LESZEK B. ORLIKOWSKI

Wykorzystanie wyciągu z grejpfruta w ochronie cisa, cyprysika Lawsona i wrzosów przed *Phytophthora cinnamomi*

Use of grapefruit extract in the control of *Phytophthora cinnamomi* on yew, Lawson cypress and heather

Abstract. Amendment of media with grapefruit extract already at dose 8 g/cm^3 inhibited the growth of *P. cinnamomi* and zoosporangia formation. The pathogen did not sporulate at dose 200 µg of grapefruit extract/cm^3. Drenching of peat with grapefruit extract at dose 165 µg/cm^3, immediately after planting of yew, cypress and heather, resulted in suppression of *Phytophthora* root and stem rot spread at least 50%.

Key words: *Phytophthora*, growth, sporulation, suppression, control, yew, cypress, heather

Wstęp

Od pierwszego wykrycia *Phytophthora cinnamomi* Rands z drzewa cynamonowego na Sumatrze minęło już ponad 80 lat. W tym czasie grzyba opisano na ponad 1000 gatunkach roślin [Zentmyer 1980]. Obecnie jest to jeden z najgroźniejszych patogenów z rodzaju *Phytophthora* w klimacie tropikalnym i subtropikalnym, a w minionym 30-leciu również i w strefie umiarkowanej [Orlikowski, Gabarkiewicz, Skrzypczak 1995]. O szkodliwości *P. cinnamomi* świadczą dane zaprezentowane przez van Steekelenburg [1974] na konferencji w Paryżu. Autor stwierdził, że gatunek ten może spowodować wypadnięcie nawet 100% roślin w szkółkach roślin iglastych. W Polsce brakowało danych o występowaniu tego patogena do 1995 roku. Orlikowski i współaut. [1995] wykazali, że *P. cinnamomi* może powodować zgniliznę korzeni i pędu m.in. jodły [*Abies alba* Mill., *Calluna vulgaris* (L.) Sahib.], cyprysika Lawsona [*Chamaecyparis lawsoniana* (Andr.) Perl.], kosodrzewiny (*Pinus mugho pumilo* Zenari), sosny czarnej (*P. nigra* Arnold) i różanecznika (*Rhododendron* spp.). W minionych trzech latach [Orlikowski, nie publik.] występowanie tego gatunku stwierdzono również na cisie pospolitym (*Taxus baccata* L.), bagnie (*Ledum palustre* L.) i borówce (*Vaccinum myrtillus* L.). Obserwacje własne, prowadzone w szkółkach roślin ozdobnych wskazują, że omawiany gatunek jest szczególnie groźny dla cyprysika Lawsona [Orlikowski 1999]. Obok szkółek, *P. cinnamomi* może stanowić coraz

większe zagrożenie dla roślin iglastych uprawianych w ogrodach i na działkach, gdzie gatunek ten może być zawleczony na materiale szkółkarskim.

W szkółkach, po stwierdzeniu tego patogena, istnieje konieczność szybkiego eliminowania porażonych roślin i ich palenia, a następnie zabezpieczenia pozostałych roślin przed tym gatunkiem. Z badań Orlikowskiego [1996] wynika, że dobre wyniki w ochronie roślin przed *P. cinnamomi* uzyskuje się przez doglebowe stosowanie furalaksylu, oksadiksylu oraz fosetylu glinowego. Wprowadzanie fungicydów do gleby lub podłoży może stanowić jednak zagrożenie dla środowiska tym bardziej, że ich zużycie na jednostkę powierzchni jest bardzo duże. Przy częstym stosowaniu tych pestycydów, istnieje również możliwość uodparniania się na nie niektórych szczepów patogena. Istnieje więc potrzeba wprowadzenia do programu ochrony szkółek roślin ozdobnych preparatów biologicznych. Badania Orlikowskiego [2001] i Orlikowskiego i Skrzypczaka [2001] wskazują, że wyciąg z grejpfruta, wprowadzony do podłoża, drastycznie ogranicza rozwój *Phytophthora cryptogea* Pethybr. et Laff. i *Fusarium oxysporum* Sclecht. f. sp. *dianthi* (Prill. et Dell.) Sny et Hans.

