

THE EFFECT OF PRP SOL FERTILIZER ON THE DYNAMICS OF PHYTOPATHOGENIC AND ANTAGONISTIC FUNGI GROWTH *IN VITRO*

Summary

Under conditions *in vitro* the effect of PRP SOL fertilizer on linear growth of the investigated phytopathogenic fungi colony in the first place depended on the fungus species and concentration of the fertilizer applied in the culture medium. Independently of the applied concentration, the strongest fungistatic effect of PRP SOL was observed on *Fusarium sporotrichoides*, for which a significant inhibition of surface growth was registered on the level of 25.38% and on *Sclerotinia sclerotiorum* (32.68%). A weaker inhibitory influence of the tested fertilizer was noted on *Phoma exiqua*. Applied field doses (2.0 and 1.0 mg/cm³) of PRP SOL fertilizer markedly inhibited linear growth of *Trichoderma harzianum* saprophytic fungus by 19% and 10.11% respectively. Among the tested phytopathogenic fungi *F. solani* var. *coeruleum* revealed the best resistance. Surface development of this species colony on the media with the participation of the tested fertilizer was stimulated within the range from 33.99 to 35.88%. *F. sulphureum* and *F. poae* fungi revealed a similar but much weaker response. On the other hand a variable response was registered for *F. culmorum*. Higher concentration of PRP SOL contributed to a limited growth of its mycelium of 10.1% whereas the lower one significantly enhanced surface hyphae growth.

ODDZIAŁYWANIE NAWOZU PRP SOL NA DYNAMIKĘ WZROSTU GRZYBÓW FITOPATOGENNYCH I ANTAGONISTYCZNYCH W WARUNKACH *IN VITRO*

Streszczenie

W warunkach *in vitro* oddziaływanie nawozu PRP SOL na wzrost liniowy kolonii badanych grzybów fitopatogennych zależało przede wszystkim od gatunku grzyba oraz zastosowanej koncentracji nawozu w podłożu hodowlanym. Niezależnie od zastosowanego stężenia stwierdzono najsilniejsze fungistatyczne oddziaływanie PRP SOL w odniesieniu do *Fusarium sporotrichoides*, dla którego odnotowano istotne zahamowanie rozrostu powierzchniowego na poziomie 25,38% i *Sclerotinia sclerotiorum* (32,68%). Słabsze oddziaływanie inhibicyjne testowany nawóz wykazywał na gatunek *Phoma exiqua*. Zastosowane dawki połowe (2,0 i 1,0 mg/cm³) nawozu PRP SOL istotnie ograniczały wzrost liniowy saprofitycznego grzyba *Trichoderma harzianum*, odpowiednio o 19% i 10,11%. Spośród testowanych grzybów pasożytniczych największą odpornością odznaczał się *F. solani* var. *coeruleum*. Rozwój powierzchniowy koloni tego gatunku na podłożach z udziałem badanego nawozu był stymulowany w zakresie od 33,99 do 35,88%. Podobną, ale znacznie słabszą reakcję wykazały grzyby *F. sulphureum* i *F. poae*. Natomiast zmienną reakcję odnotowano w przypadku *F. culmorum*. Wyższa koncentracja PRP SOL przyczyniała się do ograniczenia rozrostu jego grzybni o 10,1%, podczas gdy niższa istotnie wzmacniała rozrost powierzchniowy strzępek.

1. Wprowadzenie

Stosowanie różnych form nawożenia roślin wpływa na wzrost lub wygląd roślin, a tym samym na ich odporność na czynniki infekcyjne. W uprawach konwencjonalnych dopuszcza się wspomaganie rozwoju roślin poprzez stosowanie dolistnego dokarmiania. Liczni autorzy donoszą, że aplikowanie nalistne nawozów skutecznie ogranicza nasilenie występowania chorób roślin warzywniczych i sadowniczych [1, 6, 8, 9, 16, 17, 18]. Niestety w rolnictwie ekologicznym nie dopuszcza się stosowania tej formy nawożenia roślin. Ponadto w tym systemie uprawy dużym problemem jest zapanowanie nad zdrowotnością roślin. Ograniczenie nawożenia mineralnego oraz zakaz stosowania syntetycznych fungicydów znacznie pogarszają zdrowotność roślin, a tym samym ich jakość. W takiej sytuacji dużą szansą na poprawienie jakości roślin w gospodarstwach ekologicznych jest nowoczesny nawóz PRP@SOL. Nawóz ten zgodnie ze „Świadectwem kwalifikacji produktu” z dnia 5 lipca 2005 roku może być stosowany w rolnictwie ekologicznym. Pod względem chemicznym to zbilansowana mieszanka minerałów sporządzona na bazie specyficznych

