

ANTAGONISTIC EFFECT OF *TRICHODERMA VIRIDE* ON PATHOGENIC FUNGI OF THE GENUS *FUSARIUM* IN THE PRESENCE OF BIOPREPARATIONS

Summary

Commonly occurring in nature fungi of the genus *Trichoderma* have strong antagonistic activity against fungi that cause plant diseases. They can inhibit or even fight fungal infections of plants. However fungi of the genus *Fusarium* are a serious problem in agriculture, especially difficult for cereal crops. *Fusarium* spp. causes many diseases of stem base, leaves and ears. In order to compare the effectiveness of the antagonistic effects of fungus *Trichoderma viride* on *Fusarium* pathogens studied *in vitro* using five species of *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae*) isolated from wheat and *Trichoderma viride* isolate. In addition, introduced to experiment three biopreparations: Biochikol 020 PC, Bioczoz BR and Biosept 33 SL and the fungicide Amistar 250 SC. Tested fungi were inoculated in pairs (*T. viride*/*Fusarium* spp.) on sterile PDA medium, in Petri dishes. During the experiment antagonistic effect of *T. viride* on cultures of *Fusarium* spp. was observed. Also was found different impact of biopreparations on tested fungi.

ANTAGONISTYCZNE ODDZIAŁYWANIE *TRICHODERMA VIRIDE* NA PATOGENY Z RODZAJU *FUSARIUM* W OBECNOŚCI BIOPREPARATÓW

Streszczenie

Powszechnie występujące w przyrodzie grzyby z rodzaju *Trichoderma* wykazują silne działanie antagonistyczne wobec grzybów powodujących choroby roślin. Mogą hamować a nawet zwalczać, powodowane przez grzyby, infekcje roślin. Grzyby rodzaju *Fusarium* stanowią poważny problem w rolnictwie, szczególnie dotkliwy dla upraw zbożowych. *Fusarium* spp. są sprawcami wielu chorób powodując m.in. fuzaryjną zgorzel podstawy źdźbła i korzeni, fuzariozę liści i kłosów. W celu porównania skuteczności antagonistycznego oddziaływania *Trichoderma viride* na patogeniczne grzyby rodzaju *Fusarium* przeprowadzono badania *in vitro* wykorzystując pięć gatunków *Fusarium* (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae*) wyizolowanych z pszenicy. Dodatkowo wprowadzono do doświadczenia trzy biopreparaty: Biochikol 020 PC, Bioczoz BR i Biosept 33 SL oraz fungicyd Amistar 250 SC. Testowane grzyby wyszczepiano parami (*Trichoderma viride*/*Fusarium* spp.) na sterylną pożywkę PDA, na płytkach Petriego. W trakcie trwania doświadczenia stwierdzono antagonistyczny wpływ *T. viride* na kultury *Fusarium* spp. oraz zróżnicowane oddziaływanie biopreparatów na testowane grzyby.

1. Wstęp i cel pracy

Grzyby rodzaju *Fusarium* są sprawcami wielu chorób roślin stanowiąc szczególnie dotkliwy problem dla upraw zbożowych. W uprawie pszenicy i innych gatunków zbóż *Fusarium* spp. powodują m.in. fuzaryjną zgorzel podstawy źdźbła i korzeni, fuzariozę liści i fuzariozę kłosów [15]. Straty w plonie zbóż spowodowane ich obecnością dochodzą do kilkudziesięciu procent. Ochrona zasiewów jest zatem konieczna. Ostatnio coraz więcej uwagi poświęca się grzybom antagonistom, które mogą hamować bądź ograniczać rozwój fitopatogenów. Powszechnie występujące w przyrodzie grzyby z rodzaju *Trichoderma* wykazują działanie antagonistyczne wobec grzybów powodujących choroby roślin jednocześnie nie stanowiąc zagrożenia dla systemu korzeniowego. Ponadto *Trichoderma* spp. może stymulować wzrost oraz indukować odporność roślin [16]. W rolnictwie ekologicznym chętnie stosowane są również biopreparaty na bazie związków organicznych, wykorzystywane do zaprawiania materiału siewnego i wykonywania zabiegów opryskiwania roślin.

Celem przeprowadzonego doświadczenia laboratoryjnego było określenie wpływu łącznego zastosowania grzyba antagonisty *Trichoderma viride* i biopreparatu na ograniczenie wzrostu kolonii pięciu gatunków grzybów patoge-

nicznych z rodzaju *Fusarium*.

