

Katedra Fitopatologii i Entomologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
ul. Prawocheńskiego 17, 10-957 Olsztyn, Poland

Urszula Wachowska

Środki ochrony roślin jako antropopresja na zbiorowiska grzybów
ryzosfery pszenicy ozimej

Anthropopression of plant protection chemicals on fungal communities colonising
winter wheat rhizosphere

ABSTRACT. Two series of pot experiments were carried out in 2000-2001. The experiment was established using the method of randomized blocks in 4 replications. The object of the experiment was Elena cultivar winter wheat in the reproduction phase protected chemically with fungicides: Amistar 250SC and Bravo 500SC and plant resistance stimulator: Bion 50WG with doses recommended by the producers. Water-treated plants were the control combination. After 48 hours, 10 days and 20 days, the number of the population of rhizosphere colonising bacteria: *Bacillus*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – hydrolysing bacteria and *Actinomycetales* was analysed. Species composition and the number of fungal colonies were also monitored. The aim of the study was to determine changes occurring in bacterial and fungal populations colonising winter wheat rhizosphere after the application of chemical protection agents. The number of *Bacillus* rhizobacteria and the $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – hydrolysing bacteria colonising plant root system, 48 hours after spraying with a plant resistance stimulator Bion 50WG was considerably lower than in the control combination. After 10 days, however, it was significantly higher than in the control combination. Bacteria representing the genera of *Pseudomonas* and *Azotobacter* were not sensitive to the application of chemical agents. The number of species of fungal populations colonising the rhizosphere of chemically protected winter wheat was fewer than in the control combinations. Additionally, chemical plant protection reduced the number of fungal populations representing the genera of *Fusarium* and *Trichoderma*, especially in the initial periods of the observation.

KEY WORDS: rhizosphere, wheat, fungicide, bacteria, fungi

Ryzosfera, opisana po raz pierwszy przez Hiltnera w roku 1904, jest przykroczeniową strefą intensywnej aktywności mikrobiologicznej [Pai i in. 2001]. Drobnoustroje zasiedlające ten mikroekosystem wyselekcjonowane są pod wpływem wydzielin korzeniowych, tworząc specyficzne zespoły drobnoustrojów, dostarczające roślinom składników odżywczych [Płaskowska 1997]. Bakterie z rodzaju *Azotobacter* są grupą wolno żyjących bakterii glebowych, które wiążą azot atmosferyczny i włączają go do obiegu w biosferze [Pozo i in. 2000]. Bakterie hydrolizujące fosforan trójwapniowy udostępniają fosfor roślinom. Bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, *Bacillus* zasługują na uwagę ze względu na produkcję substancji promujących wzrost roślin oraz antybiotyków ograniczających aktywność patogenów glebowych [Benizri i in. 1995; Siddiqui i in. 1999]. Dzięki swym właściwościom mogą być wykorzystywane do ochrony roślin przed chorobami [Saniewska, Orlikowski 1994; Walsh i in. 2001].

Aktywność drobnoustrojów ryzosferowych zależy od bardzo wielu czynników, między innymi typu gleby, jej zasobność, pH, wilgotności, a także od gatunku i wieku rośliny [Grayston i in. 1998]. Jednym z ważniejszych czynników antropogenicznych kształtujących skład wydzieliny korzeniowej jest stosowanie zabiegów chemicznych środkami ochrony roślin. Modyfikacja ta pociąga za sobą ilościowe i jakościowe zmiany w zespołach drobnoustrojów glebowych [Siddiqui i in. 1999; Pozo C. i in. 2000; Rodgers-Gray, Shaw 2001].

Preparat Bion 50 WG zawiera acibenzolan-S-metylowy, akumulujący się w komórkach rośliny [Cole 1999]. Związek ten można uznać za syntetyczny elicytor, który po 7–10 dniach uruchamia genetyczny naturalny mechanizm obronny rośliny jeszcze przed zetknięciem się z patogenem. Fungicyd Amistar 250 SC (azoxystrobina) działa w mitochondriach komórek grzybów, blokując mechanizm produkcji energii, czego wynikiem jest zatrzymanie rozwoju patogena [Perez i in. 2002]. Fungicyd Bravo 500 SC (chlorotalonil), stosowany z powodzeniem od kilku lat, zakłóca przemiany energetyczne u grzybów [Sigler, Turco 2002]. Celem przeprowadzonych badań było określenie zmian zachodzących w populacjach bakterii i grzybów zasiedlających ryzosferę pszenicy ozimej pod wpływem fungicydów Bravo 500SC, Amistar 250SC oraz stymulatora odporności roślin Bion 50WG.