Celem niniejszych badań było określenie aktywności biologicznej wyciągu z grejpfruta w stosunku do *P. cinnamomi in vitro*, a następnie *in situ* na trzech wybranych gatunkach roślin.

Materiał i metody

W doświadczeniach laboratoryjnych wyciąg z grejpfruta (GE) stosowano w stężeniach od 0 (kontrola) do 1000 $\mu g/cm^3$. Jako środek standardowy w badaniach *in vivo* użyto fosetyl glinowy (substancja biologicznie czynna fungicydu Aliette 80 WP).

Czynnik chorobotwórczy

We wszystkich doświadczeniach użyto krążków grzybni o średnicy 5 mm *P. cinnamomi*. Izolat uzyskano z zamierającego pędu cyprysika Lawsona. Kulturę inkubowano na agarze ziemniaczano-glukozowym (PDA) w temp. 25°C w ciemności. W badaniach nad wzrostem liniowym grzybni w obecności GE, szalki szczepiono krążkami grzybni o średnicy 5 mm, pobranymi z brzegu 7-dniowych kultur, rosnących na PDA. Do badań nad zarodnikowaniem *P. cinnamomi* grzyb inkubowano przez 10 dni na pożywce z mąki owsianej, a następnie krążki grzybni o średnicy 5 mm przenoszono do wyciągu glebowego [Orlikowski 1979]. Do zakażenia podłoża kulturę grzyba przygotowano na pożywce z płatków owsianych [Orlikowski 1999].

Doświadczenia laboratoryjne

Założono je stosując metodę podaną przez Orlikowskiego [2001]. Przy badaniu współzależności pomiędzy stężeniem GE a wzrostem *P. cinnamomi*, wyciąg dodano do PDA, a następnie na środku szalek Petriego o średnicy 90 mm, zawierających po 10 ml pożywki, umieszczano krążki grzybni patogena. Szalki inkubowano w 25°C i po 3 oraz 5 dniach mierzono średnicę kolonii.

W badaniach nad wpływem GE na zarodnikowanie *P. cinnamomi*, krążki grzybni przenoszono do szalek Petriego (4 na szalkę), zawierających wyciąg glebowy. Po 4 i 8 dniach

inkubacji w 25°C liczono zoosporangia, formujące się na obrzeżach krążków grzybni. Liczbę zoosporangiów przeliczano na powierzchnię 1 mm^2.

