Efekt wyniszczającego działania fungicydów strobilurynowych i difenkonazolu na grzybnię i zarodnikowanie *Venturia inaequalis*

**AGATA BRONIAREK-NIEMIEC¹, ANNA BIELENIN¹,
BARBARA DYKI²**

¹ Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice

² Instytut Warzywnictwa w Skierniewicach

Broniarek-Niemiec A., Bielenin A., Dyki B. (Research Institute of Pomology and Floriculture, Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice, Poland). Effect of eradicated activity of strobilurin fungicides and difenconazole on mycelium and sporulation of *Venturia inaequalis*.

(Otrzymano dn. 8 czerwiec 2002)

Summary

The eradicated effect of two strobilurin fungicides (kresoxim-methyl and trifloxystrobin) and difenoconazole on activity of apple scab spots was studied in greenhouse and field conditions. The reaction of mycelium and sporulation of *Venturia inaequalis* after fungicides applications were observed in light and scanning electron microscope. Mixture of strobilurin fungicide and difenoconazole applied twice, in 5 days interval, gave the best eradicated effect. The inhibition of sporulation was long lasting and it was observed even 3 and 5 weeks after treatments. The conidiophores, conidia and mycelium were damaged. Also difenoconazole showed good eradicated activity, in field condition up to 5 weeks after application. Trifloxystrobin significantly reduced the number of active scab lesions and the effect was visible even 3 weeks after treatment. Kresoxim-methyl in both tested doses (0,2 and 0,3 kg/ha) was slightly less effective.

Key words: eradicated activity, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, difenconazole, *Venturia inaequalis*.

WSTĘP

Zwalczanie parcha jabłoni, pomimo dobrze poznanej epidemiologii i szerokiego asortymentu zarejestrowanych fungicydów, ciągle sprawia wiele problemów. Szczególnie w lata epidemii, mimo prowadzonej ochrony chemicznej, dochodzi niekiedy do infekcji liści czy zawiązków owocowych. Istnieje wówczas konieczność zastosowania preparatu charakteryzującego się właściwościami wyniszczającymi w stosunku do grzyba *Venturia inaequalis*. Dobre działanie hamujące rozwój grzyba, także po wystąpieniu objawów chorobowych, mają szeroko stosowane fungicydy z grupy Inhibitorów Biosyntezy Ergosterolu (IBE) (Kelly i Jones, 1981) oraz fungicydy należące do najnowszej grupy związków, strobiluryny (Gold i Lelios, 1995). Preparaty z obydwu tych grup są obecnie powszechnie stosowane do zapobiegawczego i interwencyjnego zwalczania parcha jabłoni.

Celem pracy była ocena działania wyniszczającego fungicydów strobilurynowych i difenkonazolu stosowanych pojedynczo i w mieszaninie oraz mikroskopowa ocena wpływu stosowanych związków na rozwój grzyba *Venturia inaequalis*.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono w roku 2001 w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach w warunkach szklarniowych i polowych. Badania rozwoju grzyba *Venturia inaequalis* wykonano przy użyciu świetlnego i elektronowego mikroskopu w Instytucie Warzywnictwa w Skierniewicach. W doświadczeniach zastosowano dwa fungicydy strobilurynowe, krezoksym metylowy (Discus 500 WG) i trifloksystrobina (Zato 50 WG) oraz fungicyd systemiczny z grupy IBE, difenkonazol (Score 250 EC).

Doświadczenie polowe. Siedmioletnie jabłonie odm. McIntosh z wyraźnymi objawami parcha opryskiwano testowanymi fungicydami 2 razy w odstępie 5 dni. Ocenę aktywności plam parcha wykonano po 3 i 5 tygodniach od zabiegu na próbie 40 liści, po 10 w powtórzeniu. W każdym powtórzeniu oceniano 10 plam po 100 zarodników. W miejscu plamy parcha z liści wycinano krążki, które następnie umieszczano w kroplach wody i przetrzymywano w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Po tym czasie oceniano mikroskopowo liczbę kiełkujących zarodników licząc po 100 zarodników z każdej plamy. Za plamę aktywną uznawano taką, na której stwierdzono kiełkowanie powyżej 5 zarodników.

Wyniki analizowano statystycznie przy użyciu analizy wariancji transformacją Freemana-Tukeya, a istotność różnic oceniano testem Duncana przy poziomie istotności 5 %.