METODY

W latach 2000–2001 przeprowadzono dwie serie doświadczeń wazonowych. Eksperyment założono w układzie całkowicie losowym w wazonach o średnicy 30 cm w czterech powtórzeniach. Przedmiotem badań była pszenica ozima odmiany Elena. Pod koniec krzewienia wykonano opryskiwanie środkami ochrony roślin w dawkach zalecanych przez producentów. Zastosowano fungicydy Ami-

star 250SC i Bravo 500SC oraz stymulator odporności roślin Bion 50WG. Kontrolę stanowiły rośliny opryskiwane wodą.

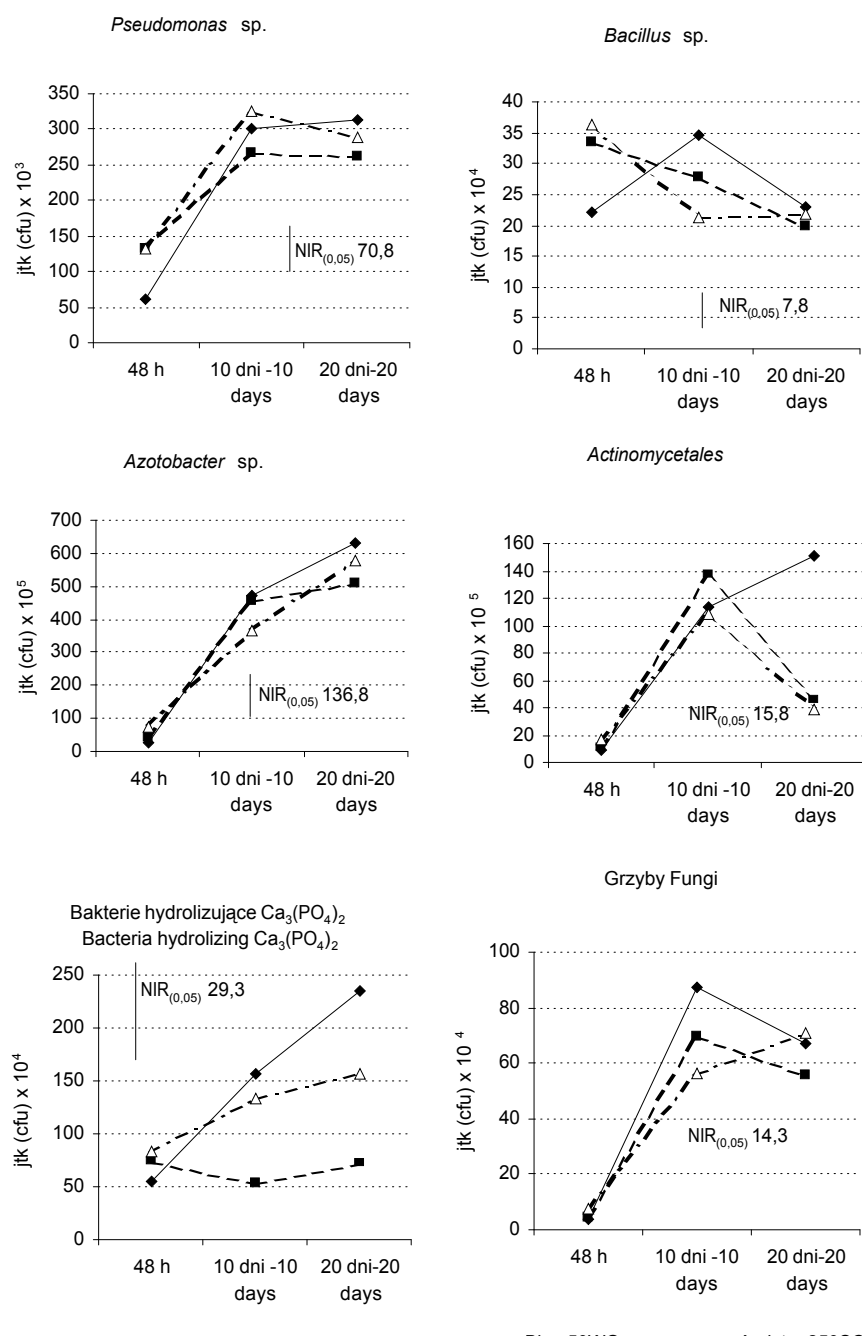
Do analizy mikrobiologicznej pobierano korzenie z bryłą gleby 48 godzin, 10 dni i 20 dni po zabiegu ochronnym. Badania mikrobiologiczne ryzosfery przeprowadzono zgodnie z metodyką opracowaną przez Martyniuka i in. [1991]. Z każdej kombinacji wycinano po 10 gramów korzeni wraz z przylegającą do nich glebą (ryzosferą). Próby umieszczono w kolbach wypełnionych 90 ml sterylnej wody. Kolby wytrząsano przez 30 minut w wytrząsarce stołowej typ 358 S. Otrzymana zawiesina stanowiła pierwsze rozcieńczenie glebowe. Kolejne rozcieńczenia otrzymano, przenosząc 1 cm³ roztworu glebowego do próbek z 9 cm³ sterylnej wody. Odpowiednie rozcieńczenia roztworu glebowego nanoszono po 0,1 cm³ na płytkę Petriego i zalewano pożywkami ochłodzonymi do 40°C.

