

Katedra Fitopatologii i Techniki Ochrony Roślin
Wydziału Ogrodniczego AP. w Lublinie

Barbara ŁACICOWA, Danuta PIĘTA

**Ochronne działanie mikrobiologicznego zaprawiania nasion grochu
(*Pisum sativum* L.) przeciwko chorobotwórczym grzybom odglebowym**

Protective Effect of Microbiological Dressing of Pea Seeds (*Pisum sativum* L.) Against Pathogenic
Fungi Living in the Soil

W ostatnim dziesięcioleciu wzrosło zainteresowanie możliwością wykorzystywania mikroorganizmów antagonistycznych jako komponentów preparatów mikrobiologicznych stosowanych do zaprawiania nasion (Erzurum i Iren, 1987; Hadar i in., 1984; Harman i in., 1980, 1989; Papavizas, 1985; Paulitz i in., 1990; Sesan, 1988a, 1988b). Uwzględniając uznaną szkodliwość grzybów patogenicznych przeżywających w glebie dla roślin grubonasiennych z rodziny Papilionaceae, w Katedrze Fitopatologii AR w Lublinie podjęto przed kilkoma laty badania nad możliwością ich ograniczania przez wysiew nasion zaprawianych materiałem mikrobiologicznym. Źródłem poszukiwania grzybów antagonistycznych do tego celu było glebowe środowisko uprawne gatunku rośliny, którą przewidywano chronić przed patogenami odglebowymi. Rezultatem dotychczasowych badań, uwzględniających *Phaseolus vulgaris* i *Ph. coccineus* jest wskazanie na dużą efektywność ochronną materiału mikrobiologicznego *Trichoderma koningii*, *T. viride*, *Gliocladium catenulatum*, *G. roseum* (Łacicowa i Pięta, 1988, 1990, 1992). Kolejnym ogniwem badań z tej serii jest poszukiwanie grzybów antagonistycznych, których materiał mikrobiologiczny można będzie wykorzystać do zaprawiania nasion *Pisum sativum* celem ochrony przed grzybami patogenicznymi przeżywającymi w glebie.

MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Badania przeprowadzono w fitotronie używając nasiona grochu odmiany Szafir. Sposób założenia doświadczenia wazonowego, warunki stworzone w fitotronie, parametry stosowane do oceny skuteczności ochronnego zaprawiania materiałem mikrobiologicznym były takie same, jak

w przypadku badań z *Phaseolus coccineus* (Łasicowa i Pięta, 1992). Ochronną skuteczność mikrobiologicznego zaprawiania nasion badano w stosunku do *Ascochyta pisi*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*. Izolaty wymienionych grzybów uzyskano z 75 siewek z objawami nekrozy na korzeniach i podstawie łodygi oraz takiej samej liczby obumierających roślin w fazie kwitnienia grochu wzrastającego na glebie w trzecim roku powtarzającej się uprawy. W przypadku wyosobnień *F. oxysporum* ustalono przynależność do f. sp. *pisi* na podstawie badań przeprowadzonych metodą opisaną przez Łasicową (1979). Do zaprawiania nasion użyto materiał mikrobiologiczny z kultur *Trichoderma koningii*, *T. viride*, *Gliocladium catenulatum*, *G. roseum*, *Penicillium vermiculatum*, *Trichothecium roseum* przygotowanych z izolatów uzyskanych z chorych roślin grochu, jakie użyto dla celów diagnostycznych. Sposób przygotowania materiału mikrobiologicznego i jego aplikowania były takie same, jak w badaniach dotyczących *Phaseolus vulgaris* (Łasicowa i Pięta, 1990). Dla każdej kombinacji doświadczenia przeznaczono do badań 100 nasion wkładanych do 4 wazonów napełnionych sztucznie zakażoną ziemią ogrodową. Ponadto uwzględniono dwie kombinacje kontrolne, tj. z zaprawianiem nasion Zaprawą Oxfafun T (2 g preparatu na 1 kg nasion) oraz z nasionami nie zaprawianymi.

