

## OCENA SKUTECZNOŚCI DROŹDZY *AUREOBASIDIUM PULLULANS*, *DEBARYOMYCES HANSENII* I *RHODOTORULA GLUTINIS* W OGRANICZENIU SEPTORIOZY PASKOWANEJ LIŚCI PSZENICY (*ZYMOSEPTORIA TRITICI*)

Urszula Wachowska<sup>✉</sup>, Adrian Duba, Klaudia Goriewa, Marian Wiwart  
UWM w Olsztynie, Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa

**Streszczenie.** Grzyb *Zymoseptoria tritici*, sprawca septoriozy paskowanej liści, jest jednym z najgroźniejszych patogenów pszenicy między innymi z powodu bardzo długiego okresu inkubacji w tkankach roślin (faza bezobjawowa trwa nawet 10 dni) oraz bardzo szybkiego tempa rozprzestrzeniania się na plantacji, a także trudności w jego zwalczaniu metodami chemicznymi. Jedną z naturalnych metod ograniczenia rozwoju tego patogenu jest uprawa odmian o mniejszej podatności na infekcję. Alternatywą jest także poszukiwanie skutecznych biologicznych metod ochrony. Doświadczenia polowe prowadzono w dwóch lokalizacjach w północno-wschodniej Polsce na dwóch odmianach *Triticum aestivum* ('Tonacja' i 'Skagen') i jednej *T. durum* ('Komnata'). Celem badań była ocena skuteczności zabiegów biologicznych polegających na opryskiwaniu roślin zawiesiną drożdży *Aureobasidium pullulans*, *Debaryomyces hansenii* i *Rhodotorula glutinis* w ograniczeniu objawów septoriozy paskowanej liści pszenicy. Odmiana Komnata charakteryzowała się mniejszą podatnością na infekcje liści *Z. tritici* niż odmiany Skagen i Tonacja. Skuteczność zabiegów biologicznych w ograniczeniu objawów septoriozy paskowanej liści odmiany Tonacja oszacowano na poziomie 59,3% dla izolatu *A. pullulans* oraz 56,7% dla *D. hansenii*. Zabiegi biologiczne nie miały istotnego wpływu na plonowanie pszenicy.

**Słowa kluczowe:** *Aureobasidium pullulans*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula glutinis*, septorioza paskowana liści, *Triticum aestivum*, *T. durum*

### WSTĘP

Septorioza paskowana liści powodowana przez *Zymoseptoria tritici* może zmniejszyć plony pszenicy o 30–50%, a 70% kosztów chemicznej ochrony pszenicy związane jest ze zwalczaniem tej choroby [Leroux i in. 2007, Rodrigo i in. 2015]. Wszystkie odmiany pszenicy ozimej są podatne na infekcje patogenem, który rozprzestrzenia się epidemicznie przy

---

<sup>✉</sup>urszula.wachowska@uwm.edu.pl

dużej wilgotności powietrza [Eriksen i Munk 2003, Mirzwa-Mróz i in. 2005]. Do ochrony liści pszenicy ozimej przed *Z. tritici* stosuje się najczęściej dwie kategorie fungicydów: strobilurynowe i azolowe. Fungicydy strobilurynowe zastosowano po raz pierwszy w 1996 roku i już po kilku latach stosowania odnotowano w Europie występowanie izolatów *Z. tritici* z mutacją genu *cytb*, warunkującą odporność na te fungicydy [Fraaije i in. 2005, Mavroudi i Shaw 2005, Leroux i in. 2007, Torriani i in. 2008, Curvers i in. 2015]. Mutacje genu *cyp51* zmieniają też wrażliwość tego patogenu na fungicydy azolowe [Leroux i in. 2007]. Metody biologiczne mogłyby stanowić uzupełnienie zabiegów fungicydowych, niestety w Europie dotychczas stosowanych jest tylko kilkanaście biopreparatów [Gerbore i in. 2014]. Biopreparaty dopuszczone do komercyjnego stosowania zawierają przede wszystkim bakterie (głównie rodzaju *Bacillus*), grzyby strzępkowe (najczęściej rodzaju *Trichoderma*) i przedstawiciel królestwa Chromista (klasy Oomycetes), *Pythium oligandrum*. Drożdże *Aureobasidium pullulans*, *Candida oleophila* i *Pseudozyma flocculosa* zawarte w trzech biologicznych środkach ochrony roślin stosowane są w kilku europejskich krajach [Gerbore i in. 2014]. Celem badań była ocena skuteczności zabiegów biologicznych polegających na opryskiwaniu roślin zawiesiną drożdży *A. pullulans*, *Debaryomyces hansenii* i *Rhodotorula glutinis* w ograniczeniu objawów septoriozy paskowanej liści pszenicy ozimej.

## MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia poletkowe prowadzono w 2016 roku w dwóch lokalizacjach północno-wschodniej Polski, w Bałcynach (53,60°N, 19,85°E) i Bałdach (53,59°N, 20,61°E). Założono je w układzie losowanych bloków. W eksperymencie zlokalizowanym w Bałcynach pszenicę ozimą odmian Skagen (*T. aestivum*) i Komnata (*T. durum*) wysiano na poletka o powierzchni 9 m<sup>2</sup>. Rośliny chroniono trzykrotnie w okresie wegetacji w fazach BBCH 31 (faza pierwszego kolanka), BBCH 55 (kłoszenie) oraz BBCH 65 (pełnia kwitnienia) [Witzenberger i in. 1989]. Opryskiwanie roślin wykonano opryskiwaczem plecakowym (Marolex, Titanic 12, Polska) w godzinach popołudniowych, w dni bezwietrzne i pochmurne, w temperaturze 15–25°C. Do opryskiwania zastosowano zawiesinę komórek izolatu *D. hansenii* (w fazach BBCH 31 i BBCH 65) lub *Rhodotorula glutinis* (w fazie BBCH 55), których kolonie zmyto z podłoża glukozowo-ziemniaczanego (PDA, Merck, Polska) po 96 godzinach wzrostu. Komórki po odwirowaniu (20 min, 4000 g) zostały wprowadzone na nośnik stały (mąka kukurydziana drobnoziarnista) w proporcji 1 : 2, po czym całość wysuszono w suszarce laboratoryjnej (Sup100W, Polska) w temperaturze 25°C. Po wprowadzeniu drożdży do opryskiwacza zawiesina miała gęstość 0,4·10<sup>5</sup> (*R. glutinis*) lub 2,5·10<sup>5</sup> (*D. hansenii*) komórek w 1 cm<sup>3</sup> wody. Gęstość zawiesiny komórek określono w hemocytometrze Bürkera. W drugiej lokalizacji pszenicę ozimą odmiany Tonacja (*T. aestivum*) wysiano na poletka o powierzchni 1 m<sup>2</sup>. Rośliny chroniono trzykrotnie w okresie wegetacji w fazach BBCH 31, BBCH 55 oraz BBCH 65, stosując gatunki *A. pullulans* lub *D. hansenii*. Zawiesiny komórek izolatów drożdży uzyskano, zmywając 250 cm<sup>3</sup> sterylnej wody 96-godzinne kolonie drożdży rosnące na podłożu PDA. Przed użyciem zawiesinę rozcieńczono w 750 cm<sup>3</sup> wody, a zabieg wykonano z użyciem opryskiwacza ręcznego (Marolex, Master 1000, Polska). Stężenie komórek drożdży wynosiło 2·10<sup>5</sup> w 1 cm<sup>3</sup> wody. W obu doświadczeniach kontrolę stanowiły poletka niechronione.

Uprawę pszenicy ozimej prowadzono zgodnie z obowiązującymi dla niej zaleceniami agrotechnicznymi. W pierwszym doświadczeniu zastosowano nawożenie NPK w ilości 120 : 26 : 60 kg/ha, a w drugim 100 : 26 : 60 kg/ha.