Zastosowano następujące podłoża [Martyniuk i in. 1991]: podłoże Martina do izolacji grzybów, podłoże agarowe bez azotu, do izolacji bakterii z rodzaju *Azotobacter*, agar odżywczy do izolacji bakterii z rodzaju *Bacillus*, podłoże do izolacji bakterii hydrolizujących Ca₃(PO₄)₂ przygotowane według wskazówek Pikowskiej, podłoże Williama-Daviesa do izolacji promieniowców, podłoże King B do izolacji bakterii z rodzaju *Pseudomonas* [Martyniuk i in. 1991]. Wyrastające kolonie liczono kilkakrotnie do momentu ustalenia się ich liczby na płytkach Petriego. Dane, po przeliczeniu na liczbę jednostek tworzących kolonie (jtk) w 1 gramie świeżej masy gleby, poddano analizie wariancji (ANOVA). Dodatkowo z płytek odszczepiono na skosy agarowe kolonie grzybów strzępkowych. Skosy inkubowano w ciemności. Wyrastające kolonie grzybów oznaczono, wykorzystując dostępne klucze i monografie przy użyciu mikroskopu świetlnego.

WYNIKI

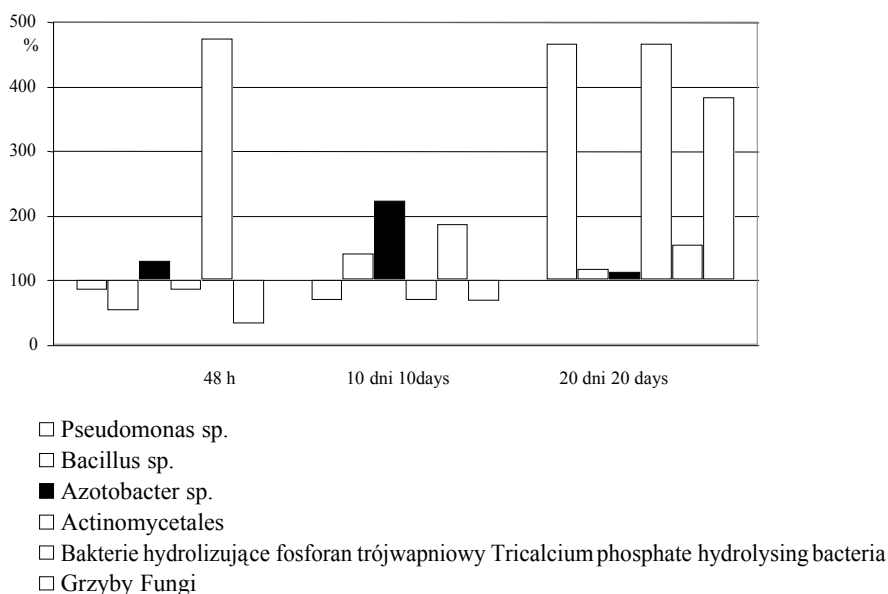
W przeprowadzonych badaniach bakterie z rodzaju *Pseudomonas* pojawiały się licznie, w jednym gramie świeżej masy gleby stanowiły od 61 do 325 × 10³ komórek bakteryjnych (ryc. 1). W 48 godzin po wykonaniu zabiegu ochronnego stymulatorem odporności roślin Bion 50WG liczebność populacji bakterii z rodzaju *Pseudomonas* uległa znacznej redukcji. Obserwowana różnica między tą kombinacją a kontrolną była statystycznie istotna. Późniejsze terminy obserwacji potwierdziły doniesienia o małej wrażliwości bakterii z rodzaju *Pseudomonas* na fungicydy [Thirup i in. 2001].

