
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. IX, SUPPLEMENTUM

SECTIO EEE

2001

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

LESZEK B. ORLIKOWSKI, CZESŁAW SKRZYPCZAK

**Biopreparat z wyciągu z grejpfruta — postęp w biologicznej
ochronie roślin przed chorobami**

Biopreparate from Grapefruit Extract — Progress in Biological Control of Plant Diseases

Mimo ogromnego postępu, jaki nastąpił w minionym dziesięcioleciu w zakresie badań nad wykorzystaniem mikroorganizmów, kompostów i wyciągów roślinnych oraz niektórych nawozów w zwalczaniu patogenów glebowych i nalistnych, biopreparaty stanowią ciągle niewielki udział w programach ochrony roślin. Wartość biopreparatów nie przekracza 1/30 ogółu sprzedawanych pestycydów (Lisansky i Coombs 1994; Stetter 1998). Ograniczenie stosowania środków chemicznych w wielu krajach przyczynia się z pewnością do rozwijania badań nad biologicznym zwalczaniem chorób roślin. W Polsce zarejestrowano dotychczas kilkanaście biopreparatów i w grupie tej znajduje się Biosept 33 SL, zawierający jako substancję biologicznie czynną 33% wyciągu z grejpfruta (*Citrus x paradisi* Macfad). Badania nad wykorzystaniem tego wyciągu w ochronie roślin to okres minionych 10 lat. Angioni i in. (1998) oraz Woedtke i in. (1999) stwierdzili bardzo silne hamowanie wzrostu *in vitro* *Bacillus subtilis*, *Candida maltosa*, *Escherichia coli*, *Penicillium digitatum*, *P. italicum*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* i *Staphylococcus subtilis*. W badaniach własnych wyciąg z grejpfruta bardzo silnie hamował wzrost strzępek grzybni *Botrytis cinerea*, form specjalnych *Fusarium oxysporum*, *Myrothecium roridum* i grzybów z rodzaju *Phytophthora*. Mniej wrażliwe na badany wyciąg okazały się *Alternaria alternata*, *Pythium ultimum* i *Rhizoctonia solani* (Orli-

kowski, nie publik.). Zastosowanie wyciągu do opryskiwania roślin hamowało rozwój *Colletotrichum* sp. na męczennicy (Caceres i in., 1998) i *Botrytis cinerea* na winorośli (Esterio i in., 1992). Doglebowe zastosowanie wyciągu z grejpfruta w dawce $165 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ chroniło co najmniej 50% gerbery przed *Phytophthora cryptogea* (Orlikowski i Skrzypczak, 2000).

Celem niniejszych badań była ocena aktywności biologicznej wyciągu z grejpfruta w hamowaniu rozwoju fuzariozy naczyniowej goździka, szarej pleśni tulipana, rdzy wierzby oraz plamistości pierścieniowej difenbachii.

MATERIAŁ I METODA

Biopreparat. W badaniach stosowano preparat handlowy Biosept 33 SL (33% wyciągu z grejpfruta) dostarczony przez firmę Cintamani — Polska. Stosowano go w dawkach od 165 do $660 \mu\text{g}$ substancji biologicznie czynnej na cm^3 .

Doświadczenia szklarniowe i polowe

1. Ochrona goździka (*Dianthus caryophyllus* L.) przed fuzariozą naczyniową. W 2 doświadczeniach użyto odmianę Master wrażliwą na *Fusarium oxysporum* Schlecht.f. sp. *dianthi* (Prill. & Del.) Sny. et Hans.(= *Fod*), izolat Gz 274. Do zakażenia substratu torfowego grzyb przygotowany na pożywcę z płatków owsianych stosując metodę podaną przez Orlikowskiego (1999). Przed sadzeniem goździków oraz po 1, 2 i 4 tygodniach uprawy badano liczebność populacji patogena stosując pożywkę selektywną Komady (1975). Goździki sadzono do doniczek o pojemności 1 dm^3 . Bezpośrednio po sadzeniu rośliny podlano stosując Biosept 33 SL w stężeniach 0,05 i 0,1% (50 cm^3 na pojemnik). Jako środek standardowy użyto Sarfun 500 SC ($0,5 \text{ dm}^3$ karbendazymu/ dm^3). Doświadczenie założono w układzie bloków kompletnie losowych w 4 powtórzeniach po 10 roślin i powtórzono je dwukrotnie w odstępie 4 tygodni. Obserwacje zdrowotności roślin prowadzono w odstępach tygodniowych w ciągu trzymiesięcznej uprawy. Po zakończeniu uprawy, gdy zwiędło większość roślin kontrolnych przeprowadzono analizę porażenia wiązek przewodzących goździków, mierząc długość nekrozy na przekroju podłużnym pędu.