środków wapnujących węglanu wapnia i magnezu. Według informacji producenta nawóz ten poprawia właściwości biologiczne gleby, sprzyja rozwojowi fauny glebowej oraz bezpośrednio wpływa na ilość mikroorganizmów. Ważnym etapem oceny wpływu nawozów na zdrowotność roślin jest badanie ich bezpośredniego oddziaływania na organizmy fitopatogenne w warunkach laboratoryjnych.

Celem pracy była ocena *in vitro* wpływu nawozu PRP SOL na rozrost liniowy i morfologię polifagicznych grzybów chorobotwórczych: *Fusarium culmorum*, *F. poae*, *F. sporotrichoides*, *F. sulphureum*, *F. coeruleum*, *Phoma exiqua*, *Sclerotinia sclerotiorum* oraz antagonistycznego gatunku *Trichoderma harzianum*.

2. Materiał i metody badań

Pierwszym etapem badań była izolacja grzybów z suchognijących bulw ziemniaka. Bulwy z objawami suchej zgnilizny oczyszczono powierzchniowo pod bieżącą wodą. Następnie przecięto sterylnym skalpelem w miejscu zmian chorobowych. Z pogranicza tkanki zdrowej i chorej pobierano 5 mm wycinki, dezynfekowano je przez zanurzenie na

30 sekund w 50% roztworze etanolu, opłukiwano w sterylnej wodzie destylowanej i osuszano na bibule. Po czym w komorze szczepień materiał wykładano po 5 sztuk na podłoże hodowlane glukozowo-ziemniaczane PDA (Potato Dextrose Agar) w płytkach Petriego o średnicy 100 mm. Hodowlę prowadzono w komorze klimatyzacyjnej przez 10 dni w temperaturze 23°C. Pojawiające się kolonie grzybów sukcesywnie odczczepiano na skosy. Następnie dokonano obserwacji makro- i mikroskopowych, na podstawie których identyfikowano grzyby do gatunku posługując się kluczami mikologicznymi i opracowaniami monograficznymi [5, 12, 13, 14, 15]. Na podstawie liczby uzyskanych izolatów danego gatunku grzyba ustalono częstotliwość występowania poszczególnych gatunków i wyrażono ją w procentach w odniesieniu do liczby wszystkich izolatów (100%).

W drugim etapie badań oceniono aktywność biotyczną nawozu PRP SOL w ograniczeniu wzrostu liniowego grzybni gatunków wyizolowanych. W tym celu posłużono się metodą zatrutych podłoży [11]. Nawóz PRP SOL stosowano w dwóch stężeniach 1,0; 2,0 mg/cm³. Kontrolę stanowiły płytki Petriego z pożywką PDA bez udziału nawozu. Eksperyment wykonano w 5 powtórzeniach. Na podstawie codziennych pomiarów przyrostów kolonii grzybów wyliczono indeks tempa wzrostu liniowego testowanych gatunków grzybów posługując się poniższym wzorem.

$$T = \frac{A}{D} + \frac{b_1}{d_1} + \dots + \frac{b_x}{d_x}$$

T – indeks tempa wzrostu liniowego,
A – średnia z pomiarów średnicy kolonii grzyba w mm,
D – czas trwania doświadczenia,
b₁, ... b_x – przyrost średnicy kolonii w mm,
d₁, ... d_x – liczba dni od ostatniego pomiaru.

Fungistatyczną aktywność nawozu PRP SOL oceniono na podstawie zahamowania wzrostu kolonii grzyba obliczonego za pomocą wzoru Abbotta [2].

$$I = \frac{K - A}{K} \cdot 100\%$$

Współczynnik zahamowania - stymulacji wzrostu wg wzoru Abbotta

I - współczynnik zahamowania – stymulacji,
K - średnia średnica kolonii grzyba na płytce kontrolnej,
A - średnia średnica kolonii grzyba w danym obiekcie badawczym,
Indeks tempa wzrostu powierzchniowego grzybni

Uzyskane wyniki badań poddano obliczeniom statystycznym metodą analizy wariancji z zastosowaniem testu Duncana przy poziomie istotności $\alpha=0,05$.