WYNIKI BADAŃ

Przeprowadzone badania porażenia roślin wzrastających na polu po dwuletniej uprawie grochu wskazują, że monokultura doprowadziła do nagromadzenia się w glebie materiału infekcyjnego grzybów tzw. „patogenów odglebowych” (tab. 1). Udział poszczególnych gatunków w obrębie wyosobnionych izolatów sugeruje, że największe znaczenie w porażeniu grochu, zwłaszcza ujawniające się w fazie kwitnienia miały grzyby z rodzaju *Fusarium*, a wśród nich *F. oxysporum* f. sp. *pisi* (38%).

W przypadku siewek najczęściej nekrozę korzeni i podstawy łodygi powodowały *F. solani* (18%) i *Rhizoctonia solani* (25%). Przy okazji prowadzonych badań efektywności mikrobiologicznego zaprawiania nasion, można było potwierdzić w kontrolnej serii doświadczenia wazonowego ze sztucznie zakażoną ziemią ogrodową chorobotwórczość grzybów, które w wyniku laboratoryjnej analizy mykologicznej porażonych roślin na polu monokultury uznano za potencjalne patogeny. W kombinacji kontrolnej doświadczenia wazonowego, gdzie stworzono warunki prowokacyjne dla porażania wszystkie testowane grzyby patogeniczne spowodowały zgorzel przedwschodową, obniżając o ponad 50% wschody (tab. 2). Wielkość wskaźników chorobowych, uzyskanych z oceny porażenia trzytygodniowych siewek, wyrosłych w omawianej kombinacji kontrolnej upoważniają do uznania *S. sclerotiorum* (wskaźnik 9,75) i *B. cinerea* (wskaźnik 15,5) za mniej szkodliwe gatunki od pozostałych testowanych grzybów chorobotwórczych, dla których wartości wskaźników chorobowych wahały się od 35,7 do 42,85 (tab. 3).

Wyniki analizy mykologicznej porażonych roślin pobranych z pola monokultury wskazują, że z korzeniami grochu i odcinkami łodyg stykających się z glebą nawiązywały kontakt grzyby saprofityczne o właściwościach antagonistycznych,

Tab. 1. Grzyby wyisobnione z porażonych roślin grochu wzrastającego w warunkach monokultury
Fungi isolated from infected pea plants growing in monoculture

Gatunek grzyba – Species of fungi	Liczba izolatów – Number of isolates					
	Korzeń – Root		Podstawa łodygi – Stem basis		Razem – Total	
	a	b	a	b	a	b
<i>Ascochyta pisi</i> Lib.	–	–	18	10	18	10
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	–	1	16	6	16	7
<i>Fusarium culmorum</i> (W. G. Sm.) Sacc.	7	7	14	11	21	18
<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp. <i>pisi</i>	8	25	14	63	22	88
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	20	9	24	12	44	21
<i>Gliocladium catenulatum</i> Gilman et Abbott	3	2	–	1	3	3
<i>Gliocladium roseum</i> Bainier	1	–	–	1	1	1
<i>Penicillium vermiculatum</i> Dang.	2	2	1	–	3	2
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	28	6	34	7	62	13
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	–	–	5	15	5	15
<i>Trichoderma koningii</i> Oud.	2	1	1	1	3	2
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex F. S. Gray	1	–	–	1	1	1
<i>Trichothecium roseum</i> Link.	2	2	1	–	3	2
Inne gatunki – Other species	23	20	21	23	44	43
Razem – Total	97	75	149	151	246	226

a – sześciotygodniowe siewki

a – 6-week old seedlings

b – rośliny w fazie kwitnienia

b – plants in anthesis

Tab. 2. Liczebność i występowanie porażonych siewek grochu
Number and occurrence of diseased seedlings of pea