Izolaty zastosowane w badaniach pochodziły z własnej kolekcji. Uzyskano je w 2009 roku z ziarna pszenicy ozimej odmiany Tonacja (*A. pullulans*, *Rh. glutinis*) lub jabłoni odmiany Antonówka (*D. hansenii*). Identyfikację izolatów drożdży wykonano techniką mikroskopową w 400-krotnym powiększeniu (Nikon, Eclipse E 200, Japonia) na podstawie wielkości i kształtu pączkujących komórek oraz obecności chlamydospor i pseudostrzępek [Zalar i in. 2008, Kurtzman i in. 2011]. Przynależność systematyczną wszystkich wymienionych izolatów potwierdzono molekularnie, wykorzystując startery ITS4 i ITS5, które amplifikują rejon niekodujący, znajdujący się między genami rRNA. Po 48-godzinnym wzroście na podłożu PDA z komórek drożdży izolowano DNA za pomocą zestawu Bead-Beat Micro AX Gravity (A&A Biotechnology, Polska). Ilość i jakość wyizolowanego DNA sprawdzono za pomocą pomiaru absorbancji przy długości fali 230 nm oraz 260 nm (NanoMaestro Gen, Polska). Reakcję amplifikacji PCR wykonano za pomocą zestawu FailSafe PCR system (Epicentre, USA), stosując startery: ITS5 forward 5'-GTATCGGACGGAGATCCAGC-3', ITS4 reverse 5'-TTGCTCAGTG-CATTGTCGG-3'. Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler Ep Gradient (Eppendorf, Polska) zaprogramowanym według schematu – denaturacja wstępna w 95°C (3 min), następnie 34 cykle: denaturacja 95°C (1 min), hybrydyzacja 58°C (1 min), wydłużanie 74°C (3 min), w ostatnim etapie 74°C (10 min) [White i in. 1990]. Elektroforezę produktów reakcji przeprowadzono w 1% żelu agarozowym (Prona, Polska), a zdjęcia rozdziału produktów w żelu wykonano za pomocą transiluminatora (UVP, Polska). Produkty amplifikacji zsekwencjonowano w Instytucie Biofizyki i Biochemii PAN w Warszawie. Identyfikacja na podstawie podobieństwa sekwencji izolatów drożdży z izolatami referencyjnymi została wykonana za pomocą narzędzia BLAST w bazie NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Procent powierzchni liści pokrytych plamami z piknidiami i pseudotecjami *Z. tritici*, oceniano osobno dla dwóch poziomów liści (liść podflagowy i flagowy) na 100 lub 50 roślinach porażonych przez patogen w sposób naturalny, w zależności od wielkości poletek, w fazie dojrzałości wodnej (BBCH 71). Ocenę porażenia liści wykonano według skali zaproponowanej przez Europejską i Śródziemnomorską Organizację Ochrony Roślin – EPPO PP 1/26(4) (<https://bip.minrol.gov.pl>). Wyniki podano w postaci średniego procentu powierzchni liścia z objawami infekcji *Z. tritici*. Z obu doświadczeń ziarno zebrano kombajnem poletkowym w fazie dojrzałości martwej (BBCH 92), a plon wyrażono w gramach na m<sup>2</sup>. Dane opracowano statystycznie za pomocą programu Statistica 12. Istotność różnic między średnimi oszacowano testem Studenta, Newmana i Keulsa (SNK) ( $p < 0,01$ ).

## WYNIKI

Zastosowane izolaty drożdży tworzyły charakterystyczne kolonie, *D. hansenii* kremowe, wypukłe o wielkości do 0,5 cm, *R. glutinis* różowe o wielkości 0,3 cm, a *A. pullulans* różowokremowe z charakterystycznymi dobrze zarysowanymi pseudostrzępkami o średnicy 3–4 cm. Morfologia kolonii oraz obraz mikroskopowy komórek, zarodników,

chlamydospor, blastospor i pseudotrzępek gatunku *A. pullulans* odpowiadał opisowi przedstawionemu w opracowaniu Zalara i innych [2008]. Sekwencja regionu ITS1-5,8SrR-NA-ITS2 izolatu tego gatunku została zdeponowana w bazie NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov) pod numerem akcesyjnym KX444670. Obraz mikroskopowy gatunków *D. hansenii* i *R. glutinis* w postaci okrągłych lub wydłużonych, pączkujących komórek odpowiadał opisowi przedstawionemu w monografii Kurtzmanna i innych [2011]. Sekwencje wcześniej wymienionego regionu DNA izolatów *D. hansenii* i *R. glutinis* zostały zdeponowane w bazie NCBI pod numerami akcesyjnym KX444669 i KX444653.

Naturalne porażenie liści badanych pszenic przez *Z. tritici* skutkowało pokryciem liści flagowych i podflagowych charakterystycznymi wydłużonymi plamami septoriozy paskowanej liści na odmianie Skagen na poziomie 9,0% powierzchni liści (tab. 1, 2), a na odmianie Tonacja na poziomie 8,7% powierzchni liści (tab. 3). Mimo że nasilenie septoriozy paskowanej na liściach flagowych i podflagowych odmiany Komnata oszacowano na niskim poziomie 4,5% (tab. 2), liście tej odmiany zasychały zdecydowanie wcześniej niż odmian Skagen i Tonacja. U wszystkich odmian liście flagowe były słabiej porażane przez *Z. tritici* niż liście podflagowe (tab. 2, 3), co jest typowe dla rozwoju epidemii policyklicznej, w której zarodniki przenoszone są z dolnych pięt rośliny na górne.