Doświadczenie szklarniowe. Badania przeprowadzono na okulantach odmiany Lobo, na których na liściach widoczne były świeże plamy parcha pochodzące z wcześniej wykonanej inokulacji. Kombinację stanowiło 5 drzew, na których zaznaczono silnie porażone liście. Opryskiwania testowanymi fungicydami wykonano dwukrotnie w odstępie 5 dni (8 VI i 13 VI 2001). Ocenę aktywności plam przeprowadzono tak samo jak w doświadczeniu polowym.

Ponadto obok oceny wizualnej przeprowadzono także badania rozwoju grzyba *Venturia inaequalis* przy użyciu świetlnego i skaningowego mikroskopu. W tym celu po 5 tygodniach od ostatniego zabiegu z drzew z każdej kombinacji pobrano do badań po 3 liście. Fragmenty liści z objawami parcha utrwalano w utrwalczu CrAF (kwas chromowy, kwas octowy, formalina), następnie odwadniano w etanolu. Połowę tak przygotowanego materiału przeznaczono do badań powierzchni liści w elektronowym mikroskopie skaningowym, a resztę do badań anatomicznych w mikroskopie świetlnym. Do badań powierzchni liści materiał suszono w punkcie krytycznym CO₂ i napyłano złotem, a następnie analizowano i fotografowano w mikroskopie firmy JEOL typ JSM-S1. Do badań anatomicznych fragmenty liści zatapiano w parafinie, krojono i skrawki przekrojów poprzecznych przez liście barwiono safraniną i ciemną zielenią, a następnie analizowano w mikroskopie świetlnym JENVAL.

WYNIKI

Badania przeprowadzone w warunkach polowych wykazały, że wszystkie testowane preparaty posiadają dobre właściwości wyniszczające parcha jabłoni, zarówno na liściach jak i owocach. Po 3 tygodniach od opryskiwania najsilniejsze hamowanie zarodnikowania stwierdzono na liściach traktowanych mieszaniną strobiluryny i difenkonazolu. Bardzo dobrym działaniem antysporulacyjnym charakteryzowały się również preparaty Score 250 EC i Zato 50 WG. Skuteczność fungicydu Discus 500 WG była natomiast niższa.

Również po 5 tygodniach od opryskiwania najlepsze działanie antysporulacyjne stwierdzono po zastosowaniu mieszanin strobiluryny z difenkonazolem oraz difenkonazolu. Skuteczność pozostałych testowanych fungicydów, Zato 50 WG i Discus 500 WG, była istotnie niższa.

Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniu szklarniowym. Ocena przeprowadzona po 3 tygodniach od zabiegu potwierdziła bardzo dobrą skuteczność mieszanin oraz preparatu Zato 50 WG. Natomiast po 5 tygodniach od opryskiwania skuteczność preparatów Discus 500 WG i Zato 50 WG była niższa niż ich mieszanin z difenkonazolem.

Potwierdzeniem badań polowych są wyniki uzyskane podczas prac anatomicznych przy pomocy mikroskopu świetlnego i elektronowego. Na porażonych liściach pobranych z drzew nie opryskiwanych stwierdzono liczną obecność patogena na powierzchni górnej epidermy liścia (Fot. 1). W niektórych miejscach strzępki grzybni, gęsto pokrywały zewnętrzne ściany komórek epidermy gospodarza. Warstwa epidermy w miarę nasilającej się inwazji patogena, traciła strukturę komórkową ulegając sukcesywnie degradacji. Ponadto w komórkach epidermy i miększu palisadowego obserwowano brunatno czerwone inkluzje. Natomiast na liściach opryskanych preparatem Discus 500 WG obserwowano znaczną redukcję grzybni patogena na epidermie (Fot. 2). W miejscach tych znajdowano fragmenty splazmolizowanych komórek grzyba wykazujących tendencje do degradacji, mimo, że epiderma i miękisz palisadowy w wielu miejscach był zniszczony.

Na liściach pobranych z drzew opryskiwanych preparatem Zato 50 WG strzępki grzyba miały tendencję do zbijania się w bezstrukturalną masę i odrywania się od powierzchni liści. W wielu przypadkach obserwowano zjawisko lizy strzępek grzyba (Fot. 3). Nekrozy i ubytki tkanek obejmowały fragmenty epidermy, miękisz palisadowy i gąbczasty.