Gatunek grzyba antagonistycznego Species of antagonistic fungi	<i>Ascochyta pisi</i>		<i>Fusarium culmorum</i>		<i>Fusarium oxy- sporum</i> f. sp. <i>pisi</i>		<i>Fusarium solani</i>		<i>Rhizoctonia solani</i>		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		<i>Botrytis cinerea</i>	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
<i>T. koningii</i>	21,25 ^b	3,0 ^A	22,0 ^c	3,5 ^A	19,75 ^c	2,25 ^A	19,25 ^c	2,25 ^A	17,0 ^c	2,5 ^A	18,0 ^c	3,5 ^A	18,0 ^c	3,0 ^A
<i>T. viride</i>	22,25 ^b	3,5 ^A	22,0 ^c	3,5 ^A	20,5 ^c	3,0 ^{AB}	19,75 ^c	2,75 ^A	17,5 ^c	3,0 ^{AB}	19,0 ^c	4,0 ^A	18,0 ^c	3,0 ^A
<i>G. catenulatum</i>	21,5 ^b	3,5 ^A	20,5 ^c	2,5 ^A	21,25 ^c	3,5 ^{AB}	20,0 ^c	2,72 ^A	18,25 ^c	3,25 ^{AB}	17,75 ^c	3,75 ^A	17,0 ^c	3,0 ^A
<i>G. roseum</i>	21,5 ^b	4,0 ^A	21,0 ^c	3,5 ^A	21,5 ^c	4,0 ^B	20,25 ^c	3,25 ^A	20,0 ^c	5,0 ^{CD}	17,25 ^c	4,25 ^A	19,0 ^c	4,5 ^{BC}
<i>P. vermiculatum</i>	12,5 ^a	6,0 ^B	13,75 ^b	6,75 ^B	13,75 ^b	7,0 ^C	14,0 ^b	5,5 ^B	9,0 ^b	6,75 ^E	8,0 ^b	4,25 ^A	9,0 ^b	4,5 ^{BC}
<i>Trichoth. roseum</i>	10,25 ^a	7,0 ^{BC}	12,0 ^{ab}	7,5 ^B	11,75 ^a	9,0 ^D	11,0 ^a	7,75 ^C	5,25 ^a	4,5 ^{BC}	4,75 ^a	4,0 ^A	5,0 ^a	4,0 ^B
Zaprawa Oxafun T	21,0 ^b	3,0 ^A	2,5 ^c	3,0 ^A	20,0 ^c	3,0 ^{AB}	20,5 ^c	3,0 ^A	17,5 ^c	3,0 ^{AB}	19,0 ^c	3,5 ^A	18,5 ^c	3,0 ^A
Kontrola – Control	10,0 ^a	8,25 ^C	10,5 ^a	7,5 ^B	11,0 ^a	7,25 ^C	10,25 ^a	9,0 ^c	8,5 ^b	7,0 ^E	8,0 ^b	7,0 ^B	6,0 ^{ab}	5,0 ^C

a – ogólna liczba roślin

a – total number of plants

b – rośliny z objawami chorobowymi na korzeniach i podstawie łodygi

b – plants with symptoms of diseases on roots and stem bases

Średnie różnią się istotnie ($p < 0,05$), jeżeli nie są oznaczone tą samą literą

Means differ significantly ($p < 0.05$) if they are not marked with the same letter

Tab. 3. Wartość wskaźnika chorobowego
Value of disease index

Gatunek grzyba antagonistycznego Species of antagonistic fungi	Kombinacja doświadczenia – Experimental combination						
	<i>A. pisi</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i>	<i>F. solani</i> f. sp. <i>pisi</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>B. cinerea</i>
<i>Trichoderma koningii</i> Oud.	4,6 ^a	3,5 ^a	3,0 ^a	4,5 ^a	2,0 ^a	1,65 ^a	2,0 ^a
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex S. F. Gray	6,7 ^a	3,6 ^a	3,0 ^a	5,4 ^a	2,25 ^a	2,25 ^a	2,0 ^a
<i>Gliocladium catenulatum</i> Gilman et Abbott	8,0 ^a	6,9 ^a	3,15 ^a	7,5 ^a	3,15 ^a	1,90 ^a	2,25 ^a
<i>Gliocladium roseum</i> Bainier	8,0 ^a	8,9 ^a	3,45 ^a	7,5 ^a	5,4 ^{ab}	2,55 ^a	2,40 ^a
<i>Penicillium vermiculatum</i> Dang.	25,0 ^b	19,0 ^b	18,0 ^b	19,0 ^b	11,25 ^{bc}	6,25 ^{ab}	10,85 ^b
<i>Trichothecium roseum</i> Link	35,0 ^c	27,0 ^c	32,0 ^c	34,0 ^c	15,8 ^c	8,85 ^b	17,1 ^c
Zaprawa Oxfafun T	5,2 ^a	3,5 ^a	4,5 ^a	3,6 ^a	2,1 ^a	1,65 ^a	2,0 ^a
Kontrol a– Control	41,3 ^d	35,7 ^d	39,0 ^d	42,0 ^d	42,85 ^d	9,75 ^b	15,5 ^c