Tabela 1. Wartości funkcji testowej F dla porażenia liści trzech odmian pszenicy ozimej

Table 1. F-values for leaf infection of three winter wheat cultivars

| Czynniki<br>Factors        | cv. Skagen |          | cv. Komnata |      | cv. Tonacja |          |
|----------------------------|------------|----------|-------------|------|-------------|----------|
|                            | df         | F        | df          | F    | df          | F        |
| Liść (L) – Leaf (L)        | 1          | 251,5 ** | 1           | 0,52 | 1           | 145,9 ** |
| Zabieg (Z) – Treatment (Z) | 1          | 15,5     | 1           | 0,56 | 2           | 15,9 **  |
| L × Z                      | 1          | 3,5      | 1           | 1,09 | 2           | 12,9 **  |

df – liczba stopni swobody – degrees of freedom, \*\* istotne przy  $p < 0,01$  – significant at  $p < 0.01$ .

Tabela 2. Porażenie liści pszenicy ozimej przez *Z. tritici* w Balcynach w 2016 roku [%]

Table 2. Infection of winter wheat leaves by *Z. tritici* in Balcyny in 2016 [%]

| Zabieg<br>Treatment                     | Liść podflagowy<br>Subflag leaf | Liść flagowy<br>Flag leaf | Średnio<br>Mean |
|---|---------------------------------|---------------------------|-----------------|
| cv. Skagen                              |                                 |                           |                 |
| Kontrola – Control                      | 14,42                           | 5,55                      | 9,99            |
| <i>D. hansenii</i> , <i>R. glutinis</i> | 11,51                           | 4,52                      | 8,02            |
| Średnio Mean                            | 12,96 <sup>X</sup>              | 5,04 <sup>Y</sup>         |                 |
| cv. Komnata                             |                                 |                           |                 |
| Kontrola – Control                      | 7,30                            | 3,20                      | 5,25            |
| <i>D. hansenii</i> , <i>R. glutinis</i> | 3,33                            | 4,40                      | 3,87            |
| Średnio Mean                            | 5,20                            | 3,80                      |                 |

X, Y – różnica istotna przy  $p < 0,01$  – difference significant at  $p < 0.01$ .

Trzykrotna aplikacja zawiesin komórek *D. hansenii* i *R. glutinis* na liście odmian Skagen i Komnata jedynie nieznacznie ograniczała nasilenie septoriozy paskowanej liści, zwłaszcza na liściach podflagowych (tab. 2). Tendencji tej nie potwierdziła analiza statystyczna (tab. 1). Liście podflagowe odmiany Tonacja były istotnie słabiej porażane przez *Z. tritici* na poletkach trzykrotnie opryskiwanych zawiesiną drożdży (tab. 3). W przypadku zabiegów wykonanych zawiesiną komórek izolatu *A. pullulans* ich skuteczność oszacowano na poziomie 59,3%, a *D. hansenii* na poziomie 56,7%.

Tabela 3. Porażenie liści pszenicy ozimej odmiany Tonacja przez *Z. tritici* w Bałdach w 2016 roku [%]

Table 3. Infection of leaves of winter wheat cv. Tonacja by *Z. tritici* in Bałdy in 2016 [%]

| Zabieg<br>Treatment | Liść podflagowy<br>Subflag leaf | Liść flagowy<br>Flag leaf | Średnio<br>Mean    |
|---------------------|---------------------------------|---------------------------|--------------------|
| Kontrola – Control  | 28,50 <sup>a</sup>              | 1,20                      | 14,85 <sup>A</sup> |
| <i>A. pullulans</i> | 11,89 <sup>b</sup>              | 0,50                      | 6,19 <sup>B</sup>  |
| <i>D. hansenii</i>  | 12,35 <sup>b</sup>              | 0,22                      | 6,28 <sup>B</sup>  |
| Średnio – Mean      | 16,83 <sup>X</sup>              | 0,58 <sup>Y</sup>         |                    |

Jednakowymi literami oznaczono wartości nieróżniące się istotnie: A, B – dla ochrony biologicznej, X, Y – dla piętra liści, a, b – dla interakcji liść × ochrona biologiczna.

Identical letters were used to mark values statistically indistinguishable: A, B – for biological protection, X, Y – for leaves position, a, b – for interaction leaf × biological treatment.

Odmiana Skagen plonowała na bardzo wysokim poziomie, a naniesienie na liście zawiesin *D. hansenii* i *R. glutinis* nie miało istotnego wpływu na jej plonowanie (tab. 4, 5). Przeciętny plon ziarna odmiany Komnata był prawie 1,8-krotnie niższy niż odmiany Skagen (tab. 5). Nieco lepsze plonowanie odmiany Komnata uzyskano po zastosowaniu zabiegów biologicznych, jednak nie zostało to potwierdzone statystycznie. Odmiana Tonacja plonowała na bardzo niskim poziomie, co wynikało z małej obsady kłosów spowodowanej wymarzaniem roślin. Zastosowane zabiegi ochronne nie miały wpływu na plonowanie odmiany Tonacja.