2. Materiał i metody badań

W badaniach wykorzystano pięć gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium*: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* i *F. poae* wyizolowanych w Zakładzie Mikologii IOR-PIB w Poznaniu z fragmentów podstawy źdźbła pszenicy z objawami choroby. Spośród biopreparatów zastosowano Biochikol 020 PC, Bioczoz BR i Biosept 33 SL. Dla porównania włączono do badań również fungicyd syntetyczny Amistar 250 SC stosowany w ochronie zbóż przed chorobami grzybowymi. Badane środki dodawano do sterylnej pożywki PDA w dawce odpowiadającej zaleceniom w praktyce i następnie wylewano na płytki Petriego (90mm). Testowane grzyby wyszczepiano parami (*T. viride*/*Fusarium* spp.) na przygotowaną wcześniej i zestaloną pożywkę PDA z dodatkiem środka, na płytkach Petriego. W tym celu przenoszono dwa krążki (5mm) z inokulum odpowiedniego grzyba w centrum płytki w odległości 3 cm od siebie. W kombinacji kontrolnej płytki Petriego zawierały pożywkę bez dodatku środka. Dodatkowo wyszczepiono poszczególne gatunki z rodzaju *Fusarium* oraz *T. viride* osobno umieszczając pojedynczo inokulum grzyba w centrum płytki na pożywce PDA z dodatkiem

środku lub bez. Hodowlę prowadzono w temperaturze 21°C. Średnice kolonii grzybów mierzono co dwa dni od momentu inokulacji. Dla każdej kombinacji w doświadczeniu uwzględniono cztery powtórzenia. Do analizy wykorzystano pomiary wykonane po 4 i 14 dniach. Wyniki uzyskane w doświadczeniu opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji trójczynnikowej przy użyciu testu Dunca, na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

3. Wyniki badań i dyskusja

Wpływ grzyba antagonisty *Trichoderma viride* na grzyby patogeniczne z rodzaju *Fusarium* w obecności biopreparatów był zróżnicowany. W pierwszym terminie pomiarów (tab. 1) spośród grzybów chorobotwórczych najsilniej rozrastała się grzybnia *F. culmorum*. Gatunek ten wykazywał zahamowany wzrost pod wpływem *T. viride* z wyjątkiem kombinacji z zastosowaniem biopreparatu Bioczoz BR. Z dodatkiem preparatu Amistar 250 SC grzyb *F. culmorum* rósł tak samo w bikulturze jak i w monokulturze. W kombinacji kontrolnej bez biopreparatu grzyb patogeniczny rozwijał się najsilniej. Kolejnym pod względem intensywności wzrostu grzybni był gatunek *F. graminearum*. Preparat Bioczoz BR nie powodował hamowania wzrostu tego gatunku. Natomiast w pozostałych kombinacjach grzyb *T. viride* zahamował wzrost *F. graminearum*. Najwyraźniej uwidocznili się to w kombinacji z *T. viride* bez dodatku biopreparatu. Trzecim w kolejności ocenianym grzybem pod względem dynamiki wzrostu był gatunek *F. poae*. Istotne ograniczenie jego wzrostu w relacji z *T. viride* stwierdzono w kontroli i z dodatkiem fungicydu Amistar 250 SC. W pozostałych kombinacjach obecność *T. viride* nie miała wpływu na wzrost grzyba patogenicznego. Zależność wzrostu grzyba *F. avenaceum* od *T. viride* była nieistotnie zróżnicowana, a zastosowanie preparatu Amistar 250 SC wpłynęło niekorzystnie na działanie antagonisty. W pierwszym terminie pomiarów najsłabiej rosnącym grzybem patogenicznym w doświadczeniu było *F. oxysporum*. Podobnie jak dla większości rozpatrywanych gatunków *Fusarium* dodatek biopreparatu Bioczoz BR pogorszył oddziaływanie *T. viride*. W kombinacji kontrolnej grzyb antagonisty ograniczył wzrost tego patogena. W pozostałych kombinacjach jego oddziaływanie było neutralne dla *F. oxysporum*.

