Reakcja grzybów owadobójczych na fungicydy pochodzenia roślinnego i syntetycznego *in vitro*

¹ANNA SAPIEHA-WASZKIEWICZ,

²BARBARA MARJAŃSKA-CICHON,

¹RYSZARD MIĘTKIEWSKI, ¹MIECZYŚLAW ŻUREK

¹⁾ Katedra Ochrony Roślin, Akademia Podlaska, ul. B. Prusa 12, 08 110 Siedlce

²⁾ Pracownia Sadownictwa, Akademia Podlaska, ul. B. Prusa 12, 08 110 Siedlce

A response of entomopathogenic fungi to botanical fungicides
and synthetic fungicides *in vitro*

(Otrzymano: 15.10.2004)

S u m m a r y

The growth colonies' morphology and sporulation of entomopathogenic fungi was estimated on Sabouraud medium containing botanical fungicides (Bioczol liquid and Biosept 33 SL), and synthetic ones (Teldor 500 SC and Sumilex 500 SC). Entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana* (Balls.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok, and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown et Smith.), were isolated from soil by means of *Galleria mellonella* larvae as baits. Isolates *Bb I*, *Ma I*, *Pf I* derived from herbicide fallow from apple orchard and isolates *Bb II*, *Ma II* and *Pf II* from arable field adjacent to orchard. Fungicides were added to Sabouraud medium at the following concentrations: A-recommended dose, B-10-times lower than the recommended, C-100-times lower than the recommended. The growth of colonies their morphological changes and sporulations were estimated after 5 and 20 days. The same parameters were observed when fungi were transferred from the medium containing fungicides on the medium without fungicides. From botanical fungicides Bioczol liquid inhibited fungal growth more than Biosept 33 SL. Both of fungicides were most toxic to fungi at concentration A. Both of *P. fumosoroseus* isolates were the most sensitive to Bioczol liquid and *M. anisopliae* to Biosept 33 SL. All concentrations of synthetic fungicides (Sumilex 500 SC, Teldor 500 SC) restricted growth of *B. bassiana* and *M. anisopliae* isolates more from arable soil than from herbicide fallow but opposite reaction was found with respect to *P. fumosoroseus*.

Key words: entomopathogenic fungi, botanical fungicides, synthetic fungicides, growth, colonies morphology, sporulation

WSTĘP

Stosowanie chemicznych środków ochrony roślin w sadach i jagodnikach towarowych jest niekwestionowaną koniecznością. Może ono jednak powodować zachwianie równowagi biologicznej w agrocenozach, skutkiem czego jest pojawianie się nowych, odpornych ras szkodników i patogenów roślin, a pozostałości pestycydów mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów. W konwencjonalnej produkcji owoców zużycie fungicydów jest dominujące w stosunku do innych środków ochrony roślin (Ozimek, 2004). W samych tylko sadach jest to około 13 kg substancji aktywnej na 1 ha (Makosz, 1999).

W Polsce w uprawach sadowniczych coraz powszechniej wprowadza się i rozpowszechnia integrowaną produkcję owoców (IPO), której zasadniczym elementem jest integrowana ochrona roślin (Olszak, 2004). Podstawą IPO jest dążenie do minimalizacji niekorzystnych efektów ubocznych zastosowanych agrochemikaliów, co zwiększa gwarancję zarówno dla środowiska jak i zdrowia ludzi. W IPO powszechne jest wprowadzanie alternatywnych systemów ochrony roślin oraz wykorzystywanie „proekologicznych” środków ochrony roślin (Kowalska, 2001). Typowym przykładem takich środków mogą być Biosept 33 SL oraz Bioczos płynny. Biosept 33 SL zawiera 33% ekstraktu z grejpfruta, wykorzystywany jest do zwalczania chorób pochodzenia grzybowego i bakteryjnego, w tym mączniaków prawdziwych i szarej pleśni (Wojdyła, 2000; Orlikowski, 2001). Bioczos zawiera wyciąg z czosnku i podobnie jak Biosept 33 SL, polecany do zwalczania mączniaków prawdziwych i szarej pleśni (Lipa i Jarosz, 1990; Wojdyła, 1996; Niezborala i Marjańska-Cichoń, 2000; Banaszkiewicz, Kurowski i Kopytowski, 1999). Orlikowski (2001) podaje, że preparat czosnkowy może być wykorzystywany w ochronie roślin ozdobnych, gdzie dodany do gleby ogranicza rozwój grzybów z rodzajów *Phytophthora*, *Pythium* czy *Fusarium* i infekcje roślin.