Tabela 4. Wartości funkcji testowej F dla plonowania i obsady roślin trzech odmian pszenicy ozimej

Table 4. F-values for yield and crop density of three winter wheat cultivars

| Czynniki<br>Factors        | Plon<br>Yield |          | Obsada roślin<br>Crop density |         |
|----------------------------|---------------|----------|-------------------------------|---------|
|                            | df            | F        | df                            | F       |
| Odmiana (O) – Cultivar (O) | 2             | 134,81** | 2                             | 49,93** |
| Zabieg (Z) – Treatment (Z) | 1             | 0,03     | 1                             | 0,03    |
| O × Z                      | 2             | 0,21     | 2                             | 1,52    |

df – liczba stopni swobody – degrees of freedom, \*\* – istotne przy  $p < 0,01$  – significant at  $p < 0.01$ .

Tabela 5. Plonowanie trzech odmian pszenicy ozimej rosnącej w Bałcynach i w Bałdach w 2016 roku

Table 5. Yielding of three winter wheat cultivars growing in Bałcyny and Bałdy in 2016

| Zabieg<br>Treatment                     | Plon ziarna [g] z 1 m <sup>2</sup><br>Grain yield [g] from 1 m <sup>2</sup> | Obsada roślin na 1 m <sup>2</sup><br>Crop density on 1 m <sup>2</sup> |
|---|---|---|
| cv. Skagen                              |   |   |
| Kontrola – Control                      | 1121,11   | 309,50  |
| <i>D. hansenii</i> , <i>R. glutinis</i> | 1094,72   | 336,00  |
| Średnio – Mean                          | 1107,92 <sup>A</sup>  | 322,75 <sup>X</sup>   |
| cv. Komnata                             |   |   |
| Kontrola – Control                      | 622,22  | 263,00  |
| <i>D. hansenii</i> , <i>R. glutinis</i> | 636,94  | 236,50  |
| Średnio; Mean                           | 629,58 <sup>B</sup>   | 249,75 <sup>Y</sup>   |
| cv. Tonacja                             |   |   |
| Kontrola – Control                      | 351,42  | 197,00  |
| <i>D. hansenii</i>                      | 347,33  | 163,33  |
| <i>A. pullulans</i>                     | 349,43  | 195,00  |
| Średnio – Mean                          | 349,40 <sup>B</sup>   | 182,00 <sup>Z</sup>   |

Jednakowymi literami oznaczono wartości nieróżniące się istotnie: A, B, – dla odmian, X, Y, Z – dla obsady roślin.

Identical letters were used to mark values statistically indistinguishable: A, B, – for cultivars, X, Y, Z – for crop density.

## DYSKUSJA

Septorioza paskowana liści pszenicy zaliczana do najgroźniejszych chorób liści w północno-wschodnim rejonie Polski w 2016 roku wystąpiła w nasileniu porównywalnym z obserwacjami prowadzonymi w Danii [Eriksen i Munk 2003], Portugalii [Rodrigo i in. 2015] i Argentynie [Perelló i in. 2009]. Podatność odmiany i lokalizacja doświadczenia były czynnikami decydującymi o nasileniu objawów chorobowych, podobnie jak w badaniach prowadzonych w innych rejonach uprawy pszenicy [Perello i in. 2009, Rodrigo i in. 2015]. Zastosowanie zabiegu biologicznego zawiesinami komórek izolatów *D. hansenii* i *R. glutinis* w lokalizacji, gdzie wysiano odmiany Skagen (*T. aestivum*) i Komnata (*T. durum*) oraz zastosowano wyższe nawożenie roślin, nie ograniczało istotnie rozwoju objawów septoriozy paskowanej liści. Patogen *Z. tritici* jest hemibiotrofem infekującym rośliny wyłącznie za pośrednictwem aparatów szparkowych. Początkowo rośnie wyłącznie między komórkami mezofilu liści, nie tworząc haustoriów lub innych struktur infekcyjnych. Dopiero po 9 dniach od inokulacji w apoplacie wykrywane są metabolity zgodności (białka zawierające motyw lizynowy – LysM: Mg1LysM, Mg3LysM, MgxLysM, mogące wiązać chitynę, która jest elicytorem reakcji obronnej) z rośliną żywicielską [Rudd 2015]. Po kolejnych 12–20 dniach od infekcji *Z. tritici* przechodzi w agresywną,



nekrotroficzną fazę cyklu rozwojowego. Charakterystyczne wydłużone plamy, na powierzchni których tworzą się pikiidnia z zarodnikami, mogą pojawiać się więc nawet po 35 dniach od zakażenia roślin [Lovell i in. 2004].