2. Ochrona difenbachii (*Dieffenbachia Schott compacta*) przed *Myrothecium roridum* Tode. Kulturę grzyba przygotowano na agarze ziemniaczano-glukozowym (10 dni inkubacji w temperaturze 25°C). Krążki grzybni o średnicy 3 mm nanoszono na liście difenbachii 24 godziny przed ich opryskaniem lub 2 godziny po opryskaniu roślin. Jako fungicyd standardowy użyto Gwarant 500 SC ($0,5 \text{ dm}^3$ chlorotalonilu w 1 dm^3). Aby utrzymać na parapecie wilgotność względną powietrza powyżej 92%, zakażone rośliny przykryto cienką folią. Pomiary średnicy plam przeprowadzono po 7 i 14 dniach od inokulacji. Doświadczenie, powtórzone dwukrotnie, założono w podobnym układzie jak z goździkami w 4 powtórzeniach po 3 rośliny. Na każdy liść (3 liście na roślinie) naniesiono po 3 krążki grzyba.

3. Ochrona tulipanów (*Tulipa gesneriana* L.) przed *Botrytis tulipae* (Lib.) Lind. W doświadczeniu wykorzystano naturalnie zakażone rośliny odm. 'Lustige Witwe'. Opryskiwanie roślin w odstępach tygodniowych rozpoczęto około 14 dni przed kwitnieniem tulipanów i kontynu-

owano je do końca maja, gdy liście zaczęły żółknąć od wierzchołków. Jako środek standardowy użyto Rovral Flo 255 SC (225 cm^3 iprodionu w dm^3). Obserwacje dotyczyły liczby nekrotycznych plam na liściach, powstałych wskutek zakażenia przez *B. tulipae*. Z każdego poletka o powierzchni 2 m^2 pobierano losowo po 10 liści celem wykonania takich obserwacji.

4. Ochrona wierzbki iwy (*Salix caprea* L. 'Pendula') przed *Melampsora epitea* (Kunze et Schm) Thuem. W doświadczeniu wykorzystano rośliny naturalnie zakażone przez grzyba. Przed rozpoczęciem ochrony policzono liczbę liści na pędzie oraz określono liczbę blaszek liściowych z widocznymi, pomarańczowymi urediniami patogena. Następnie rośliny opryskano dwukrotnie co 7 dni stosując obok wyciągu z grejpfruta również Saprol 190 EC (190 cm^3 triforyny w 1 dm^3) jako fungicyd standardowy. Po tygodniu od wykonania ostatniego zabiegu określono procentową liczbę porażonych liści oraz procent zaschniętych uredinów *M. epitea*. Doświadczenie założono w układzie bloków losowych w 4 powtórzeniach (po 3 rośliny) i powtórzono je trzykrotnie.

WYNIKI I DYSKUSJA

1. Ochrona goździka przed fuzariozą naczyniową. Podlanie roślin bezpośrednio po ich sadzeniu do substratu torfowego, zakażonego przez *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* (Fod), spowodowało drastyczny spadek liczebności patogena (tab. 1).

Po 7 i 14 dniach liczebność *Fod* w podłożu była co najmniej o 74% niższa aniżeli w torfie podlanym tylko wodą oraz o 60% niższa aniżeli w substracie potraktowanym karbendazymem. Po 4 tygodniach liczebność patogena wzrosła, ale była ona ciągle istotnie niższa aniżeli w podłożu kontrolnym. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy stężeniem wyciągu użytego do podlania podłoża a jego aktywnością w stosunku do *Fod* (tab. 1). Zastosowanie doglebowe wyciągu z grejpfruta, do ochrony goździków przed *Fod* spowodowało, że pierwsze symptomy choroby pojawiły się 4 tygodnie później, aniżeli na roślinach kontrolnych. Po 12 tygodniach wyciąg chronił co najmniej 3/5 goździków przed *Fod*, podczas gdy karbendazym 2/5 (tab. 2). Stężenie biopreparatu nie miało istotnego wpływu na jego aktywność biologiczną. Analiza zmiany zabarwienia wiązek przewodzących goździka pod wpływem patogena wykazała, że *Fod* rozprzestrzeniał się w roślinach podlanych wyciągiem z grejpfruta znacznie wolniej (o około 43%) aniżeli w goździkach chronionych karbendazymem (tab. 2).