Celem pracy było porównanie wpływu preparatów Biosept 33 SL i Bioczos płynny oraz syntetycznych fungicydów na grzyby owadobójcze, które w warunkach naturalnych pełnią istotną rolę w ograniczaniu populacji agrofagów (Ignoffo i in., 1978; Ferron, 1981; Machowicz-Stefaniak, 1986; Jaworska, 1979; Miętkiewski, 1985; Marjańska-Cichoń, Miętkiewski i Sapieha-Waszkiewicz, 2004).

MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano biopreparaty Biosept 33 SL i Bioczos płynny oraz syntetyczne fungicydy tj. Sumilex 500 SC i Teldor 500 SC. Charakterystykę preparatów przedstawiono w tab. 1.

Testowano następujące gatunki grzybów owadobójczych:

Beauveria bassiana (Bals.) Vuill. (*Bb I*, *Bb II*)

Metarhizium anisopliae (Metsch.) Sorok (*Ma I*, *Ma II*)

Paecilomyces fumosoroseus (Wize) Brown et Smith. (*Pf I*, *Pf II*)

Tabela 1. Wykaz pestycydów zastosowanych w doświadczeniu

Table 1. Pesticides used in experiment

Nazwa handlowa preparatu Market name of preparation	Nazwa i zawartość substancji aktywnej w g lub % Name and content of active ingredient in g or %	Zalecana dawka w ml/l Recommended concentration in ml/l	Klasa Toksyczności Class of toxicity	Producent Manufacturer
Bioczys płynny	ekstrakt z czosnku	25	IV	Himal-Łódź
Bisept 33 SL	ekstrakt z grejpfruta 33	1	IV	Cintamani-Poland-Piaseczno
Teldor 500 SC	fenheksamid 500	2	IV	Bayer AG-Niemcy
Sumilex 500 SC	procymidon 500	1	IV	Sumitomo Chemical Company Limited-Japonia

Izolaty *Bb I*, *Ma I*, *Pf I* wyizolowane zostały metodą owadów pułapkowych, używając larw *Galleria mellonella* L (Zimmermann, 1986) z gleby pobranej z ugoru herbicydowego z wieloletniego sadu jabłoniowego, zaś izolaty *Bb II*, *Ma II* i *Pf II* pochodziły z pola uprawnego, sąsiadującego z sadem. Izolaty grzybów hodowano na podłożu Sabouraud'a (SDA).

Użyte w doświadczeniu biopreparaty i fungicydy zastosowano w dawkach:

- A zalecanej w praktyce polowej
- B 10-krotnie mniejszej od zalecanej
- C 100-krotnie mniejszej od zalecanej

Preparaty dodano w koncentracji zalecanej bezpośrednio do sterylnej podłoża SDA. Kolejne stężenia uzyskano metodą rozcieńczeń. Po 24 godzinach wyszczepiono grzyby. Kontrolę stanowiły kolonie grzybów rosnące na podłożu bez dodatku żadnego preparatu. Każdą kombinację wykonano w 5 powtórzeniach. Obserwacje przeprowadzono w 5 i 20 dniu hodowli, mierząc średnicę kolonii. Obserwowano również zmiany morfologiczne kultur rosnących na pożywkach z poszczególnymi preparatami oraz zmiany w ich zarodnikowaniu.

Wybrane kultury grzybów, po zakończeniu doświadczenia przeszczepiono ponownie na podłożę SDA bez dodatku preparatów, obserwując wzrost, morfologię i zarodnikowanie kolonii, w celu określenia działania następczego badanych fungicydów.