Izolaty *D. hansenii*, *R. glutinis* i *A. pullulans* zastosowane w przedstawionych badaniach polowych selekcjonowane były w warunkach laboratoryjnych na płytkach Petriego, na których rosły w bikulturach z koloniami *Z. tritici* [Wachowska i Borowska 2014]. Ograniczały one wzrost kolonii patogena kolejno o 35,0; 30,5 i 59,1% w porównaniu z kontrolą. W kontrolowanych warunkach stwierdzono, że drożdże mogą konkurować z patogenami o przestrzeń i o pokarm, a także wytwarzają związki hamujące wzrost kolonii patogenów [Wachowska i Borowska 2014]. Izolat *R. glutinis* cechował się niezadowalającą dynamiką wzrostu, dodatkowo Lima i in. [2003] wykazali jego antagonistyczną, aktywność wobec patogenów wyłącznie w niskiej temperaturze. W przypadku izolatów gatunku *A. pullulans* dobrze udokumentowana jest możliwość wytwarzania przez nie aureobazydyny mającej właściwości grzybobójcze [Slightom i in. 2009] lub sideroforu fuzigen chelatującego żelazo, dzięki któremu antagonistą efektywniej konkuruje z patogenem o żelazo [Wang i in. 2009]. Castoria i inni [2001] badający aktywność *A. pullulans* wobec *B. cinerea* na przechowywanych jabłkach odnotowali wysoką aktywność enzymu  $\beta$ -1,3-glukanazy wytwarzanego przez tego antagonistę. Ippolito i inni [2000] wykazali obecność zewnątrzkomórkowych enzymów egzochitynazy i  $\beta$ -1,3-glukanazy tworzonych przez *A. pullulans* zarówno w ranach jabłek, jak i warunkach *in vitro*. Enzymy te degradując ściany komórkowe patogenów, przyczyniają się także do wzbudzenia mechanizmów obronnych roślin [Ippolito i in. 2000].

Gatunek *D. hansenii* (forma anamorficzna *Candida famata*) najczęściej opisywany jest jako niepatogeniczny, odporny na zasolenie i niskie temperatury mikroorganizm. Jego duże zdolności do adaptacji w różnych ekosystemach rzadko jednak wykorzystywane są do biologicznej ochrony płodów rolnych [Droby i in. 1989]. Najczęściej opisywanym mechanizmem biobójczego działania gatunku *D. hansenii* na grzyby strzępkowe są toksyny killerowe [Żarowska 2012]. Toksyny szczepów *D. hansenii* cechują się obecnością dwóch aktywnych białek o masach 46 i 78 kDa albo stanowią pojedyncze białka o masie cząsteczkowej powyżej 232 i około 152 kDa. Prawdopodobny mechanizm działania toksyn killerowych *D. hansenii* polega według Żarowskiej [2012] na wiązaniu się tych białek z  $\beta$ -1,6-glukanem ściany komórkowej grzybów wrażliwych, następnie z kolejnym, niezidentyfikowanym receptorem obecnym w błonie cytoplazmatycznej oraz hamowaniu podziałów komórkowych, co prowadzi do śmierci komórki.

Wcześniej opisane możliwe mechanizmy działania drożdży *A. pullulans* i *D. hansenii* okazały się prawdopodobnie niewystarczające do ograniczania rozwoju *Z. tritici* na liściach odmian Skagen i Komnata, a skuteczność zabiegów biologicznych na odmianie Tonacja nie przekraczała 60%. Podobną skuteczność gatunków antagonistycznych grzybów *Trichoderma harzianum* i *T. koningii* (ograniczenie częstotliwości występowania choroby o 40% i nasilenia choroby o 70%) stosowanych na plantacji pszenicy wykazano w badaniach Perelló i innych [2009]. W eksperymentach Kildei i innych [2008] prowadzonych w warunkach polowych izolat bakterii *Bacillus megaterium* MKB135 ograniczał nasilenie objawów septoriozy paskowanej liści pszenicy o 80%. Cytowani autorzy jako prawdopodobny mechanizm działania bakterii *B. megaterium* MKB135 podają jednak wzbudzenie przez nie mechanizmów obronnych roślin (ISR). Mechanizmy ISR wynikające

z działania *Bacillus* spp. obejmują zwiększoną aktywność białek związanych z patogenezą: chitynazy i  $\beta$ -1,3-glukanazy, oraz nadprodukcję reaktywnych form tlenu w tkance roślin [Bargabus i in. 2003, Ryu i in. 2004]. W prezentowanych badaniach bezpośrednie działanie drożdży na strzępki *Z. tritici* było ograniczone z uwagi na brak rozbudowanych struktur infekcyjnych tego patogena na powierzchni liści. Patogen wnika bardzo dynamicznie przez szparki do tkanki liścia, stąd mechanizmy takie jak antybioza, konkurencja lub nadpasożytnictwo mają bardzo ograniczony wpływ na jego rozwój.