2. Ochrona difenbachii przed *Myrothecium roridum* Zastosowanie wyciągu z grejpfruta w stężeniu $330 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ po 24 godzinach od zakażenia liści przez patogena, spowodowało zahamowanie rozwoju nekrotycznych plam na liściach o około 50% (tab. 3).

Tab. 1. Wpływ wyciągu z grejpfruta na dynamikę liczebności populacji *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* w substracie torfowym; % zmniejszenia liczebności grzyba; populacja inicjalna: 1420 jednostek propagacyjnych w 1 g pow. suchego torfu

Influence of grapefruit extract on population dynamic of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* in peat; decrease of colony forming units number (in %); initial population: 1420 colony forming units $\cdot$ g⁻¹ of air dry peat

Kombinacja Treatment	μ g subst. biolog. czynnej na cm ³ μ g of a.i. per cm ³	Tygodnie od zastosowania Weeks after treatment		
		1	2	4
Kontrola Control	-	0 a	0 a	0 a
Wyciąg z grejpfruta Grapefruit extract	167	87 b	81 b	48 b
Wyciąg z grejpfruta Grapefruit extract	330	86 b	82 b	52 b
Wyciąg z grejpfruta Grapefruit extract	660	74 b	77 b	33 b
Karbendazym Carbendazim	500	10 a	17 b	0 a

Uwaga: Średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (5% wg testu Duncana).

Note: Means followed by the same letter do not differ significantly (5% according to Duncan's test)

Tab. 2. Aktywność biologiczna wyciągu z grejpfruta w ochronie goździka przed *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*

Biological activity of grapefruit extract in the control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* on carnation

Kombinacja Treatment	μ g subst. biolog. czynnej na cm ³ μ g of a.i. per cm ³	Liczba porażonych roślin (n=10) po 12 tygodniach Number of diseased plants (n=10) after 12 weeks	Długość zbrązowienia wiązek przewodz. (mm) Length of vessels discoloration (mm)
Kontrola Control	-	7,5 c	54,6 c
Wyciąg z grejpfruta Grapefruit extract	165	4,0 a	29,5 a
Wyciąg z grejpfruta Grapefruit extract	330	3,75 a	32,2 a
Karbendazym Carbendazim	500	5,75 b	40,8 b

Uwagi: Patrz tab. 1; Note See Tab. 1

Tab. 3. Wpływ preparatu Biosept 33 SL zastosowanego do jednorazowego opryskiwania, na rozwój nekrozy na liściach difenbachii zakażonych przez *Myrothecium roridum*; średnica nekrozy w mm po 7 dniach

Influence of Biosept 33 SL, applied once as spray on the necrosis development on dieffenbachia leaves inoculated with *Myrothecium roridum*; diam of necrosis (mm) after 7 days

Kombinacja Treatment	μg subst. biol. czynnej na cm ³ μg of a.i. per cm ³	Zakażenie 2 godz. po opryskaniu Inoculation 2 hr after spraying	Zakażenie 24 godz. przed opryskaniem Inoculation 24 hr before spraying
Kontrola Control	-	12,8 d	12,8 d
Wyciąg z grejpfruta Grapefruit extract	165	11,6 d	6,9 b
Wyciąg z grejpfruta Grapefruit extract	330	9,1 c	5,1 ab
Chlorotalonil Chlorothalonil	1000	5,1 ab	4,1 a

Uwagi: Patrz tab. 1; Note: See Tab. 1

Aktywność biologiczna biopreparatu w tym stężeniu była podobna jak skuteczność chlorotalonilu. Zastosowanie biopreparatu profilaktycznie, 2 godziny przed inokulacją liści przez *M. roridum*, spowodowało również istotne ograniczenie rozwoju choroby. Lepsze wyniki uzyskano, gdy biopreparat użyto w niższym stężeniu (tab. 3).