Na liściach opryskiwanych mieszaninami fungicydu Score 250 EC i Zato 50 WG lub Discus 500 WG, niezależnie od stopnia zniszczenia komórek, które obejmowały niekiedy wszystkie tkanki, obserwowano na powierzchni liści najsilniejsze ograniczenie ilości strzępek grzyba. Niewielkie ślady po obecności strzępek na powierzchni epidermy towarzyszyły wyraźnie mocno zgrubiałym ścianom komórkowym epidermy. W nielicznych miejscach występowały zbite, bezstrukturalne fragmenty grzybni nad epidermą wskazujące na obecność patogena przed działaniem preparatów (Fot. 4).

Badania powierzchni liści w elektronowym mikroskopie skaningowym w kombinacji nie opryskiwanej pozwoliły stwierdzić obecność strzępek grzybni, strzępek konidiotwórczych oraz licznych nieuszkodzonych zarodników konidialnych (Fot. 5). Na uwagę zasługuje także obserwowana reakcja epidermy gospodarza polegająca na zwiłaniu się zgrubiałej kutikuli. Może być to reakcja obronna rośliny (Fot. 6).

Na liściach pochodzącym z drzew opryskiwanych preparatem Discus 500 WG wszystkie strzępki i zarodniki były spłaszczone, co wskazuje na plazmolizę prowadzącą do wyniszczenia grzybni (Fot. 7). Natomiast strzępki konidiotwórcze miały zniszczoną część szczytową z widocznym owalnym otworem. Tylko nieliczne zarodniki konidialne, nie straciły turgoru i miały dobrze zachowany kształt (Fot. 8). Wyniszczenie grzyba na liściach opryskiwanych preparatem Zato 50 WG było znacznie silniejsze w porównaniu do liści traktowanych preparatem Discus 500 WG (Fot. 9). Również na liściach opryskiwanych mieszaninami fungicydów o różnym mechanizmie działania obserwowano silną degradację grzybni, która jakby wtapiała się w grubą warstwę kutikuli (Fot. 10). Zarodniki konidialne były zniekształcone, a strzępki konidiotwórcze zniszczone (Fot. 11).

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie testowane fungicydy charakteryzują się dobrymi właściwościami antysporulacyjnymi. Najefektywniej i najdłużej działały mieszaniny strobiluryny i difenokonazolu oraz sam difenokonazol (IBE). Badania mikroskopowe wpływu stosowanych fungicydów na rozwój grzybni i zarodnikowanie *Venturia inaequalis* potwierdziły wyniki uzyskane w doświadczeniach polowym i szklarniowym. Zaburzenia w rozwoju patogena przedstawione na zdjęciach (Fot. 1-11) odpowiadają ściśle wynikom doświadczenia szklarniowego (Tabela 2). Brak aktywnych plam parcha po zastosowaniu mieszanin koreluje z całkowitym wyniszczeniem grzybni, strzępek konidiotwórczych i zarodników obserwowanym podczas badań przy użyciu elektronowego mikroskopu

Tabela 1

Skuteczność działania wyniszczającego niektórych fungicydów w zwalczaniu parcha jabłoni
(Sad Doświadczalny, Dąbrowice – Odm. McIntosh)

Table 1

The eradicated activity of some fungicides in control of apple scab
(Experimental Orchard, Dąbrowice – McIntosh cv.)

Fungicyd i dawka na 1 ha Fungicide and dose per 1 ha	Liczba aktywnych plam parcha* Number of active scab lesions*			
	Ocena po 3 tyg. (2 lipca 2001) Evaluation after 3 weeks		Ocena po 5 tyg. (19 lipca 2001) Evaluation after 5 weeks	
	liście leaves	owoce fruits	liście leaves	owoce fruits
Kontrola / control	9,52 c	8,00 c	10,00 d	9,17 d
Score 250 EC 0.2 l	0,32 ab	0,00 a	0,32 ab	0,21 ab
Zato 50 WG 0.15 kg	0,00 a	0,00 a	1,04 b	0,83 bc
Discus 500 WG 0.3 kg	0,63 b	0,32 b	2,24 c	0,63 bc
Discus 500 WG 0.2 kg	0,83 b	0,48 b	2,96 c	1,73 c
Score 250 EC 0.2 l + Zato 50 WG 0.15 kg	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
Score 250 EC 0.2 l + Discus 500 WG 0.3 kg	0,00 a	0,00 a	0,00 a	0,00 a
Score 250 EC 0.2 l + Discus 500 WG 0.2 kg	0,00 a	0,00 a	0,32 ab	0,00 a

* Plama aktywna, gdy kiełkuje 5 i więcej zarodników/100 zarodników badanych

* Active lesion, 5 or more germinating spores for 100 tested

Tabela 2

Skuteczność działania wyniszczającego niektórych fungicydów w zwalczaniu parcha jabłoni
(Szklnia, odm. Lobo)

Table 2

The eradicated activity of some fungicides in control of apple scab
(Greenhouse, Lobo cv.)