3. Wyniki badań i ich omówienie

W wyniku analizy mikologicznej bulw ziemniaka z objawami suchej zgnilizny uzyskano łącznie 86 izolaty grzybów (tab. 1). Wśród wyosobnionych grzybów fitopatogennych dominowały gatunki należące do rodzaju *Fusarium*, które stanowiły 79,07% ogólnej populacji izolowanych mikroorganizmów. W obrębie tego rodzaju taksonomicznego wyszczególniono pięć gatunków, przy czym z największą częstotliwością wystąpiły *F. culmorum* (20,94%) i *F. sulphureum* (19,76%). Spośród grzybów fitopatogennych notowano również dużą częstotliwość występowania rodzaju *Phoma* reprezentowanego przez *Phoma exiqua* (9,30%) oraz najniższy udział *Sclerotinia sclerotiorum*. Natomiast przedstawicielem grzybów antagonistycznych był *Trichoderma harzianum*, którego izolowano rzadziej niż gatunki patogeniczne. Wyizolowane w doświadczeniu gatunki grzybów to organizmy polifagiczne, które oprócz ziemniaka atakują wiele gatunków roślin uprawnych i ozdobnych. Szczególnie duże szkody wyrządzają grzyby z rodzaju *Fusarium*, które atakują rośliny we wszystkich fazach rozwojowych począwszy od wschodów aż po zbiór i okres przechowalniczy [4, 3, 10]. Duża liczba porażanych gatunków roślin oraz powszechnie występujące źródła infekcji w glebie oraz różnorodność powodowanych chorób i ich patogenyza decydują o ogromnym znaczeniu *Fusarium* spp. Grzyby te powodują fuzaryjne wędniecie, zgorzele siewek i łodyg oraz zgnilizny różnych organów roślin. Podobnie dużą patogennością odznacza się *S. sclerotiorum*, który jest sprawcą zgnilizny twardzikowej występującej głównie na warzywach korzeniowych, ogórku, pomidorze, roślinach przemysłowych, takich jak: słonecznik, rzepak i konopie. Siedliskiem dla wyosobnionych w doświadczeniu grzybów jest gleba, zachodzące w niej wszelkie zmiany fizykochemiczne niewątpliwie wpływają na populację mikroorganizmów.

Przeprowadzone badania laboratoryjne pozwoliły określić bezpośredni wpływ nawozu PRP SOL o składzie 32%-CaO i 8%-MgO na dynamikę wzrostu grzybów testowych. Jednocześnie uzyskane wyniki badań nie dają podstaw do jednoznacznego ustalenia oddziaływania PRP SOL na organizmy grzybowe. Każdy bowiem badany gatunek grzyba odmiennie reagował na dodatek do podłoża hodowlanego nawozu oraz jego stężenie.

Tab. 1. Gatunki grzybów zasiedlające bulwy ziemniaka
Table 1. The fungal species colonizing potato tubers

Lp. No.	Gatunek grzyba <i>Fungal species</i>	Liczba izolatów <i>Number of isolates</i>	Procent <i>Per cent</i>
1.	<i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Sacc.	18	20,94
2.	<i>Fusarium sulphureum</i> Schlecht.	17	19,76
3.	<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i> (Sacc) Booth.	14	16,28
4.	<i>Fusarium poae</i> (Peck) Wollenw.	10	11,63
5.	<i>Fusarium sporotrichoides</i> Sherbakoff	9	10,46
6.	<i>Phoma exiqua</i> Desm.	8	9,30
7.	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	6	6,97
8.	<i>Trichoderma harzianum</i> (Bon.) Bain	4	4,66
Suma - Sum		86	100

