradeli (*Ornithopus sativus*). W: „Drobnoustroje środowiska glebowego” Wyd. A. Marszałek, Toruń: 191-195.
- Oros, G y., 1983. The influence of pesticides on the antagonistic effect of *Agrobacterium radiobacter* to *A. tumefaciens*. Proc.Int. Conf. Plant Prot., Budapest: 28-36.
- Paul E.P., Clark F.E., 2000. Mikrobiologia i biochemia gleby. Wyd. UMCS Lublin, 400 ss.
- Piotrowski S., Suski Z.W., 1993. Wpływ chemicznego odkażania gleby w szkółce na jakość drzewek i występowanie guzowatości korzeni (*Agrobacterium tumefaciens*). Prace ISK, seria C, nr 1-2/117-118: 67-68.
- Ross N., Schroth M.N., Sanborn R., Orleilly, Thompson J.P., 1970. Reducing loss from crown gall disease. California Agr. Exp. Station Bull. 845: 1-10.
- Sobiczewski P., Karczewski J., Berczyński S., 1991. Biological control of crown gall *Agrobacterium tumefaciens* in Poland. Fruit Sc. Rep. 18/3: 125-132.
- Sobiczewski P., 1995. Badania nad guzowatością korzeni drzew owocowych (*Agrobacterium tumefaciens*). Praca habilitacyjna ISK, Skierniewice, 96 ss.
- Sobiczewski P., 1996. Susceptibility of fruit tree rootstocks to crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*). J. Fruit Orn. Plant Res. Vol. IV: 163-178.
- Sobiczewski P., Berczyński S., Szczepaniak J., Filip A., Włodarczyk S., Majdziak K., 2001. Sposób wytwarzania biopreparatu na podłożu stałym do ochrony podkładek drzew owocowych i róży przed guzowatością korzeni. PAT-312168.
- Utkhede R.S., Smith E.M., 1993. Evaluation of biological and chemical treatments for control of crown gall on young apple trees in the Kootenay Valley of British Columbia. J. Phytopath. 137: 265-271.
- Winfree J.P., Cox R.S., Harrison D.S., 1958. Influence of bacterial soft rot, depth of water table, source of nitrogen and soil fumigation on production of lettuce in the Everglades. Phytopath. 48: 311-316.

Wpływ wybranych fungicydów na przeżywalność *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn w różnych rodzajach gleb

Streszczenie

Badano wpływ 10 fungicydów na przeżywalność *A. tumefaciens* w różnych rodzajach gleb. W glebie żyznej niejałowej największe działanie antybakteryjne w stężeniu 1000 ppm substancji aktywnej wykazały: Dithane M-45, Euparen 50 WP, Kaptan zaw. 50 WP i Ridomil Gold 80 WP. Podobne tendencje w działaniu tych fungicydów wystąpiły w glebie żyznej jałowej, przy czym nieco słabsze w przypadku Kaptanu i Euparenu. W większości badanych gleb, fungicydy: Thiram Granuflo 80 WG, Syllit 65 WP i Befran 25 SL powodowały wzrost liczebności populacji bakterii. W glebie piaszczystej kwaśnej (pH 3,5) wszystkie badane fungicydy całkowicie eliminowały bakterie. Natomiast w glebie piaszczystej o odczynie zbliżonym do obojętnego aktywność taką wykazały tylko Dithane, Euparen, Kaptan i Ridomil. Dziesięciokrotne zmniejszenie dawki wybranych fungicydów nie wpłynęło w zasadniczy sposób na obniżenie działania Kaptanu i Ridomilu, słabiej natomiast działały Dithane i Euparen.