Bakterie z rodzaju *Bacillus* wystąpiły dość licznie, w jednym gramie świeżej masy gleby stwierdzono od 19,8 do 36,4 × 10⁴ jednostek tworzących kolonie (ryc. 1). W ryzosferze roślin po 48 godzinach od zabiegu ochronnego stymulato-



Rycina 1. Drobnoustroje uzyskane z ryzosfery pszenicy ozimej chronionej i niechronionej chemicznie
 Figure 1. Microorganisms colonising rhizosphere of winter wheat protected and unprotected

rem odporności roślin Bion 50WG odnotowano matematycznie istotnie mniej komórek bakteryjnych niż w kontroli. Po 10 dniach od opryskiwania roślin tym preparatem bakterie z rodzaju *Bacillus* rozwijały się bardzo intensywnie, ich liczebność przewyższała o ponad 60% liczebność populacji bakterii w kombinacjach kontrolnych. Kierunek oddziaływania fungicydu Amistar 250SC był podobny, jednak zdecydowanie słabszy i statystycznie nieistotny. Po 20 dniach od zabiegu liczebność populacji bakterii z rodzaju *Bacillus* wracała do poziomu kontroli.



Rycina 2. Drobnoustroje uzyskane z ryzosfery chronionej fungicydem Bravo 500SC i niechronionej (% kontroli)

Figure 2. Microorganisms colonizing rhizosphere of winter wheat protected of fungicide Bravo 500SC and unprotected (% control)

Wśród ryzobakterii dominującą pozycję zajmują bakterie z rzędu *Actinomycetales*. W jednym gramie świeżej masy gleby stwierdzono od $8,5$ do $151,5 \times 10^5$ komórek bakteryjnych należących do tego rzędu (ryc. 1). W zasadzie nie odnotowano statystycznie istotnych różnic między liczebnością populacji promieniowców w kombinacjach chronionych chemicznie i niechronionych. Jedynie w trzecim terminie obserwacji stymulator odporności roślin Bion 50WG stymulował rozwój bakterii. W tej kombinacji liczebność populacji bakterii była pra-

<i>Paecilomyces marquandi</i> (Messeo) Hughes																			2				1									1	4	
<i>Paecilomyces variati</i> Bain																																		
<i>Paecilomyces</i> sp.	1																																1	
<i>Penicillium</i> spp.	1	1	2					1	1		10	1	7	2												1	1	1	5	5	1	1	41	
<i>Phialophora fastigiata</i> (Lagerberg et Melin) Conant											1																							1
<i>Pseudocrotalaria</i> sp.																																		1
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bann.																																		1
<i>Scopulariopsis</i> sp.										1																								1
<i>Stachybotrys</i> sp.										1																								1
<i>Trichoderma aureovirideae</i> Rifai									1																									13
<i>Trichoderma hamatum</i> (Bon.) Bann.								1																										25
<i>Trichoderma hamatum</i> Rifai										2	1																							13
<i>Trichoderma longii</i> Qad.										1																								5
<i>Trichoderma puberulum</i> Webster & Rifai						7		1	1		1																							13
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link ex Pers.) Rifai						5		2	3		1																							12
<i>Trichoderma</i> sp.																																		2
<i>Zygorhynchus</i> sp.												1																						2
Grzyby drożdżopodobne	4		10																															21
Grzyby rzeszardrukujące	4		4						1		4	1	2	3																			19	
Razem Total	25	15	26	3	20	8	5	26	17	4	1	2	12	21	12	14	9	11	18	2	25	10	20	4	5	296								