Weber i Wyrwa [19] donoszą, że oddziaływanie nawozów na organizmy grzybowe w warunkach *in vitro* w dużej mierze zależy nie tylko od rodzaju i dawki samego preparatu nawozowego, ale od odczynu podłoża hodowlanego. Powszechny jest również pogląd, że grzyby mikroskopowe mogą rozwijać się w szerokim zakresie odczynu środowiska, przy czym optymalne pH dla większości z nich mieści się w przedziale od 5 do 7. W badaniach własnych pH podłoża kontrolnego PDA bez udziału badanego nawozu wynosiło 6,44, z kolei stężenie PRP SOL 2,0mg/cm³ zwiększało tę wartość do 6,98, a przy 1,0mg/cm³ pH było na poziomie 6,63. Zastosowane stężenia testowanego nawozu (odpowiadające dawkom połowym) w niewielkim zakresie zmieniały więc odczyn podłoża.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że spośród patogenicznych gatunków grzybów najbardziej wrażliwymi na testowany nawóz były: *F. sporotrichoides*, *S. sclerotiorum* oraz *P. exiqa*. Odzwierciedlają to wyliczone indeksy tempa wzrostu liniowego ich grzybni (tab. 2). Nawóz PRP SOL zastosowany w stężeniach 2,0 i 1,0mg/cm³ istotnie wpływał na zmniejszenie tempa rozrostu powierzchniowego kolonii tych gatunków. Przy czym w odniesieniu do *F. sporotrichoides*, *S. sclerotiorum* silniejsze fungistatyczne oddziaływanie notowano na pożywce z udziałem wyższej koncentracji badanego nawozu, wiernie oddają to współczynniki zahamowania wzrostu (rys. 1). W porównaniu do obiektów kontrolnych rozrost liniowy mycelium tych grzybów był hamowany odpowiednio na pożywce z udziałem 2,0mg/cm³ o 39,18% i 37,22%. Natomiast przy niższej koncentracji nawozu w podłożu rozrost kolonii *F. sporotrichoides* był ograniczony w 31,58%, a *S. sclerotiorum* w 28,14%. *T. harzianum* będący grzybem antagonistycznym wykazał podobną reakcję na PRP SOL i jego stężenia jak wyżej wymienione gatunki patogeniczne (tab. 2, rys. 1). W porównaniu do wcześniej analizowanych gatunków znacznie mniejszą aktywność fungistatyczną badany nawóz wykazał w odniesieniu do *P. exiqa*. Ponadto w tym przypadku obserwowano istotnie wolniejsze tempo wzrostu jego strzępek na podłożu zawierającym niższe stężenie PRP SOL niż przy wyższym i jednocześnie dwukrotnie wyższą wartość współczynnika zahamowania wzrostu (tab. 2, rys. 1). Spośród testowanych grzybów *F. culmorum* odznaczał się największą zmiennością reakcji na zastosowane stężenia nawozu PRP SOL. Na pożywce z udziałem 2,0mg/cm³ nawozu obserwowano istotne ograniczenie tempa rozrostu powierzchniowego jego kolonii i hamowanie na

poziomie 10,10% (tab. 2, rys. 1). Podczas gdy 1,0mg/cm³ stężenie przyczyniało się do istotnej stymulacji wzrostu liniowego grzybni *F. culmorum*. Wyniki te są zbieżne z wcześniej przeprowadzonymi badaniami, w których nawóz dolistny zawierający wapń zastosowany w dawce 1,0mg/cm³ hamował rozwój *F. culmorum*, z kolei niższe dawki sprzyjały wzrostowi kolonii [7].

Ponadto w przeprowadzonych badaniach na podłożach z PRP SOL obserwowano istotną stymulację tempa wzrostu powierzchniowego kolonii grzybów: *F. solani* var. *coeruleum*, *F. sulphureum* i *Fusarium poae* (tab. 2, rys. 1). Szczególnie zaś intensywne przyrosty liniowe zaznaczyły się dla gatunku *F. solani* var. *coeruleum*. Na podłożach z udziałem badanego nawozu średnica jego kolonii była średnio o 34,93% większa niż w kontroli (rys. 1). Słabszą stymulację rozrostu strzępek grzybni pod wpływem nawozu PRP SOL obserwowano u *F. sulphureum*. Poza tym jedynie najwyższa z badanych koncentracji PRP SOL istotnie wpływała na wzrost tempa wzrostu liniowego *Fusarium poae*.

W przeprowadzonym doświadczeniu zwracano również uwagę na zmiany zachodzące w morfologii grzybów testowych pod wpływem nawozu doglebowego PRP SOL (rys. 2 a-f). Najczęściej dotyczyły one struktury grzybni powietrznej, natomiast rzadziej zmian zabarwienia rewersu i awersu kolonii grzybów. Na ogół tam gdzie testowany nawóz ograniczał przyrosty grzybni obserwowano rozluźnienie strzępek powietrznych (rys. 2 a-c). Z kolei w przypadku obserwowanej stymulacji wzrostu kolonii grzybni była bardziej zbita i wzniesiona (rys. 2 d-f). W okresie postinkubacji dla *S. sclerotiorum* na podłożu z udziałem 2,0mg/cm³ nawozu stwierdzono brak sklerot, które naturalnie wystąpiły w obiekcie kontrolnym.