3. Ochrona wierzby iwy przed *Melampsora epitea*. Grzyb, powodujący rdzę, rozwijał się bardzo szybko na roślinach. W ciągu 3 tygodni od rozpoczęcia doświadczenia, liczba porażonych liści na pędach nie chronionych (kontrola) wzrosła ponad dwukrotnie (tab. 4).

Gdy rośliny opryskano dwukrotnie wyciągiem z grejpfruta lub triforyną, rdza rozwijała się na liściach tylko sporadycznie. Analiza uredyniów na chronionych liściach wykazała, że zarówno biopreparat jak również i fungicyd powodowały brązowienie i wykruszanie się około 1/4 skupień zarodników (tab. 4). Na liściach roślin kontrolnych zaschnięte uredinia występowały tylko sporadycznie.

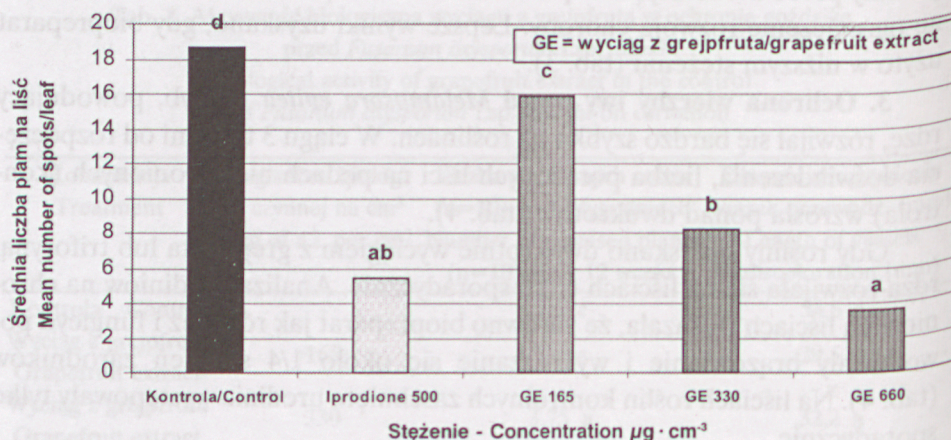
4. Ochrona tulipanów przed *Botrytis tulipae*. Wykonanie 5 opryskiwań tulipanów, naturalnie zakażonych przez *B. tulipae*, spowodowało istotne zahamowanie rozwoju szarej pleśni na liściach, zarówno przy stosowaniu wyciągu z grejpfruta, jak i iprodionu (ryc. 1). W ochronie przed szarą pleśnią bar-

Tab. 4. Aktywność biologiczna wyciągu z grejpfruta w ochronie wierzby iwy przed *Melampsora epitea*; 2 opryskiwania co 7 dni; obserwacja: 2 tygodnie po ostatnim opryskaniu

Effectiveness of grapefruit extract in the control of rust (*Melampsora epitea*) on *Salix caprea* 'Pendula'; 2 spraying at weekly intervals; observation: 2 weeks after last spray

Kombinacja Treatment	μg subst. biol. czynnej na cm^3 μg of a.i. per cm^3	Inicjalny % porażenia liści na pędzie Initial % of diseased leaves per shoot	% porażonych liści % of diseased leaves	% zaschniętych uredyniów % of withering uredinia
Kontrola Control	-	41 b	91,2 b	0,3 a
Wyciąg z grejpfruta Grapefruit extract	333	35 ab	41,5 a	21,5 b
Triforyna Triforine	285	29 a	47,2 a	27,2 b

Uwagi: Patrz tab. 1; Note: See Tab. 1.



Ryc. 1. Aktywność biologiczna wyciągu z grejpfruta w ochronie tulipanów przed *Botrytis tulipae*; opryskiwanie co 7 dni

Biological activity of grapefruit extract in the control of *Botrytis tulipae* on tulips; spraying at 7-day-intervals

dzo istotne okazało się stężenie biopreparatu. Istotnie najwyższy efekt ochronny uzyskano, gdy biopreparat zastosowano w stęż. 0,2%, bowiem jego aktywność biologiczna była nawet wyższa aniżeli iprodionu (ryc. 1).