WYNIKI I DYSKUSJA

Z grupy preparatów pochodzenia roślinnego, Bioczys pł. zastosowany w dawce polowej (A) silnie ograniczał wzrost testowanych grzybów owadobójczych (rys. 1). Najwrażliwsze na tę dawkę preparatu okazały się oba izolaty *P. fumosoroseus*, których

**Rys. 1. Wielkość kolonii izolatów grzybów na podłożu z biopreparatami
(w % w stosunku do kontroli)**

**Fig. 1. Diameter of colonies of the fungi on botanical pesticide medium
(in % to control)**

Objaśnienia: (Explanations):

- A dawka zalecana, A recommended concentration
- B dawka 10 krotnie niższa od zalecanej, B concentration 10 times lower than recommended
- C dawka 100 krotnie niższa od zalecanej, C concentration 100 times lower than recommended

Bb I, II izolaty *B. bassiana* isolates of fungi *B. bassiana*

Ma, I, II izolaty *M. anisopliae* isolates of fungi *M. anisopliae*

Pf I, II izolaty *P. fumosoroseus* isolates of fungi *P. fumosoroseus*

kolonie przez cały czas trwania doświadczenia były o około 50% mniejsze niż kolonie kontrolne. Grzyby *B. bassiana* i *M. anisopliae* rosły nieco intensywniej, zaś niekorzystny wpływ Bioczosu pł. malał w miarę upływu doświadczenia (rys. 1). Obserwacje te potwierdzają badania Miętkiewskiego i Sapiehy (1991), którzy stwierdzili, że oparty na czosnku preparat Albarep zastosowany w dawkach zalecanych i wyższych silnie hamował rozwój grzybów entomopatogennych takich jak: *B. bassiana*, *Paecilomyces farinosus* (Holm. ex Fr.) Brown et Smith czy *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas.

Fot. 1. 20-dniowe kolonie *Beauveria bassiana* (Bb I, Bb II) i *Metarhizium anisopliae* (Ma I, Ma II) na podłożu z preparatem Biosept 33 SL

Fot. 1. 20-days' colonies of *Beauveria bassiana* (Bb I, Bb II) and *Metarhizium anisopliae* (Ma I, Ma II) on the medium with fungicide Biosept 33 SL

- K kontrola control
- A stężenie odpowiadające dawce polowej
concentration used in recommended dose
- B stężenie 10 krotnie mniejsze od zalecanego
concentration 10 times lower than recommended
- C stężenie 100 krotnie mniejsze od zalecanego
concentration 100 times lower than recommended

Rys. 2. Wielkość kolonii izolatów grzybów na podłożu z syntetycznymi pestycydami
(w % w stosunku do kontroli)

Fig. 2. Diameter of colonies of the fungi on synthetic pesticide medium
(in % to control)

Objaśnienia jak przy Rys. 1.

Explanations as on Fig. 1.

Bioczos pł. zastosowany w koncentracjach 10 i 100-krotnie mniejszych nie wpływał znacząco na testowane grzyby owadobójcze, a ich tempo wzrostu zbliżone było do kontroli (rys. 1).

Biosept 33 SL w koncentracji polowej, najsilniej z testowanych grzybów, hamował wzrost obu izolatów *M. anisopliae*, które w 5 dniu hodowli tworzyły kolonie prawie o 60% mniejsze niż w kontroli (rys. 1). Negatywny wpływ preparatu mała w miarę trwania doświadczenia. W przypadku zastosowania dawek niższych od zalecanej, różnice w oddziaływaniu na poszczególne gatunki nie były już tak wyraźne, a tempo wzrostu grzybów było intensywne i porównywalne do kontroli (rys. 1). W literaturze brak jest informacji o wpływie Bioseptu 33 SL, będącego wyciągiem z pestek i miąższu z owoców grejpfruta na grzyby owadobójcze. Dla porównania inne wyciągi roślinne takie jak z pokrzywy zwyczajnej, skrzypu polnego i bylicy piołunu miały niewielki wpływ na wzrost kolonii grzybów owadobójczych (Kmitowa, Augustyniuk i Bajan, 1997; Augustyniuk, Kmitowa i Bajan, 1997).