Fungicyd i dawka na 1 ha Fungicide and dose per 1 ha	Liczba aktywnych plam parcha* Number of active scab lesions*	
	Ocena po 3 tyg. (3 lipca 2001) Evaluation after 3 weeks	Ocena po 5 tyg. (17 lipca 2001) Evaluation after 5 weeks
	liście leaves	liście leaves
Kontrola / control	9,9 c	7,0 c
Discus 500 WG 0.3 kg	1,2 b	2,2 b
Zato 50 WG 0.15 kg	0,0 a	1,0 b
Score 250 EC 0.2 l + Discus 500 WG 0.3 kg	0,0 a	0,0 a
Score 250 EC 0.2 l + Zato 50 WG 0.15 kg	0,0 a	0,0 a

* Plama aktywna, gdy kiełkuje 5 i więcej zarodników/100 zarodników badanych

* Active lesion, 5 or more germinating spores for 100 tested

skaningowego. Wyniki badań uzyskiwanych w wcześniejszych pracach również wskazywały na wysoką antysporulacyjną skuteczność krezoksym-metylu i difenokonazolu w zwalczaniu parcha jabłoni. Związki te ograniczały liczbę aktywnych plam parcha nawet od 98 do 100% (Broniarek-Niemiec i Bielenin, 1999). Dobre działanie wyniszczające innych fungicydów z grupy IBE odnotowali także w swoich badaniach O'Leary i in. (1987). Jednak z powodu pojawienia się w niektórych sadach form grzyba o mniejszej wrażliwości na te związki ich stosowanie zostało znacznie ograniczone, do 2-3 razy w sezonie. Fungicydy z tej grupy wykorzystywane są głównie w zabiegach interwencyjnych, ponieważ skutecznie hamują rozwój choroby nawet do 120 godzin po infekcji (Schwabe i in., 1984). Jednak ich skuteczność zależy ściśle od warunków, w jakich są stosowane (O'Leary i Jones, 1987).

Natomiast strobiluryny wykazują dobre działanie zapobiegawcze, interwencyjne oraz wyniszczające niezależnie od temperatury i mogą być stosowane nawet na mokre liście (Creemers, 1997). Preparaty te wg badań Gold i Leinhos (1995) silnie hamowały zarodnikowanie grzyba *Venturia inaequalis* nawet po 28 dniach od ostatniego zabiegu. Tak długie działanie tych związków nie zostało potwierdzone w prezentowanych badaniach, ale ich mieszanina z difekonazolem wykazała silne działanie antysporulacyjne nawet do 5 tygodni od zabiegu. Zastosowanie mieszaniny fungicydów o różnym mechanizmie działania, w przypadku wystąpienia objawów parcha jabłoni, wydaje się najbardziej uzasadnione, zarówno z powodu wysokiej skuteczności działania jak i zapobiegania zjawisku odporności na fungicydy.

LITERATURA

- Broniarek-Niemiec A., Bielenin A., 1999. Discus 500 WG - fungicyd z grupy strobiluryn w zwalczaniu parcha jabłoni. Progress in Plant Protection vol. 39 (2): 895-897.
- Creemers P., 1997. BAS 490 F, a new fungicide to control scab and mildew in apple and pear. Med. Fac. Landbouww. Univ. Geant 61/2a, 431-441.
- Gold R.E., Leinhos G.M., 1995. Fungicidal Effects of BAS 490 F on the Development and Fine Structure of Plant Pathogenic Fungi. Pestic. Sci., 43: 250-253.
- Kelly R.D., Jones A.L., 1981. Evaluation of two triazole fungicides for postinfection control of apple scab. Phytopathology 71: 737-742.
- O'Leary A.J., Jones A.L., 1987. Factors influencing the uptake fenarimol and flusilazol by apple leaves. Phytology, 77: 1564-1568.
- O'Leary A.J., Jones A.L., Ehret G.R., 1987. Application Rates and Spray Intervals for Apple Scab Control with Flusilazol and Pyrifeno. Plant Disease 71: 623-626.
- Schwabe W.F.S., Jones A.L., Jonker J.P., 1984. Greenhouse evaluation of protective action of sterol-inhibiting fungicides against apple scab. Phytopathology 74: 249-252.