Rośliny

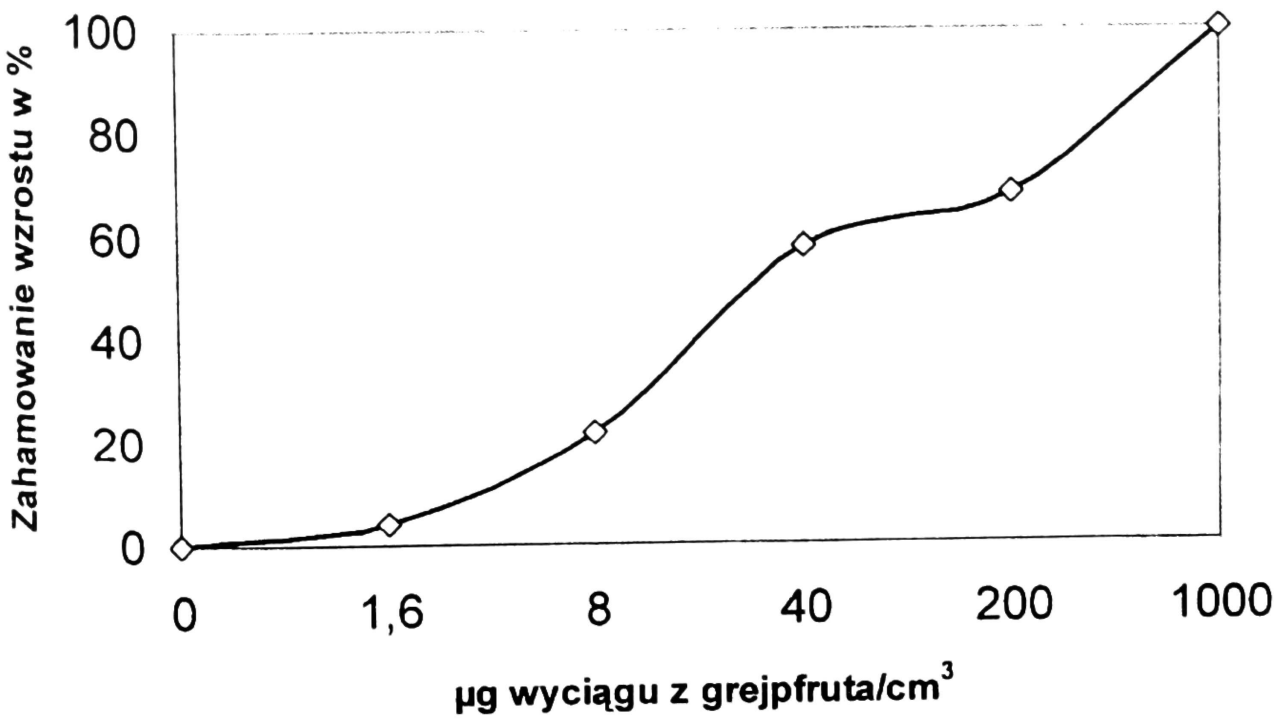
Aktywność biologiczną GE badano na ukorzenionych sadzonkach cisa, cyprysika Lawsona (*Ch. lawsoniana* cv. Ellwoodii) i wrzosu odm. Carmen. Sadzonki pobrano z roślin matecznych, wolnych od *P. cinnamomi*. Rośliny sadzono do doniczek o pojemności 1 dm^3 i w substrat torfowy zakażony przez *P. cinnamomi* (250 jednostek propagacyjnych w 1 g powietrznie suchego torfu). Następnie ustawiano je na macie w tunelu foliowym. Bezpośrednio po sadzeniu rośliny podlano roztworem/zawiesiną badanych preparatów stosując 50 cm^3 na pojemnik. Oceniano wpływ dwóch stężeń GE (165 i 330 $\mu g/cm^3$) oraz jednej lub dwóch aplikacji preparatu na rozwój i zdrowotność roślin w ciągu 14 tygodni uprawy.

Doświadczenia założono w układzie bloków kompletnie losowych w czterech powtórzeniach po 1 szalce Petriego (badania *in vitro*) lub po 10 roślin. Powtórzono je 2-3-krotnie w odstępach co najmniej dwutygodniowych.

Wyniki

Aktywność biologiczna wyciągu z grejpfruta w hamowaniu wzrostu i zarodnikowania *P. cinnamomi*

Nieznaczne zahamowanie wzrostu stwierdzono już przy dodatku 1,6 μg GE/cm^3. W miarę wzrostu stężenia GE malała średnica grzybni. Przy 40 μg GE/cm^3 stwierdzono około 50% zahamowanie wzrostu patogena, a przy 1000 μg nie obserwowano już rozwoju badanego czynnika chorobotwórczego (ryc.).



RYC. Hamowanie wzrostu grzybni *Phytophthora cinnamomi* (w %) na agarze ziemniaczano-glukozowym z dodatkiem wyciągu z grejpfruta po 5 dniach inkubacji.

TABELA 1

Aktywność biologiczna wyciągu z grejpfruta w hamowaniu formowania się zarodni płytkowych *Phytophthora cinnamomi*; liczba zarodni na powierzchni 1 mm^2 grzybni

Kombinacja	µg wyciągu/cm^3	Dni inkubacji	
		4	8
Kontrola		36c	98d
Wyciąg z grejpfruta	1,6	42c	112de
Wyciag z grejpfruta	8	23b	37c
Wyciąg z grejpfruta	40	6a	17b
Wyciąg z grejpfruta	200	0a	0a

Uwaga: Średnie w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie (5%) wg testu Duncana