Średnie różnią się istotnie ($p < 0,05$), jeżeli nie są oznaczone tą samą literą

Means differ significantly ($p < 0.05$) if they are not marked with the same letter

którym takie uzdolnienia przypisano przy okazji badań nad mikrobiologicznym zaprawianiem nasion *Phaseolus coccineus* (Łasicowa i Pięta 1992). Fakt spotykania antagonistów na podziemnych organach grochu wskazuje, że ta roślina uprawna umożliwia im występowanie w środowisku glebowym.

Wyniki uzyskane z serii badań doświadczenia wazonowego wskazały na różnicowaną efektywność ochronnego działania testowanych grzybów antagonistycznych w stosunku do chorobotwórczych dla grochu. Uwzględniając przyjęte do oceny parametry, największą skuteczność w stosunku do wszystkich patogenów wykazało mikrobiologiczne zaprawianie nasion badanymi gatunkami z rodzajów *Trichoderma* i *Gliocladium* (tab. 2). Bez względu na gatunek grzyba chorobotwórczego liczebność roślin w kombinacjach doświadczenia z zaprawianiem *Trichoderma* spp. i *Gliocladium* spp. była istotnie większa od liczebności w serii kontrolnej z nasionami nie zaprawianymi, a dorównywała liczebności w serii z Zaprawą Oxafun T (tab. 2). Podobna współzależność wystąpiła w przypadku wskaźników chorobowych. U siewek wyrosłych z nasion zaprawianych materiałem mikrobiologicznym *Trichoderma* spp. i *Gliocladium* spp. wielkość wskaźników chorobowych wynosiła odpowiednio od 1,65 do 8,9, a w kombinacji z aplikowaniem na nasiona Zaprawy Oxafun T od 1,65 do 5,2 (tab. 3).

Słabe działanie ochronne w stosunku do testowanych grzybów chorobotwórczych wykazał natomiast materiał mikrobiologiczny przygotowany z *T. roseum* i *P. vermiculatum* (tab. 2). W przypadku tych gatunków zaprawianie nasion grochu materiałem mikrobiologicznym nie wpłynęło istotnie na zwiększenie liczby siewek, a jedynie ograniczyło nekrozę korzeni oraz podstawy łodyg. Wielkość wskaźników chorobowych u siewek z kombinacji zaprawiania nasion *T. roseum* wahała się od 8,8 do 35, *P. vermiculatum* od 6,2 do 25, a w kombinacji kontrolnej bez zaprawiania od 9,75 do 42,8 (tab. 3). Ewidentna efektywność ochronnego działania *Trichoderma koningii*, *T. viride*, *Gliocladium catenulatum* i *G. roseum* przed fitopatogenami odglebowymi potwierdza antagonistyczny charakter tych grzybów i możliwość ich wykorzystywania do ochrony biologicznej (Kirik i Steblynk, 1974; Huang, 1978; Hadar i in., 1984; Sesan, 1988a, 1988b; Papavizas, 1985; Lewis i Papavizas, 1987; Lewis i in., 1990; Harman i in., 1980; Łasicowa i Pięta, 1988, 1990, 1992). W badanym przypadku, uwzględniającym kompleks grzybów odglebowych uszkadzających groch, poprzez używanie do zaprawiania nasion *P. vermiculatum* lub *T. roseum* uzyskuje się podobnie niewielki efekt ochronny, jak u *Phaseolus coccineus* (Łasicowa i Pięta, 1992).