wie czterokrotnie większa niż w kombinacji kontrolnej. Potwierdziło to doniesienia Thirupa i in. [2001] o stymulacyjnym działaniu niektórych środków ochrony roślin na te mikroorganizmy.

Bakterie z rodzaju *Azotobacter* okazały się mało wrażliwe na zmiany w składzie wydzielin korzeniowych zachodzące pod wpływem środków ochrony roślin (ryc. 1). Liczebność tych bakterii rosła wraz z wiekiem rośliny i była na poziomie kontroli.

W ryzosferze pszenicy ozimej chronionej fungicydem Amistar 250SC po 10 dniach od zabiegu ochronnego bakterie hydrolizujące fosforan trójwapniowy rozwijały się zdecydowanie gorzej niż w kombinacjach kontrolnych (ryc. 1). Kierunek oddziaływania preparatu Bion 50 WG okazał się przeciwny i słabszy, dopiero po dwudziestu dniach od zabiegu siła oddziaływania tego preparatu dorównywała sile oddziaływania fungicydu Amistar 250SC.

Podobnie jak w badaniach wcześniejszych [Thriup i in. 2001] po dziesięciu dniach od zabiegu ochronnego zbiorowisko grzybów było liczniejsze niż w kombinacji kontrolnej (ryc. 1). Po 20 dniach liczebność tego zbiorowiska wracała do poziomu kontroli w przypadku Bionu 50WG lub ulegała redukcji w przypadku fungicydu Amistar 250SC.

Redukująca siła oddziaływania fungicydu Bravo 500SC była duża w stosunku do bakterii z rodzaju *Bacillus* i grzybów oraz niewielka w stosunku do bakterii z rodzaju *Pseudomonas* i z rzędu *Actinomycetales* (ryc. 2). Bakterie z rodzaju *Azotobacter* oraz hydrolizujące fosforan trójwapniowy były niewrażliwe na stosowany fungicyd.

Zbiorowisko strzępkowych grzybów ryzosferowych okazało się urozmaicone i dość liczne (tab. 1). Łącznie uzyskano 296 kolonii grzybów należących do 43 rodzajów i gatunków oraz grzyby drożdżopodobne i niezarodnikujące. Gatunkami dominującymi były grzyby z rodzaju *Trichoderma*, w literaturze opisywane jako antagoniści patogenów roślin [El-Kazzaz i in. 2002]. W przedstawionych badaniach stanowiły one 27,4% ogółu kolonii. W ryzosferze pszenicy ozimej chronionej fungicydami Amistar 250SC, Bravo 500SC oraz stymulatorem odporności roślin Bion 50WG, gatunki te pojawiały się rzadziej niż w kombinacjach kontrolnych. Tendencja ta utrzymywała się przez cały okres obserwacji w przypadku preparatu Bravo 500SC.

Na uwagę zasługiwały również gatunki z rodzaju *Fusarium*, w literaturze uznawane za gatunki patogeniczne dla roślin [Płaskowska 1997]. Stanowiły one 10,1% ogółu uzyskanych kolonii. Najczęściej uzyskiwanymi gatunkami były *F. oxysporum*, *F. solani* oraz *F. avenaceum*. Opryskiwanie roślin fungicydem Amistar 250SC doprowadziło do ograniczenia liczby wyosobnień. Zjawisko to obserwowano w drugim terminie obserwacji (tab. 1)

W badaniach wszystkie testowane środki ochrony roślin, zwłaszcza w dwóch pierwszych terminach obserwacji, prowadziły do ograniczenia liczby gatunków strzępkowych grzybów zasiedlających ryzosferę pszenicy ozimej. Dane te potwierdziły wcześniejsze doniesienia o ujemnym wpływie chemizacji rolnictwa na bioróżnorodność drobnoustrojów zasiedlających glebę [Pai i in. 2001].