W końcowym terminie pomiarów (tab. 2), tak jak w początkowym, stwierdzono podobne zależności rozwoju grzybni patogenów rodzaju *Fusarium* od *T. viride* w obecności biopreparatów i preparatu Amistar 250 SC. Najszybciej z badanych gatunków rozwijała się grzybnia *F. culmorum*. Jej rozwój tak jak poprzednio był silnie zahamowany przez grzyba antagonistę, z wyjątkiem kombinacji z dodatkiem Bioczozu BR. W przypadku *F. graminearum* również Bioczoz BR pogorszył oddziaływanie *T. viride*, a Biochikol 020 PC nie zmienił jego wpływu na wzrost tego patogena. W pozostałych kombinacjach odnotowano hamujące oddziaływanie *T. viride* na *F. graminearum*. Brak wpływu Bioczozu BR i antagonisty stwierdzono dla grzyba *F. poae*. W pozostałych kombinacjach z tym gatunkiem patogenicznym nastąpiło zahamowanie jego wzrostu. Szczególnie uwidocznili się to w kontroli, w której stosowano tylko *T. viride*. Również w przypadku grzyba *F. avenaceum* preparat Bioczoz BR nie hamował wzrostu jego grzybni. W przypadku pozostałych biopreparatów nastąpiło ograniczenie rozwoju kolonii patogena na skutek obecności

T. viride. Tak jak w pierwszym terminie pomiarów najsłabiej rozwijającym się grzybem było *F. oxysporum*, którego zahamowanie wzrostu stwierdzono we wszystkich kombinacjach z wyjątkiem tej z dodatkiem Bioczozu BR. Zwiększa biopreparat Biosept 33 SL ograniczał wzrost kolonii tego patogena. Jest to zgodne ze stwierdzeniem Orlikowskiego [3], że Biosept 33 SL wprowadzony do gleby obniża liczebność kolonii *F. oxysporum*. Stwierdzono, że w obecności *T. viride* szczególnie słabo rozrastała się grzybnia badanych gatunków fitopatogenów rodzaju *Fusarium* w kombinacji kontrolnej. Jedynie dodanie preparatu Biosept 33 SL zwiększało istotnie oddziaływanie *T. viride*. Potwierdzają to obserwacje Karkachi i in. [1], Rajeswari i Kannabiran [12], Sahi i Khalid [13], którzy stwierdzili, że sam grzyb z rodzaju *Trichoderma* bardzo silnie ogranicza wzrost *F. oxysporum*. Również Popiel i in. [11] dowiedli, że różne gatunki z rodzaju *Trichoderma*, a szczególnie *T. viride* są silnymi antagonistami w porównaniu do grzybów patogenicznych *F. culmorum* i *F. graminearum*. Jednak w rozpatrywanej pracy spośród badanych pięciu gatunków grzybów, dwa ww. odznaczały się mimo wszystko najsilniejszym wzrostem grzybni w obecności antagonisty *T. viride*.

W przeprowadzonym doświadczeniu potwierdzono obserwację Myśkowska [2], że zahamowaniu wzrostu jednych mikroorganizmów towarzyszy silny rozwój drugich. Podobnego zdania są Pięta i Patkowska [9], Pięta i in. [8], Pięta [6]. Stwierdziły one, że liczne występowanie antagonistów w uprawnym środowisku glebowym skutecznie wpływa na ograniczenie obecności fitopatogena. Średnia wartość dla biopreparatów w obu terminach pomiarów potwierdziła najkorzystniejsze oddziaływanie Bioseptu 33 SL. Patkowska i Pięta [4], Pięta i in. [10], Pięta [6,7] uzyskały bardzo pozytywny efekt zaprawiania nasion różnych gatunków roślin biopreparatami Biosept 33 SL oraz Biochikol 020 PC na ograniczenie porażenia tych roślin przez *F. culmorum* i *F. oxysporum*. Porażenie roślin przez te patogeny było dwukrotnie mniejsze niż w kontroli. Również Patkowska [5] stwierdziła, że preparat Biochikol 020 PC korzystnie wpływał na oddziaływanie grzyba z rodzaju *Trichoderma* ograniczającego wzrost patogena *F. oxysporum*. Pięta [6] w badaniach polowych stwierdziła największą liczebność gatunków grzybów z rodzaju *Trichoderma* w kombinacji z Biochikolem 020 PC, a w dalszej kolejności z Bioseptem 33 SL. Wyniki uzyskane przez ww. autorów odnośnie korzystnego oddziaływania Biochikolu 020 PC na ograniczenie rozwoju grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz zwiększenie liczebności kolonii *Trichoderma* spp. nie potwierdziły się tym doświadczeniu. Jednak były to badania laboratoryjne, a nie polowe, gdzie na aktywność pożytecznych i chorobotwórczych mikroorganizmów wpływa wiele dodatkowych czynników, między innymi warunki środowiska.