PIŚMIENNICTWO

- Erzurum K., Iren S., 1987. Turkiy'e de Soja fasulyesinde tohumla tasınam önemli hastalıkların etmenlerinin tespiti ve tanımlanması. Doga TU Tar. ve Or.D.11,3: 499-516.
- Hadar Y., Harman G. E., Taylor A., 1984. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *Trichoderma harzianum* from New-York soil for biological control seed rot caused by *Pythium* spp. Phytopathology 74: 106-110.

- Harman G. E., Chet J., Baker R., 1980. *Trichoderma harzianum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70: 1167-1172.
- Harman G. E., Taylor A. G., Stash T. E., 1989. Combining effective strains *Trichoderma harzianum* and solid matrix priming to improve biological seed treatments. Plant Disease, 73, 8: 631-637.
- Huang H. C., 1978. *Gliocladium catenulatum*: hyperparasite of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium* species. Can. J. Bot. 56: 2243-2246.
- Kirik N., Steblynk N., 1974. Ocenha efektywności *Trichoderma koningii* v biologicheshoi borbe s fusarizen gorokha. Mikol. Fitopat. 8,2: 108-112.
- Lewis J. A., Papavizas G. C., 1987. Application *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia damping-off*. Plant pathol. 36: 438-446.
- Lewis J. A., Barksdale T., Papavizas G. C., 1990. Greenhouse and field studies on the biological control of tomato fruit rot caused by *Rhizoctonia solani*. Crop. Protection 9, 1: 8-14.
- Łacicowa B., 1979. Ocena laboratoryjna szczepów *Fusarium oxysporum* f. linii i *Fusarium oxysporum* f. *phaseoli* oraz podatność odmian na porażenie przez te patogeny. Roczn. Nauk Roln., s. E, 9: 113-124.
- Łacicowa B., Pięta D., 1988. Zaprawianie nasion fasoli *Trichoderma* spp. i *Gliocladium* spp. przeciwko niektórym grzybom chorobotwórczym. Roczn. Nauk Roln. s. E, 18,2: 71-84.
- Łacicowa B., Pięta D., 1990. Skuteczność zaprawiania nasion fasoli *Trichoderma koningii* Oud. i *Gliocladium catenulatum* Gilman et Abbott w warunkach zagrożenia chorobowego przez grzyby przeżywające w glebie. Phytopath. Polonica XI: 16-24.
- Łacicowa B., Pięta D., 1992. Microbiological dressing of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) seeds against pathogenic soil fungi. Phytopath. Polonica 3, XV: 10-15.
- Papavizas G. C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 23: 23-54.
- Paulitz T. Z., Ahmad J. S., Baker R., 1990. Integration of *Pythium nunn* and *Trichoderma harzianum* isolate T-95 for the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. Plant Soil 121, 2: 243-250.
- Sesan T., 1988 a. Studial actual al cercetarilor privind combaterea biologica a micozelor cerealelor. Probl. Prot. Plant. XVI, 1: 47-54.
- Sesan T., 1988 b. Studial actual al cercetarilor a micozelor leguminoaselor pentru boabe. Probl. Prot. Plant. XVI,3: 219-236.

SUMMARY

The experiment was conducted in conditions of a growth chamber. To the garden soil used as a substrate for seed germination the infectious material was introduced containing one of the following pathogens: *Ascochyta pisi*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*, depending on the experimental combination. Protective effects of microbiological seed dressing with the preparations containing *Trichoderma koningii*, *T. viride*, *Gliocladium catenulatum*, *G. roseum*, *Penicillium vermiculatum* and *Trichothecium roseum* were examined in relation to the pathogenic fungi. In control combinations, untreated seeds as well as seeds dressed with Zaprawa Oxafun T were taken under consideration. The best protective effect, against all pathogenic fungi tested, similar to the effect of Zaprawa Oxafun T was shown for *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp. (75-94% germination, including 16-32% infected seedling, calculated on the basis of 1-8 disease index values). Much worse germination (23-75%) and worse health status of seedling (40-80% infected plants) were observed in the combinations with *Trichothecium roseum* and *Penicillium vermiculatum* preparations. In these experimental combinations values of disease index ranged from 9 to 43.