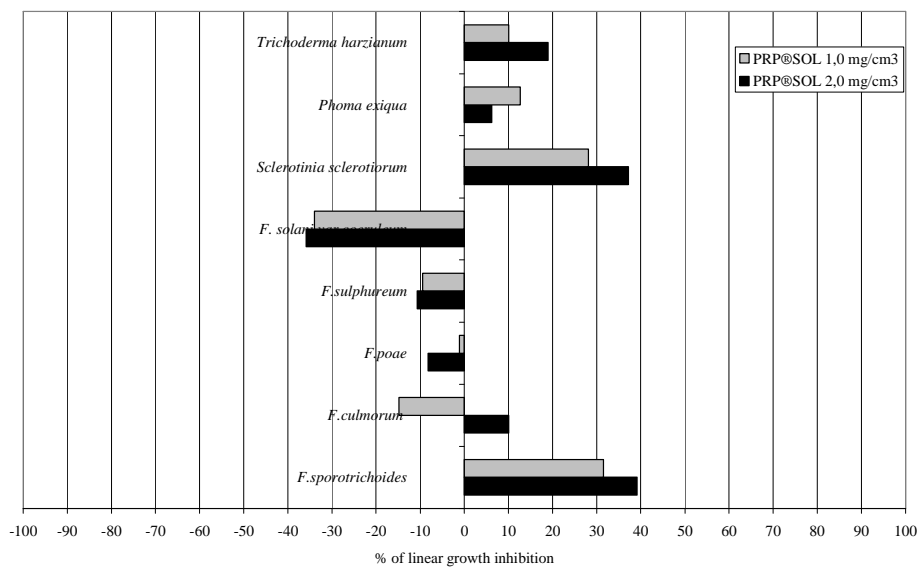
Wykazane w badaniach *in vitro* fungistatyczne oddziaływanie nawozu PRP SOL na ważne w fitopatologii rolniczej gatunki takie jak *S. sclerotiorum* czy *P. exiqa*, dają podstawy do przeprowadzenia szerszych badań w tym zakresie. Istnieje potrzeba wykonania eksperymentów polowych, w których należałoby ocenić wpływ nowoczesnego nawozu PRP SOL na zdrowotność różnych gatunków roślin oraz na siedlisko grzybów glebowych, bowiem w agrocenozach istnieje złożony układ powiązań wielu czynników, które wzajemnie oddziałują na siebie. Z wstępnych i niepublikowanych wyników badań autorów wynika, że analizowany nawóz korzystnie wpływa na plonowanie zbóż oraz sprzyja ich zdrowotności.

Tab. 2. Wpływ PRP SOL na tempo wzrostu liniowego grzybów testowych
Table 2. Effect of PRP SOL on linear growth rate of tested fungi

Obiekt Objects	Indeks tempa wzrostu [T] / Growth rate index [T]							
	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	<i>Fusarium poae</i>	<i>Fusarium sulphureum</i>	<i>Fusarium solani</i> var. <i>coeruleum</i>	<i>Phoma exiqa</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>
Stężenie Concentration PRP SOL [mg/cm ³]								
2,0	29,58 a *	70,25 a	72,62 b	77,70 b	50,88 b	37,53 b	63,06 a	50,35 a
1,0	33,94 b	81,00 c	68,00 a	76,80 b	49,20 b	35,53 a	71,25 b	52,37 b
Kontrola Control	55,87 c	74,25 b	67,44 a	70,03 a	42,45 a	42,50 c	95,87 c	57,16 c