W innych badaniach Pięta [7] stwierdziła największą liczebność kolonii grzybów antagonistów w glebie po zastosowaniu Bioseptu 33 SL, nie badała jednak wtedy Biochikolu 020 PC. Preparat Amistar 250 SC tylko w początkowym okresie wzrostu grzybów polepszał istotnie działanie *T. viride*, a w późniejszym terminie nie różnił się od kontroli. Jednak polepszał istotnie wzrost *T. viride* w monokulturze. Pokrywa się to z obserwacją Sarkar i in. [14], którzy stwierdzili, że preparat Amistar 250 SC najmniej ograniczał wzrost grzyba *T. harzianum*. Najniższą średnią uzyskano dla biopreparatu Bioczoz BR, którego dodanie pogarszało oddziaływanie grzyba antagonisty.

Tab. 1. Średnica kolonii w poszczególnych kombinacjach po 4 dniach
 Table 1. The diameter of colonies in different combinations after 4 days

Preparat /Preparation	F. avenaceum		F. culmorum		F. graminearum		F. oxysporum		F. poae		Średnia dla preparatu /Mean for preparation
	bikultura z T. viride /biculture with T. viride	osobno /separately	bikultura z T. viride /biculture with T. viride	osobno /separately	bikultura z T. viride /biculture with T. viride	osobno /separately	bikultura z T. viride /biculture with T. viride	osobno /separately	bikultura z T. viride /biculture with T. viride	osobno /separately	
Biochikol 020 PC	22,3 j-1	23,0 kl	36,0 t	40,3 v	34,0 s	38,0 u	30,0 qr	31,0 r	27,0 mn	26,0 m	30,8 d
Biozos BR	27,3 m-o	26,7 mn	40,3 v	38,0 u	43,0 w	27,0 mn	20,7 h-j	14,0 bc	29,7 p-r	30,3 qr	29,7 c
Biosept 33 SL	12,7 b	13,3 b	21,0 ij	24,0 l	23,7 kl	28,0 n-p	6,0 a	5,3 a	14,0 bc	14,0 bc	16,2 a
Amistar 250 SC	18,0 ef	16,0 d	45,0 x	46,0 x	24,0 l	29,0 o-q	19,0 f-h	20,0 g-i	28,0 n-p	31,0 r	27,6 b
Kontrola /Control	18,3 e-g	20,0 g-i	37,0 tu	82,0 y	17,0 de	40,0 v	15,3 cd	20,0 g-i	22,0 jk	33,7 s	30,5 d
Średnia dla Fusarium spp. /Mean for Fusarium spp.	19,8 b		41,0 e		30,4 d		18,1 a		25,6 c		
Średnia dla T. viride w bikulturze /Mean for T. viride in biculture											25,3 a
Średnia dla T. viride w monokulturze /Mean for T. viride in monoculture											28,7 b

Tab. 2. Średnica kolonii w poszczególnych kombinacjach po 14 dniach
 Table 2. The diameter of colonies in different combinations after 14 days

Preparat /Preparation	F. avenaceum		F. culmorum		F. graminearum		F. oxysporum		F. poae		Średnia dla preparatu /Mean for preparation
	bikultura z T. viride /biculture with T. viride	osobno /separately	bikultura z T. viride /biculture with T. viride	osobno /separately	bikultura z T. viride /biculture with T. viride	osobno /separately	bikultura z T. viride /biculture with T. viride	osobno /separately	bikultura z T. viride /biculture with T. viride	osobno /separately	
Biochikol 020 PC	48,0 l	53,0 n-p	86,0 w	90,0 x	55,0 p	54,7 p	35,0 hi	43,0 k	29,0 f	34,0 h	52,8 c
Biozos BR	62,0 r-t	51,0 mn	90,0 x	90,0 x	83,0 v	61,0 q-s	52,0 m-o	54,0 op	62,7 st	63,3 t	66,9 d
Biosept 33 SL	26,0 e	28,0 ef	36,7 ij	38,0 j	32,0 g	44,0 k	10,0 a	12,0 b	19,0 c	23,0 d	26,9 a
Amistar 250 SC	26,0 e	47,0 l	60,3 qr	90,0 x	28,3 f	36,0 h-j	27,7 ef	50,0 m	32,0 g	67,0 u	46,4 b
Kontrola /Control	22,0 d	62,0 r-t	37,0 ij	90,0 x	17,0 c	53,0 n-p	17,3 c	59,3 q	22,0 d	90,0 x	47,0 b
Średnia dla Fusarium spp. /Mean for Fusarium spp.	42,5 b		70,8 e		46,4 d		36,0 a		44,2 c		
Średnia dla T. viride w bikulturze /Mean for T. viride in biculture											40,6 a
Średnia dla T. viride w monokulturze /Mean for T. viride in monoculture											55,3 b

Wpływ preparatu chemicznego Amistar 250 SC był podobny do wyniku otrzymanego w kontroli. Średnia wartość pomiarów kolonii dla grzyba *T. viride* w bikulturze z patogenami z rodzaju *Fusarium*, tak w pierwszym, jak i ostatnim terminie pomiarów, była niższa niż w monokulturze. Świadczy to o wzajemnym ograniczaniu wzrostu grzybów chorobotwórczych i antagonisty w obecności biopreparatów.