WNIOSKI

1. Ryzobakterie z rodzaju *Pseudomonas* i *Azotobacter* okazały się niewrażliwe na zastosowane środki ochrony roślin
2. Bakterie hydrolizujące fosforan trójwapniowy rozwijały się zdecydowanie gorzej w ryzosferze pszenicy ozimej chronionej fungicydem Amistar 250SC.
3. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* i *Fusarium* pojawiały się rzadziej w zbiorowiskach grzybów ryzosferowych pszenicy ozimej chronionej chemicznie niż w uprawie pszenicy nie chronionej.

PIŚMIENNICTWO

- Benizri E., Courtade A., Guckert A. 1995. Fate of two microorganisms in maize stimulated rhizosphere under hydroponic and sterile conditions. *Soil Biol. Biochem.* 27, 1, 71–77.
- Cole D.L. 1999. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protection* 18, 267–273.
- El-Kazzaz M.K., Badr M.M., El-Zahaby H.M., Gouda M.I. 2002. Biological control of seedling damping-off and root rot of sugar beet plants. *Plant Protect. Sc.* 38, 645–647.
- Grayston S.J., Wang S., Cambell C.D., Edwards A.C. 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 30, 3, 369–378.
- Martyniuk S., Masiak D., Stachyra A., Myśków W. 1991. Populacje drobnoustrojów strefy korzeniowej różnych traw i ich antagonizm w stosunku do *Gaeumannomyces graminis v. tritici*. *Pam. Puł.* 98, 139–144.
- Paszkowski W.L. 1998. Zależność pomiędzy stopniem zasiedlenia korzeni przez *Fusarium* a zbiorowiskami i właściwościami innych grup drobnoustrojów ryzosfery owsa., *Zeszyty Naukowe AR we Wrocławiu, Konferencje* 18, 332, 93–101.
- Perez L., Hernandez A., Hernandez L., Perez M. 2002. Effect of trifloxystrobin and azoxystrobin on the control of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on banana and plantain. *Crop Protection* 21, 17–23.
- Pląskowska E. 1997. The fungi communities of the soil environment of *Triticum aestivum* and its forecrops: *Hordeum vulgare*, *Vicia faba* spp. minor and *Trifolium pretense*. *Acta Mycologica* 32, 2, 265–274.
- Pai S.G., Riley M.B., Camper N.D. 2001. Microbial degradation of mefenoxam in rhizosphere of *Zinnia angustifolia*. *Chemosphere* 44, 577–582.

- Pozo C., Martinez-Toledo M.V., Salmeron V., Rodelas B., Gonzalez-Lopez J. 2000. Effects of benzidine and benzidine analogues on the growth and nitrogenase activity of *Azotobacter*. *Applied Soil Ecology* 14, 183–190.
- Rodgers-Gray B.S., Shaw M.W. 2001. The effect of incorporating straw or manure into the soil on the natural microflora of winter wheat. *Plant Pathology* 50, 537–545.
- Saniewska A., Orlikowski L.B. 1994. Możliwość wykorzystania *Bacillus* sp., izolat S13 w ochronie gerbery przed *Phytophthora cryptogea*. Materiały z V konferencji sekcji biologicznych metod ochrony roślin przed chorobami Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego, Skierniewice, 60–64.
- Siddiqui I.A., Shaukat S.S., Enteshamul-Haque S., Khan S.A.J. 1999. Effect of systemic fungicides on the efficacy of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) migula in the control of root-infecting fungi of wheat. *Acta Agrobotanica* 53, 2, 39–46.
- Sigler W.V., Turco R.F. 2002. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Soil Ecology* 21, 107–118.
- Thirup L., Johnsen K., Torsvik V., Spliid N.H., Jacobsen C.S. 2001. Effects of fenpropimorph on bacteria and fungi during decomposition of barley roots. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1517–1524.
- Walsh U.F., Morrissey J. P., O’Gara F. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 289–295.