Grzyby entomopatogenne na podłożach zawierających Bioczos pł. i Biosept 33 SL nie wykazywały zmian morfologicznych w wyglądzie kolonii (fot. 1), lecz zarodnikowały wyraźnie słabiej niż w kontroli. Podobne zjawisko w odniesieniu do grzybów, patogenów roślin w kontakcie z ekstraktem z czosnku obserwowali Machowicz-Stefaniak i in. (1995). Augustyniuk i in. (1997) podają natomiast, że wyciąg z bylicy piołunu hamował zarodnikowanie niektórych szczepów *B. bassiana*.

Zastosowane w celach porównawczych fungicydy syntetyczne na badane gatunki grzybów oddziaływały silniej lub porównywalnie do biopreparatów (rys. 2). Preparat Sumilex 500 SC niezależnie od zastosowanej dawki najsilniej hamował wzrost izolatu *M. anisopliae*, pochodzącego z pola uprawnego (*Ma II*). W piątym dniu doświadczenia wzrost ten był ograniczony o około 70% (rys. 2). Zupełnie odmiennie na ten preparat reagował izolat *Ma I*, wyizolowany z ugoru herbicydowego, którego wzrost na podłożu z Sumilexem 500 SC był zbliżony do kontroli. Podobne zjawisko świadczące o tworzeniu się szczepów o podwyższonej odporności na syntetyczne fungicydy obserwowali Sapięha-Waszkiewicz i in. (2004) po zastosowaniu Captanu 50 WP, w odniesieniu również do *M. anisopliae*.

Teldor 500 SC w dawce polowej, podobnie jak Sumilex 500 SC najsilniej ograniczał wzrost izolatu *M. anisopliae*, pochodzącego z pola uprawnego (*Ma II*). Izolat *Ma I* z ugoru herbicydowego rósł nieco intensywniej, ale różnice te nie były tak wyraźne, jak w przypadku Sumilexu 500 SC (rys. 2).

Generalnie należy stwierdzić, że zarówno Sumilex 500 SC jak i Teldor 500 SC okazały się stosunkowo mało toksyczne dla badanych grzybów. Większą wrażliwością na testowane preparaty odznaczały się izolaty *M. anisopliae* i *B. bassiana*, pochodzące z pola uprawnego oraz izolat *P. fumosoroseus* z ugoru herbicydowego. Brak hamującego oddziaływania niektórych fungicydów na wzrost kolonii grzybów owadobójczych obserwowali również Machowicz-Stefaniak (1980) oraz Sapięha-Waszkiewicz i in. (2004).

Fot. 2. Morfologia 20-dniowych kolonii grzybów owadobójczych
 Fot. 2. Morphology of 20-days' colonies entomopathogenic fungi

Zarówno Sumilex 500 SC jak i Teldor 500 SC silniej niż biopreparaty oddziaływały na morfologię i zarodnikowanie kultur. Największe zmiany obserwowano w przypadku izolatu *Bb I*, rosnącego na podłożach z dawką zalecaną Teldoru 500 SC (fot. 2) i Sumilexu 500 SC. Kolonie grzybów były płaskie, śluzowate, półprzeźroczyste i nie zarodnikowały. Mniejsze zmiany wystąpiły w strukturze grzybni *M. anisopliae* (fot. 2) i *P. fumosoroseus*, rosnących na podłożach z fungicydami syntetycznymi, lecz kultury te zarodnikowały znacznie słabiej niż w kontroli.

Badając wpływ następczy zastosowanych w doświadczeniu preparatów stwierdzono, że zmiany w morfologii i zarodnikowaniu kolonii nie były trwałe. Grzyby rosnące na podłożach z badanymi biopreparatami i fungicydami przeszczepione na pożywki SDA bez dodatku preparatów pod względem morfologicznym, zarodnikowania i wzrostu były podobne jak w kontroli (tab. 2). Analogiczne zjawisko w odniesieniu do syntetycznych pestycydów obserwowali Sapiha-Waszkiewicz, i in. (2004).