Z dotychczasowych badań *in vitro* i *in vivo* aktywności biologicznej wyciągu z grejpfruta wynika, że kilka związków zawartych w owocach *Citrus x paradisi*, w tym triclosan, chlorek benzetoniny i 7-geranokumaryna, może hamować rozwój bakterii i grzybów (Angioni i in. 1998, Woedtkte i in. 1999). Istotne są również wyniki badań Esterio i in. (1992) wskazujące, że skuteczność wyciągu z grejpfruta w ochronie winorośli przed *B. cinerea* była podobna jak fungicydów zawierających w swoim składzie benomyl i winklozolinę. Badania (Orlikowskiego 2001) nad mechanizmem oddziaływania badanego biopreparatu na *Phytophthora cryptogea*, wniosły szereg nowych danych, dotyczących aktywności biologicznej wyciągu. Dodany do pożywki już w dawce $40 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ograniczał wzrost grzybni o około 50%. W koncentracji pięciokrotnie niższej wyciąg z grejpfruta hamował bardzo drastycznie formowanie się zarodni pływkowych *P. cryptogea* oraz kiełkowanie zoospor. Przy wzroście stężenia do $200 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ badany wyciąg powodował rozpad strzępek grzybni patogena. Efektem tego bezpośredniego oddziaływania wyciągu na badany gatunek grzyba jest drastyczne zahamowanie jego rozwoju. Znajduje to potwierdzenie po wprowadzeniu wyciągu z grejpfruta do podłoża, zakażonego przez *P. cryptogea*. Już w ciągu pierwszego tygodnia liczebność patogena spada o około 80% i stan ten utrzymuje się w ciągu następnych 3 tygodni. W praktyce, ten efekt oddziaływania biopreparatu na patogena widoczny jest w co najmniej 50% ograniczeniu rozwoju fitoftorozy (Orlikowski i Skrzypczak, 2000). W mniejszych badaniach, drastyczny spadek liczebności jednostek propagacyjnych *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* w substracie torfowym, podlanym wyciągiem z grejpfruta, mógł być spowodowany, obok zahamowania wzrostu grzybni, ograniczeniem formowania się zarodników konidialnych oraz chlamydospor. O bezpośrednim oddziaływaniu biopreparatu na grzyba mogą również świadczyć wyniki uzyskane z ochroną tulipanów przed *B. tulipae*. Wzrost aktywności biologicznej biopreparatu wraz z podnoszeniem jego stężenia może być związany z hamowaniem tworzenia się nowych strzępek grzybni oraz zarodników konidialnych *B. tulipae*. Ich brak lub tylko niewielkie zarodnikowanie patogena wpływało zapewne na jego sporadyczne rozprzestrzenianie się w nasadzeniach tulipanów. Na bezpośrednie oddziaływanie wyciągu z grejpfruta na grzyby chorobotwórcze dla roślin wskazują również dane z ochroną wierzby przed *Melampsora epitea*. Już po dwukrotnym opryskaniu roślin roztworem biopreparatu zbrunatniało i wykruszyło się około 1/4 urediniów patogena. Jest praw-

dopodobne, że proces ten postępuje w czasie. Podobne oddziaływanie na omawianego patogena obserwowano również przy zastosowaniu do ochrony wierzby azoksystrobiny (Orlikowski i Marasek, 2000).

Analizując mechanizm oddziaływania wyciągu z grejpfruta na grzyby chorobotwórcze nie można również wykluczyć indukowania przez niego odporności roślin na patogeny. Zagadnienie to będzie przedmiotem dalszych badań.