## WNIOSKI

1. Wysiewanie odmian o mniejszej wrażliwości na infekcje *Z. tritici* najskuteczniej przyczynia się do ograniczenia rozwoju septoriozy paskowanej liści.
2. Niestety nie ma odmian odpornych na ten patogen, a biologiczne metody z wykorzystaniem drożdży są mało efektywne, dlatego mogą być traktowane jedynie jako uzupełnienie metod chemicznych.

## LITERATURA

- Bargabus R.L., Zidack N.K., Sherwood J.E., Jacobsen B.J., 2003. Oxidative burst elicited by *Bacillus mycooides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 1145–1153.
- Castoria R., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S., De Cicco V., 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: Study on its modes of action. *Postharvest Biol. Technol.* 22(1), 1.
- Curvers K., Pycke B., Kyndt T., Vanrompay D., Haesaert G., Gheysen G., 2015. A high resolution melt (HRM) assay to characterize *CYP51* haplotypes of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Crop Prot.* 71, 12–18.
- Droby S., Chalutz E., Wilson C. L., Wisniewski M., 1989. Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Can. J. Microbiol.* 35(8), 794–800.
- Eriksen L., Munk L., 2003. The occurrence of *Mycosphaerella graminicola* and its anamorph *Septoria tritici* in winter wheat during the growing season. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 253–259.
- Fraaije B.A., Lucas J.A., Clark W.S., Burnett F.J., 2003. QoI resistance development in populations of cereal pathogens in the UK. *The BCPC International Congress-Crop Science & Technology*, 689–694.
- Gerbore J., Benhamou N., Vallance J., Le Floch G., Grizard D., Regnault-Roger C., Rey P. 2014. Biological control of plant pathogens: advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 4847–4860.
- <https://bip.minrol.gov.pl/.../fung%20-%20choroby%20liści%20zboż> [dostęp: 02.06.2016].
- Ippolito A., El Ghaouth A., Wilson C.L., Wisniewski M., 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biol. Technol.* 19, 265–272.
- Kildea S., Ransbotyn V., Khan M., Fagan B., Leonard G., Mullins E., Doohan F.M., 2008. *Bacillus megaterium* shows potential for the biocontrol of *Septoria tritici* blotch of wheat. *Biol. Control.* 47, 37–45.



- Kurtzman C., Fell J.W., Boekhout T., 2011. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier, London.
- Leroux P., Albertini C., Gautier A., Gredt M., Walker A.S., 2007. Mutations in the *cyp51* gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 $\alpha$ -demethylation inhibitors in field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. Pest. Manag. Sci. 63, 688–699.
- Lima G., De Curtis F., Castoria R., De Cicco V., 2003. Integrated control of apple postharvest pathogens and survival of biocontrol yeasts in semi-commercial conditions. Eur. J. Plant Pathol. 109, 341–349.
- Lovell D.J., Hunter T., Powers S.J., Parker S. R., Van den Bosch F., 2004. Effect of temperature on latent period of septoria leaf blotch on winter wheat under outdoor conditions. Plant Pathol. 53(2), 170–181.
- Mavroei V.I., Shaw M.W., 2005. Sensitivity distributions and cross-resistance patterns of *Mycosphaerella graminicola* to fluquiconazole, prochloraz and azoxystrobin over a period of 9 years. Crop Prot. 24, 259–299.
- Mirzwa-Mróz E., Tvaružek L., Zamorski C., Nowicki B., 2005. Research on the development of *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) Schroeter teleomorph on wheat leaves. Acta Agrobot. 58(1), 59–65.
- Perelló A.E., Moreno M.V., Mónaco C., Simón M.R., Cordo C., 2009. Biological control of *Septoria tritici* blotch on wheat by *Trichoderma* spp. under field conditions in Argentina. BioControl. 54, 113–122.
- Rodrigo S., Cuello-Hormigo B., Gomes C., Santamaria O., Costa R., Poblaciones M.J., 2015. Influence of fungicide treatments on disease severity caused by *Zymoseptoria tritici*, and on grain yield and quality parameters of bread-making wheat under Mediterranean conditions. Eur. J. Plant Pathol. 141(1), 99–109.
- Rudd J.J., 2015. Previous bottlenecks and future solutions to dissecting the *Zymoseptoria tritici* – wheat host-pathogen interaction. Fungal Genet. Biol. 79, 24–28.
- Ryu C.M., Fara M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W., Pare P.W., 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 134, 1017–1026.
- Slightom J.L., Metzger B.P., Luu H.T., Elhammer A.P., 2009. Cloning and molecular characterization of the gene encoding the aureobasidin A biosynthesis complex in *Aureobasidium pullulans* BP-1938. Gene 431 67–79.
- Torriani S.F.F., Brunner P.C., McDonal B.A., Sierotzki H., 2008. Qol resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. Pest Manag. Sci. 65, 155–162.
- Wachowska U., Borowska J., 2014. Antagonistic yeasts competes for iron with winter wheat stem base pathogens. Gesunde Pflanz. 66, 141–148.
- Wang W., Chi Z., Liu G., Buzdar M.A., Chi Z., 2009. Chemical and biological characterization of siderophore produced by the marine-derived *Aureobasidium pullulans* HN6.2 and its antibacterial activity. BioMetals 22, 965–972.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, 315-322. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (eds.). Academic Press, New York.
- Witzenberger A., Hack H., van den Boom T., 1989. Erläuterungen zum BBCH-Dezimal-Code für die Entwicklungsstadien des Getreides – mit Abbildungen. Gesunde Pflanz. 41, 384–388.
- Zalar P., Gostinčar C., de Hoog G.S., Uršič V., Sudhadham M., Gunde-Cimerman N., 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. Stud. Mycol. 61, 21–38.
- Żarowska B., 2012. Biosynteza i charakterystyka toksyn killerowych drożdży *Debaryomyces hansenii*. Wydaw. UP, Wrocław.