Dodatek 1,6 µg GE/cm^3 wyciągu glebowego nie miał wpływu na zahamowanie tworzenia się zarodni pływkowych patogena zarówno po 4 jak i 8 dniach inkubacji (tab. 1). Przy wzroście stężenia GE do 8 µg/cm^3 po 4 dniach inkubacji stwierdzono około 50% zahamowanie zarodnikowania badanego gatunku. Przetrzymywanie szalek przez dalsze 4 dni spowodowało dalszy, około trzykrotny spadek liczby zarodni pływkowych w porównaniu z kombinacją, gdzie nie dodano wyciągu (tab. 1). Drastyczne ograniczenie formowania się zoosporangiów stwierdzono przy dodatku 40 µg GE/cm^3 pożywki, a przy dawce pięciokrotnie większej nie obserwowano już zarodni pływkowych. (tab. 1).

Aktywność biologiczna wyciągu z grejpfruta w ochronie cisa, cyprysika Lawsona i wrzosów przed *P. cinnamomi*

Pierwsze symptomy fytoftorozy na cisie nie chronionym stwierdzono już po 6 tygodniach od sadzenia, a po 14 tygodniach wypadło ponad 8 (na 10) roślin (tab. 2). Jednokrotne podlanie cisa GE w stężeniu 165 lub 330 µg/cm^3 spowodowało drastyczne ograniczenie

TABELA 2

Aktywność biologiczna wyciągu z grejpfruta w ochronie cisa przed *Phytophthora cinnamomi*; liczba porażonych roślin (n=10) Sadzenie: 2000.07.16

Kombinacja	µg/cm^3	Liczba zabiegów podlania	Tygodnie od sadzenia		
			6	10	14
Kontrola	-	-	2,5e	4,5c	8,5c
Wyciąg z grejpfruta	165	1	0a	0,5a	1,5a
Wyciąg z grejpfruta	165	2	0a	1,0a	2,25b
Wyciąg z grejpfruta	330	1	0a	0,5a	1,0a
Wyciąg z grejpfruta	330	2	1,25b	1,5ab	2,25b
Fosetyl glinowy	1600	1	0a	0a	1,0a

Uwaga: patrz tabela1

TABELA 3

Aktywność biologiczna wyciągu z grejpfruta w ochronie cyprysika Lawsona przed *Phytophthora cinnamomi*; liczba porażonych roślin (n=10)

Kombinacja	µg/cm^3	Liczba zabiegów podlania	Tygodnie od sadzenia		
			6	9	12
Kontrola	-	-	2,5c	6,75d	9,5d
Wyciąg z grejpfruta	165	1	1,0ab	3,25c	5,0c
Wyciąg z grejpfruta	165	2	1,25b	2,0ab	4,25bc
Wyciąg z grejpfruta	330	1	1,5b	1,75a	3,5b
Wyciąg z grejpfruta	330	2	0,5a	2,0ab	4,0b
Fosetyl glinowy	1600	1	0,5a	1,25a	2,25a

Uwaga: patrz tabela 1

rozwoju fytoftorozy. Efekt ten porównywalny był ze skutecznością fosetylu glinowego. Pierwsze symptomy choroby na roślinach chronionych wystąpiły sporadycznie po 10 tygodniach uprawy, a w miesiąc później wypadło ich około 1/10. Zastosowanie GE dwukrotnie co dwa tygodnie spowodowało, że objawy chorobowe pojawiły się wcześniej i wypadło więcej roślin aniżeli przy jednorazowej aplikacji preparatu (tab. 2).

W ochronie cyprysika Lawsona przed *P. cinnamomi*, zastosowanie doglebowe GE spowodowało istotne ograniczenie rozwoju fytoftorozy. Stwierdzono to w trzech terminach obserwacji, przy różnych stężeniach badanego preparatu i niezależnie od liczby aplikacji (tab. 3). Użycie GE w stężeniu 330 µg/cm^3 dało istotnie lepsze wyniki w zabezpieczeniu roślin przed patogenem aniżeli w dawce dwukrotnie niższej. Liczba aplikacji nie miała istotnego wpływu na aktywność biologiczną badanego preparatu. W trzech przeprowadzonych doświadczeniach, zastosowanie doglebowe fosetylu glinowego dało lepszy efekt ochronny cyprysika aniżeli użycie wyciągu z grejpfruta (tab. 3).