PIŚMIENICTWO

- Angioni A., Cabras P., Hallewin G., Pirisi F. M., Schirra M., 1998. Synthesis and inhibitory activity of 7-geranoxycoumarin against *Penicillium* species in *Citrus* fruit. *Phytochemistry*, 47, 8: 1521-1525.
- Caceres M. I., Martinez E., Torres F., 1998. Efecto de tiabendazol y extractos de semilla de toronja en el control de enfermedades de curuba en pre y poscosecha en Nuevo Colon. *Fitopatologia Colombiana*, 22, 1-2: 35-38.
- Esterio M. A., Auger J. G., Vazquez E., Reyes M., Sceeje F., Verhoeff K., Malathrakis N. E., Williamson B., 1992. Efficacy of grapefruit seed extract BC-1000 for control of *Botrytis cinerea* in table grape in Chile. *Proc. 10th Internat. Botrytis Symposium*, Heraklion, Crete, Greece, 1992.04.05-10: 211-214.
- Komada H., 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant Prot. Res.*, 8: 114-124.
- Lisansky S. G., Coombs J., 1994. Development in the market of biopesticides. *Brighton Crop Prot. Res. Conference*, 3: 1049-1054.
- Orlikowski L. B., 1999. Selective media for the evaluation of propagules densities of *Phytophthora* spp. and *Fusarium oxysporum* and biocontrol agents efficacy in the pathogens control. *Bull. Pol. Acad. Sci., Biolog. Sci.*, 47, 2-4: 167-172.
- Orlikowski L. B., 2001. Effect of grapefruit extract on development of *Phytophthora cryptogea* and control of foot rot of gerbera. *J. of Plant Prot. Res.*, 41, 2: 147-152.
- Orlikowski L. B., Marasek A., 1999. Activity of azoxystrobin against *Melampsora epiptea* on *Salix caprea* 'Pendula'. *Phytopathol. Pol.*, 18: 7-15.
- Orlikowski L. B., Skrzypczak Cz., 2000. Control of *Phytophthora* spp. with grapefruit extract. *Mat. z 6th IOBC/WPRS-EFPP Biocontrol workshop „Biocontrol agents: modes of action and their interaction with other means of control”*. Sevilla, Spain, 2000.11.30-12.03: 98.
- Stetter J., 1998. Pesticide innovation: Trends in research and development. *MFLBER*, 63/2a: 135-181.
- Woedtke Th., Schluter B., Pfliegel P., Lindequist U., Julich W. D., 1999. Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its selection to preservative substances contained. *Pharmazie*, 54, 6: 452-456.

SUMMARY

Biological activity of grapefruit extract (a.i. of Biosept 33 SL) against *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* on carnation, *Myrothecium roridum* on dieffenbachia, *Melampsora epitea* on willow and *Botrytis tulipae* on tulip was evaluated. The biopreparate was applied as peat drench or as plant spray at conc. from 165 to 660 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. When applied as peat drench grapefruit extract drastically reduced the number of colony forming units of *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* in peat and protected at least 60% of carnations. Application of the product as plant spray strongly inhibited the development of *Myrothecium* leaf spot of dieffenbachia, willow rust and tulip grey mould.

LESZEK B. ORLIKOWSKI¹, CZESŁAW SKRZYŃCZAK²,
TADEUSZ WOLSKI³, JAN GLIŃSKI⁴

Naturalna oporność podłoża, biopreparaty i wyciągi
z jeżówki purpurowej w zwalczaniu fuzariozy roślin ozdobnych

Substrate Naturalness, Biopreparates and Echinacea Extract in Fusarium Control
on Ornamental Plants

Zwiększająca się od kilku lat liczba konferencji i sympozjów naukowych poświęconych biologicznej ochronie roślin przed owadami szkodliwymi, szkodliwymi, wskazuje m.in. na intensywnie poszukiwanie nowych możliwości zwalczania patogenicznych grzybów i bakterii oraz dostarczania roślinnych biopreparatów. Podstawowym celem tych poszukiwań jest zastąpienie tradycyjnej chemicznej ochrony roślin i zastąpienie jej metodami biologicznymi. Mendogen (1993) podaje, że przed 10 lat opublikowano 3000 prac naukowych dotyczących owadów szkodliwych. Według samej Mendogen (1993) w 1998 roku liczba prac naukowych związanych z biologiczną zwalczaniem chorób roślin wzrosła do 7 tysięcy. Biologiczne ochrona roślin przed chorobami zaczęła się przed 6 tysiącami lat, gdy zaczęto uprawiać rośliny i poprzez obserwację natury i zdobycie doświadczenia podnoszono ich odporność i tak dalej. Przed ponad 100 laty w Ameryce Południowej Ashmead (1922) stwierdził, że występują gleby, na których uprawiane rośliny nie chorują, mimo obecności w nich czynników chorobotwórczych. Od tego czasu minęło niepełne 40 lat, gdy Reinking i Mangs (1933) nazwali takie gleby oparte na określonych czynnikach chorobotwórczych. W ostatnim trzydziściu lat problemem dla zainteresowanych się placówki badawcze na całym świecie, w tym również w Polsce. Prowadzone badania naukowe zawiodły, zaprzeczając starym