Tabela 2. Wielkość kolonii izolatów grzybów owadobójczych przeszczepionych z podłoży zawierających wybrane fungicydy na pożywkę bez dodatku preparatu w 20 dniu hodowli (w % w stosunku do kontroli)

Table 2. Diameter of fungal colonies transferred from medium containing fungicides to medium with out fungicides (in % to control)

Nazwa i stężenie preparatu Name and concentration preparation		Gatunek i izolat grzyba-Species and isolate of fungi					
		<i>Beauveria bassiana</i>		<i>Metarhizium anisopliae</i>		<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	
		<i>Bb I</i>	<i>Bb II</i>	<i>Ma I</i>	<i>Ma II</i>	<i>Pf I</i>	<i>Pf II</i>
Bioczopłynny	B	X	X	X	94,1±0,35	X	X
	C	X	X	97,7±0,29	100,0±0,00	X	X
Biosept 33 SL	A	118,8±0,00	103,8±0,00	117,3±0,00	93,8±0,00	98,0±1,40	X
	B		X	102,6±0,00	100,6±2,80	X	X
Sumilex 500 SC	A	108,9±0,00	X	111,9±0,40	96,9±0,00	X	X
	B	113,9±0,00	X	X	X	X	98,5±0,00
Teldor 500 SC	A	105,9±0,00	107,7±0,00	X	93,8±0,00	X	X

Objaśnienia skrótów: (Explanations:)

dawka polowa A recommended concentration

dawka 10 krotnie mniejsza od zalecanej B concentration 10 times lower than recommended

dawka 100 krotnie mniejsza od zalecanej C concentration 100 times lower than recommended

kombinacja nie badana X combination non experimented

LITERATURA

- Augustyniuk A., Kmitowa K., Bajan C., 1997. Differentiation of the reaction of *Beauveria bassiana* strains to plant extracts. Pol. Ecol. Stud. 23 (3 4): 187 198.
- Banaszkiewicz T., Kurowski T. P., Kopytowski J., 1999. Przydatność alternatywnych metod zwalczania szarej pleśni w truskawce. Mat. Ogólnopol. Konf. Ochrony Rośl. Sadown. ISK Skierniewice: 81 84.
- Ferron P., 1981. Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium*. W: Microbial control of pest and Plant Diseases 1970 1980. Red. Burges H. D.: 465 482.
- Ignoffo C. M., Garcia C., Hostetter D. L., Pinnell R. E., 1978. Stability of conidia on entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* in and on soil. J. Invertebr. Pathol. 28: 259 268.
- Jaworska M., 1979. Badania nad możliwością ograniczania populacji owocnicy jabłkowej *Hoplocampa testudinea* Klug. (Hymenoptera, Tenthredinidae) przez pasożytnicze grzyby. Roczn. Nauk Roln. E 9 (2): 169 181.
- Kmitowa K., Augustyniuk A., Bajan C., 1997. A response of entomopathogenic fungi to plant extracts. Pol. Ecol. Stud. 23 (3 4): 171 185.
- Kowalska J., 2001. Proekologiczne metody produkcji owoców w Polsce. OWK 24: 14 15.
- Lipa J. J., Jarosz J., 1990. Fungistatic and fungicidal activity of Albarep and garlic juice against phytopathogenic fungi. Roczn. Nauk Roln. E 20 (1/2): 53 59.
- Machowicz Stefaniak Z., 1980. Wpływ wybranych fungicydów stosowanych w ochronie sadów na rozwój grzybów owadobójczych. Roczn. Nauk Roln. E 10 (1 2): 187 199.
- Machowicz Stefaniak Z., 1986. Grzyby towarzyszące obumieraniu diapauzujących gąsienic owocówki jabłkowieczki *Laspeyresia pomonella* L. (Lepidoptera, Tortricidae). Roczn. Nauk Roln. E 16 (1): 111 125.
- Machowicz Stefaniak Z., Pięta D., Wolski T., 1995. Oddziaływanie *in vitro* ekstraktu czosnkowego na wzrost niektórych fitopatogenów. Pestycydy 3: 23 28.
- Makosz E., 1999. Zużycie pestycydów w sadach jabłoniowych z tradycyjną i integrowaną produkcją owoców. Mat. z XIX Międzynar. Sem. Sad. Limanova: 75 83.
- Marjańska Cichoń B., Miętkiewski R., Sapieha Waszkiewicz A., 2005. Wstępowanie i skład gatunkowy grzybów owadobójczych w glebach z sadów jabłoniowych. Acta Agrobot. 58 (1 2): 113 124.
- Miętkiewski R., 1985. Mikoflora martwych gąsienic kuprówki rudnicy (*Euproctis chrysorrhoea* L.) podczas diapauzy zimowej. Roczn. Nauk Roln. E 15 (1 2): 139 150.
- Miętkiewski R., Sapieha A., 1991. Wzrost grzybów na pożywkach z dodatkiem preparatu Albarep. Zesz. Nauk. WSRP w Siedlcach, Roln. 29: 203 212.
- Niezborała E., Marjańska Cichoń B., 2000. Przydatność Bioczosu (preparatu czosnkowego) do zwalczania szarej pleśni truskawki. Mat. Konf. Ochrony Rośl. Sadown. ISK Skierniewice: 203 210.
- Olszak R., 2004. Integrowana produkcja owoców a dobra praktyka ochrony roślin. Prognoza zagrożeń upraw sadowniczych przed szkodnikami w sezonie 2004. Ogólnopol. Nauk. Konf. Ochrony Rośl. Sadown. ISK Skierniewice: 20 24.
- Orlikowski L. B., 2001. Effect of grapefruit extract on development of *Phytophthora cryptogea* and control of foot rot of gerbera. J. Plant. Prot. Rest. 41 (3): 288 294.
- Ozimek R., 2004. Rozwój integrowanej produkcji owoców w Polsce. H O 3: 16 17.
- Sapieha Waszkiewicz A., Marjańska Cichoń B., Miętkiewski R., 2004. The effect of fungicides applied in apple orchards on entomopathogenic fungi *in vitro*. EJPAU Hortic. 7 (1), art. 4: 1 15.