4. Wnioski

1. Najskuteczniej ograniczał wzrost grzybnia badanych gatunków z rodzaju *Fusarium* biopreparat Biosept 33 SL.
2. Najsilniej rozrastała się grzybnia *F. culmorum*, a najsłabiej *F. oxysporum* zarówno w bikulturze z *T. viride*, jak i monokulturze.
3. Antagonista *T. viride* w większości kombinacji ograniczał rozwój grzybów patogennych.

5. Literatura

- [1] Karkachi N.E., Gharbi S., Kihal M., Henni J.E.: Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* isolated from algerian tomato by *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* and *Trichoderma harzianum*. Res. J. Agron., 2010, 4(2), s. 31-34.
- [2] Myśków W.: Związek między aktywnością biologiczną gleby a jej żyznością i urodzajnością. Biologiczne metody podnoszenia żyzności i urodzajności gleb. Mat. Szkol., Puławy, 1989, s. 51-53.
- [3] Orlikowski L. B.: Effect of grapefruit extract on development of *Phytophthora cryptogea* and control of root rot of gerbera. J. Plant Prot. Res., 2001, 41 (3), s. 84-90.
- [4] Patkowska E., Pięta D.: Introductory studies on the use of biopreparations and organic compounds for seed dressing of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). Folia Univ. Agric. Stetin., Agricultura, 2004, 239 (95), s. 295-300.
- [5] Patkowska E.: The effect of biopreparations on the formation of rhizosphere microorganism populations of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.). Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus, 2005, 4 (2), s. 89-99.
- [6] Pięta D.: The use of Biosept 33 SL, Biochikol 020 PC and Polyversum to control soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) diseases against pathogens. Part I. Healthiness and yielding of soybean after using biopreparations. Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus, 2006, 5 (2), s. 35-41.
- [7] Pięta D.: Wpływ wybranych biopreparatów na zbiorowiska mikroorganizmów w glebie ryzosferowej grochu, fasoli zwykłej i fasoli wielokwiatowej. Annales UMCS sectio EEE, Lublin, 2006, vol. XVI, s. 73-84.
- [8] Pięta D., Pastucha A., Patkowska E.: The use of antagonistic microorganisms in biological control of bean diseases. Hortic.Veget. Grow., 2003, 22(3), s. 401-406.
- [9] Pięta D., Patkowska E.: Antagonistic bacteria and fungi limiting potato infection by soil-borne pathogenic fungi. J. Plant Prot. Res., 2003, 43(2), s. 97-104.
- [10] Pięta D., Patkowska E., Pastucha A.: The protective effect of biopreparations applied as the dressing for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and pea (*Pisum sativum* L.). Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus, 2005, 4 (2), s. 59-67.
- [11] Popiel D., Kwaśna H., Chelkowski J., Stepień Ł., Laskowska M.: Impact of selected antagonistic fungi on *Fusarium* species – toxigenic cereal pathogens. Acta Mycol., 2008, 43 (1), s. 29-40.
- [12] Rajeswari P., Kannabiran B.: *In vitro* effects of antagonistic microorganisms on *Fusarium oxysporum* (Schlecht. Emend. Synd & Hans) infecting *Arachis hypogaea* L. J. Phytol., 2011, 3 (3), s. 83-85.
- [13] Sahi I. Y., Khalid A. N.: *In vitro* biological control of *Fusarium oxysporum* – causing wilt in *Capsicum annuum*. Myco-path., 2007, 5 (2), s. 85-88.
- [14] Sarkar S., Narayanan P., Divakaran A., Balamurugan A., Premkumar R.: The *in vitro* effect of certain fungicides, insecticides, and biopesticides on mycelial growth in the bio-control fungus *Trichoderma harzianum*. Turk. J. Biol., 2010, 34, s. 399-403.
- [15] Weber R.: Zagrożenie i sposoby ograniczania chorób fuzaryjnych pszenicy. Postępy Nauk Rolniczych 2, s. 19–31, 2007.
- [16] Wojtkowiak-Gębarowska E.: Mechanizmy zwalczania fitopatogenów glebowych przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*. Post. Mikrobiol., 2006, 45 (4), s. 261–273.