Fot. 1. Zarodnikująca grzybnia *V. inaequalis* oraz stopniowa degradacja komórek epidermy na niechronionych liściach.

Fig. 1. Sporulated mycelium of *V. inaequalis* on untreated leaves and degradation of epidermis cells.

Fot. 2. Znaczna redukcja grzybni po zastosowaniu kresoksymetylu.

Fig. 2. Significant reduction of mycelium after kresoxim-methyl treatment.

Fot. 3. Redukcja i odrywanie się strzępek grzybni po zastosowaniu preparatu Zato 50 WG (trifloxystrobin). Nekrozy i degradacja komórek epidermy.

Fig. 3. Reduction and detachment of hyphae after trifloxystrobin treatment. Necrosis and degradation of epidermis cells.

Fot. 4. Zbite, bezstrukturalne fragmenty grzybni po zastosowaniu fungicydu.

Fig. 4. Unstructurall fragments of mucelium after fungicide treatment.

Fot. 5. Strzępki grzybni, strzępki konidiotwórcze i nieuszkodzone zarodniki konidialne na liściach nie opryskiwanych.

Fig. 5. Hyphae with conidiophores and conidia *V. inaequalis* on untreated apple leaves.

Fot. 6. Zwijanie się kutikuli na powierzchni nieopryskiwanych liści.

Fig. 6. Rolls of cuticle on surface of untreated leaves.

Fot. 7. Właściwości wyniszczające krezoksym-metylu - grzybnia, konidiofory i zarodniki konidialne są spłaszczone.

Fig. 7. The eradicated activity of kresoxim-methyl - mycelium, conidiophores and conidia are collapsed.

Fot. 8. Kilka nieuszkodzonych zarodników po wyniszczającym zabiegu krezoksym-metylu.

Fig. 8. After eradicated treatment with kresoxim-methyl a few conidia are undamaged.

Fot. 9. Właściwości wyniszczające preparatu Zato 50 Wg (trifloxystrobin) - strzępki konidiotwórcze i zarodniki konidialne są całkowicie zniszczone.

Fig. 9. The eradicated activity of trifloxystrobin - conidiophores and conidia are completely collapsed.

Fot. 10. Znaczne wyniszczenie grzybni na liściach opryskiwanych mieszaniną preparatu strobilurynowego i difenkonazolu.

Fig. 10. Strong damage of mycelium after treatment with mixture of strobilurin fungicide and difenconazole.

Fot. 11. Całkowite wyniszczenie zarodników konidialnych i strzępek konidiotwórczych na liściach opryskiwanych mieszaniną preparatu strobilurynowego i difenkonazolu.

Fig. 11. Total damage of conidia and conidiophores on treated leaves with mixture of strobilurin fungicide and difenconazole

Efekt wyniszczającego działania fungicydów strobilurynowych i difenkonazolu na grzybnię i zarodnikowanie *Venturia inaequalis*

Streszczenie

W doświadczeniach szklarniowym i polowym badano wpływ wyniszczającego działania fungicydów strobilurynowych i difenkonazolu na grzybnię i zarodnikowanie grzyba *Venturia inaequalis*. Obserwacje przy użyciu mikroskopu elektronowego wykazały znaczną plazmolizę strzępek grzybni i zarodników po zastosowaniu preparatów strobilurynowych i difenkonazolu. Obserwacje przeprowadzone po 3 tygodniach od opryskiwania wykazały, że najsilniejsze hamowanie zarodnikowania stwierdzono na liściach traktowanych mieszaniną strobiluryny i difenkonazolu. Bardzo dobrym działaniem antysporulacyjnym charakteryzowały się również preparaty Score 250 EC i Zato 50 WG. Skuteczność fungicydu Discus 500 WG była natomiast niższa. Również po 5 tygodniach od opryskiwania najlepsze działanie antysporulacyjne stwierdzono po zastosowaniu mieszanin strobiluryny z difenkonazolem oraz difenkonazolu. Skuteczność pozostałych testowanych fungicydów, Zato 50 WG i Discus 500 WG, była istotnie niższa.

Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniu szklarniowym. Ocena przeprowadzona po 3 tygodniach od zabiegu potwierdziła bardzo dobrą skuteczność mieszanin oraz preparatu Zato 50 WG. Natomiast po 5 tygodniach od opryskiwania skuteczność preparatów Discus 500 WG i Zato 50 WG była niższa niż ich mieszanin z difenkonazolem.