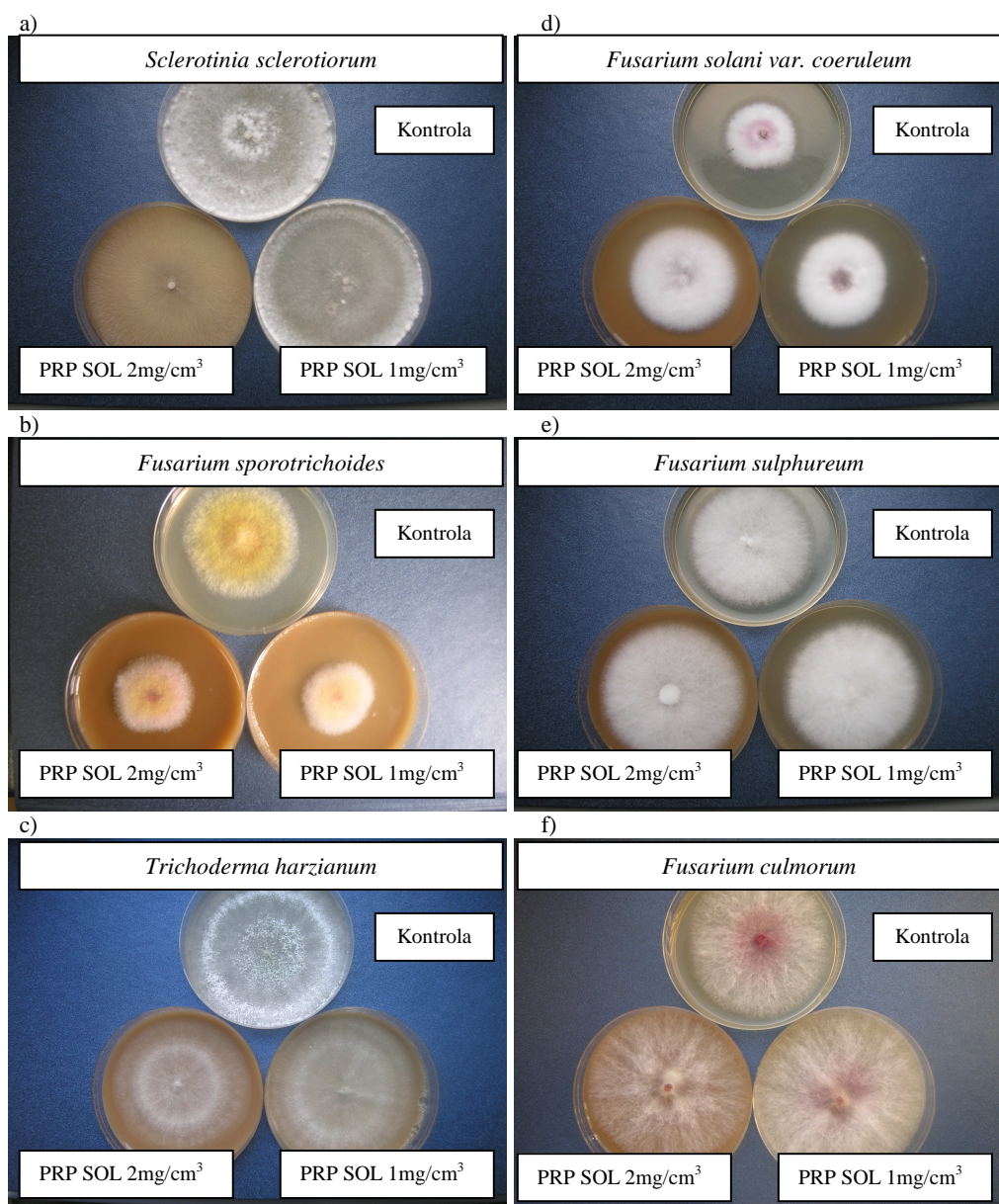
*wartości w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie

* values in columns marked with the same letters dont differ significantly



Wartości ujemne oznaczają stymulację wzrostu liniowego / Negative values denote stimulation of linear growth

Rys. 1. Wpływ nawozu PRP SOL na wzrost liniowy grzybów testowych
Fig. 1. Influence of PRP SOL fertilizers on linear growth of tested fungi



Rys. 2. Morfologia grzybów testowych / Fig 2. Morphology of tested fungi

4. Wnioski

1. W warunkach *in vitro* oddziaływanie nawozu PRP SOL na wzrost liniowy kolonii badanych grzybów fitopatogennych zależał przede wszystkim od gatunku grzyba oraz zastosowanej koncentracji nawozu w podłożu hodowlanym.
2. Niezależnie od zastosowanego stężenia PRP SOL wykazał najsilniejsze fungistatyczne oddziaływanie w odniesieniu do *F. sporotrichoides* (istotne zahamowanie rozrostu powierzchniowego na poziomie 35,38%) i *Sclerotinia sclerotiorum* (32,68%). Nieznaczne (9,46%), ale istotne ograniczenie wzrostu liniowego odnotowano dla *Phoma exigua*.
3. Nawóz PRP SOL aplikowany do podłoża hodowlanego w stężeniach 2,0 i 1,0 mg/cm³ szczególnie sprzyja istotnemu rozrostowi powierzchniowemu kolonii gatunku pasożytniczego *F. solani* var. *coeruleum* oraz ogranicza wzrost *T. harzianum*.