## THE EFFECTIVENESS OF *AUREOBASIDIUM PULLULANS*, *DEBARYOMYCES HANSENII* AND *RHODOTORULA GLUTINIS* YEASTS IN INHIBITING THE DEVELOPMENT OF SEPTORIA LEAF BLOTCH (*ZYMOSEPTORIA TRITICI*) IN WHEAT

**Summary.** The causal agent of Septoria leaf blotch is one of the most dangerous fungal pathogens of wheat. It has a very long incubation period in plant tissues, spreads rapidly in crops and is highly resistant to chemical agents. Biological control methods could be used together with fungicides, but only between ten and twenty biocontrol agents have been approved for use in Europe to date. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of foliar-applied cell suspensions of *Aureobasidium pullulans*, *Debaryomyces hansenii* and *Rhodotorula glutinis* yeasts in eliminating the symptoms of Septoria leaf blotch in winter wheat. A field experiment was carried out in two locations in north-eastern Poland on two cultivars of *Triticum aestivum* ('Tonacja' and 'Skagen') and one *T. durum* cultivar ('Komnata'). The yeast isolates used in the experiment were obtained from the grain of winter wheat cv. Tonacja (*A. pullulans*, *Rh. glutinis*) and apples cv. Antonówka (*D. hansenii*). The ITS1-5.8SrRNA-ITS2 sequences of *A. pullulans*, *D. hansenii* and *R. glutinis* yeasts were deposited in the NCBI database under accession numbers KX444670, KX444669 and KX444653, respectively. Yeast suspensions with density of  $0.4-2.5 \cdot 10^5$  cells per  $\text{cm}^3$  of sterile water were sprayed onto plants with the use of a backpack sprayer at the first node stage, at the heading stage and at the full flowering stage. The effectiveness of biological treatments in controlling the spread of Septoria leaf depended on the susceptibility of wheat cultivars to infections caused by *Zymoseptoria tritici* and the yeast strain used as a biocontrol agent. Durum wheat cv. Komnata was less susceptible to leaf infections caused by *Z. tritici* than common wheat cvs. Skagen and Tonacja. In all analyzed wheat cultivars, the severity of Septoria leaf blotch was considerably lower on flag leaves than on penultimate leaves. The effectiveness of biological treatments in controlling the spread of Septoria leaf blotch in common wheat cv. Tonacja was estimated at 59.3% for the suspension containing the *Aureobasidium pullulans* isolate and 56.7% for the suspension containing the *Debaryomyces hansenii* isolate. In the remaining wheat cultivars, the effectiveness of biological treatments did not exceed 54.5%, and it was not statistically significant, mostly due to the low density of the cell suspension of the *Rhodotorula glutinis* isolate, which was characterized by a low growth rate on agar. Biological treatments had no significant influence on wheat yield. Since yeasts used as biocontrol agents are not highly effective against *Z. tritici*, they should be combined with chemical methods.

**Key words:** *Aureobasidium pullulans*, *Debaryomyces hansenii*, *Rhodotorula glutinis*, Septoria leaf blotch, *Triticum aestivum*, *T. durum*