- Wojdyła A. T., 1996. Czosnek w ochronie róż przed chorobami. „Nowe kierunki w fitopatologii”. Kraków, 11 13. 09: 390 391.
- Wojdyła A. T., 2000. Influence of compounds on development of *Shaerotheca pannosa* var. *rosae*. J. Plant Prot. Res. 40 (2): 106 121.
- Zimmermann G., 1986. „*Galleria* bait method” for detection of entomopathogenic fungi in soil. J. Appl. Ent. 102: 213 215.

Streszczenie

Badano oddziaływanie fungicydów pochodzenia roślinnego Bioczos pł. i Biosept 33 SL oraz syntetycznych Sumilex 500 SC i Teldor 500 SC na wzrost, morfologię i zarodnikowanie grzybów owadobójczych *in vitro*. Grzyby owadobójcze *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (*Bb I*, *Bb II*), *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok (*Ma I*, *Ma II*) i *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown et Smith. (*Pf I*, *Pf II*) wyizolowano z gleby metodą owadów pułapkowych na larwy *Galleria mellonella* L. Izolaty *Bb I*, *Ma I*, *Pf I* pochodziły z ugoru herbicydowego z sadu jabłoniowego, a izolaty *Bb II*, *Ma II* i *Pf II* z pola uprawnego sąsiadującego z sadem. Fungicydy dodano do sterylnego podłoża Sabourad’a w 3 koncentracjach: A – zalecanej w praktyce rolniczej, B – 10-krotnie mniejszej i C – 100-krotnie mniejszej od zalecanej. W 5 i 20 dniu eksperymentu obserwowano wzrost kolonii, zmiany morfologiczne oraz zarodnikowanie kultur. Zbadano również następczy wpływ fungicydów na cechy morfologiczne i wzrost kolonii grzybów. Z preparatów pochodzenia roślinnego Bioczos pł. silniej ograniczał wzrost testowanych grzybów owadobójczych niż Biosept 33 SL. Oba preparaty były najbardziej toksyczne dla badanych grzybów przy koncentracji A. Bioczos pł. był najbardziej toksyczny dla obu izolatów *P. fumosoroseus*, a Biosept 33 SL dla *M. anisopliae*. Fungicydy syntetyczne Sumilex 500 SC oraz Teldor 500 SC przy wszystkich koncentracjach silniej hamowały wzrost izolatów *M. anisopliae* i *B. bassiana* z pola uprawnego oraz izolatu *P. fumosoroseus* z ugoru herbicydowego.