5. Literatura

- [1] Boligłowa E.: Wpływ dolistnego dokarmiania ziemniaka na plon jego strukturę, zdrowotność i trwałość przechowalniczą bulw. *Acta Agrophysica*, 2003, 85, 99-106.
- [2] Borecki Z.: Fungicydy stosowane w Ochronie Roślin. Warszawa: PWN, 1984.
- [3] Borecki Z.: Nauka o chorobach roślin. PWRiL, 2001.
- [4] Cook R. J.: *Fusarium: Diseases, biology and taxonomy*. The Pensylv. St. Univ. Press., Park and London, 1981.
- [5] Domsch K.H., Gams W., Anderson T.H.: *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, (London), 1980.
- [6] Gleń K. Evaluation of foliar fertilizers for horse radish (*Armoracia rusticana Gaertn.*) protection against fungal diseases. *Ecological Chemistry and Engineering*, 2008, Vol. 15; No. 45, 331-336.
- [7] Gleń K. 2008. Comparison of Foster and Wapnovit foliar fertilizers effect in phytopathogenic fungi of genus *Fusarium*. *Ecological Chemistry and Engineering*, Vol. 15, No. 1-2, 47-54.
- [8] Gleń K.: Wpływ nawożenia dolistnego na plonowanie oraz porażenie chrzanu (*Armoracia rusticana Gaertn*) przez *Verticillium dahliae* i *Phoma lingam*. *Progress in Plant Protection*, 2009, Vol. 49, No. 4, 2047-2051.
- [9] Jabłoński K., Bernat E.: Wpływ dolistnego nawożenia Mikrosolem Zn na kształtowanie się plonu ziemniaka i jego jakość oraz możliwość ograniczenia stosowania fungicydów do zwalczania zarazy ziemniaka. *Progress in Plant Protection*, 2001, Vol. 41, No. 1, 299-305.
- [10] Kochman J., Węgorek W.: *Ochrona roślin*, Kraków: Plantpress, 1997, 364-370.
- [11] Kowalik R., Krechniak E.: Szczegółowa metodyka biologicznych laboratoryjnych badań środków grzybobójczych. 63-66. W: „Materiały do Metodyki Biologicznej Oceny Środków Ochrony Roślin” (W. Węgorek, red.) Inst. Ochr. Roślin, Poznań, 1961.
- [12] Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P. *Flora Polska, Grzyby (Mycota)*, tom XXII, Sierpik (*Fusarium*). PAN, Warszawa-Kraków, 1991, 137 ss.
- [13] Marcinkowska J.: Oznaczanie Rodzajów Grzybów Ważnych w Patologii Roślin. Fundacja Rozwój SGGW, 2003. 328 ss.
- [14] Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O.: *Fusarium species*. The Pennsylvania State University Press. University Park and London, 1983, 193 ss.
- [15] Pidopliczko H. M.: *Griby-parazyty kulturowych rastienij*. Tom 3. Naukowaja Dumka, 1978, 230 ss.
- [16] Piszczek J.: Wpływ dokarmiania dolistnego preparatami Bor-nit i Tytanit na zdrowotność i jakość buraka cukrowego. *Progress in Plant Protection*, 2001, Vol. 41, No. 1, 306-311.
- [17] Urban H. W.: Ertrage optimieren durch gezielte Blattdüngung. *Kartoffelbau*, 1997, 4, 132-134.
- [18] Sawicka B.: Wpływ łącznego stosowania agrochemikaliów na tempo szerzenia się *Phytophthora infestans* na roślinach ziemniak. *Acta Agrophysica*, 2003, 85, 157-167.
- [19] Weber Z., Wyrwa P. Wpływ nawozu dolistnego Bonga na wzrost czterech gatunków grzybów *in vitro*. *Rocz. Akad. Roln. Poznań, Roln.*, 1993, 42 (247), 133-137.