TABELA 4

Aktywność biologiczna wyciągu z grejpfruta w ochronie wrzosów przed *Phytphthora cinnamomi*; liczba porażonych roślin (n=10)

Kombinacja	µg/cm^3	Liczba zabiegów podlania	Tygodnie od sadzenia		
			6	10	14
Kontrola	-	-	1,5b	5,75c	9,25d
Wyciąg z grejpfruta	165	1	0,5a	2,5ab	5,5c
Wyciąg z grejpfruta	165	2	1,0ab	1,75a	4,75b
Wyciąg z grejpfruta	330	1	0a	1,5a	4,0b
Wyciąg z grejpfruta	330	2	0,5a	2,0a	5,25bc
Fosetyl glinowy	1600	1	1,0ab	1,5a	2,75a

Uwaga: patrz Tabela 1

W ochronie wrzosów przed *P. cinnamomi*, zastosowanie GE spowodowało istotne ograniczenie rozwoju fytoftorozy w trzech terminach obserwacji (tab. 4). Uzyskane dane wskazują na istotny wpływ stężenia GE na jego aktywność biologiczną. Po 14 tygodniach uprawy wypadło większość wrzosów kontrolnych – nie chronionych. Jednorazowe zastosowanie GE w stężeniu 330 $\mu g/cm^3$ chroniło 6/10 roślin przed patogenem. Przy dwukrotnie niższym stężeniu wypadło ponad połowę roślin (tab. 4). Liczba aplikacji miała istotny wpływ na zdrowotność wrzosów, gdy GE zastosowano w stężeniu 165 $\mu g/cm^3$. Powtórzenie zabiegu spowodowało bowiem istotne obniżenie liczby porażonych wrzosów. Po 14 tygodniach uprawy skuteczność fosetylu glinowego była istotnie większa aniżeli wyciągu z grejpfruta (tab. 4).

Dyskusja

Wyniki z badań *in vitro* potwierdzają wcześniejsze dane uzyskane przez Orlikowskiego [2001] nad aktywnością biologiczną wyciągu z grejpfruta w stosunku do *P. cryptogea*. Dane te wskazują bowiem na bezpośrednie oddziaływanie badanego preparatu na patogeny poprzez ograniczenie wzrostu grzybni oraz drastyczne hamowanie formowania się zarodni pływkowych. Wyciąg z grejpfruta powoduje również ograniczenie kiełkowania zarodników *F. oxysporum* f. sp. *dianthi* i gatunków z rodzaju *Botrytis* [Orlikowski, Skrzypczak 2001, Orlikowski i współaut. niepublik.]. W podłożu uwidocznia się to spadkiem liczebności populacji *P. cryptogea* o około 70% i utrzymywanie się bardzo niskiego poziomu patogena w ciągu co najmniej 35 dni [Orlikowski 2001].

Bardzo silne ograniczenie rozwoju fytoftorozy na trzech badanych gatunkach roślin wskazuje na bezpośrednie oddziaływanie wyciągu na czynnik chorobotwórczy w podłożu i obniżenie jego liczebności. Z większości doświadczeń w tunelu foliowym na trzech badanych roślinach wynika, że wystarczy jednorazowe wprowadzenie wyciągu do podłoża, aby uzyskać zadowalający efekt ochronny. Powtórzenie zabiegu w niektórych doświadczeniach powodowało nawet wzrost liczby chorych roślin. Zagadnienie to wymaga wyjaśnienia w dalszych badaniach. Uzyskane dane wskazują na zróżnicowaną reakcję badanych roślin na wyciąg glebowy w obecności *P. cinnamomi*. Najlepszy efekt ochronny badanego preparatu uzyskano w ochronie cisa przed *P. cinnamomi*. Jest bardzo prawdopodobne, że obok bezpośredniego oddziaływania wyciągu z grejpfruta na patogena, powodował on również wzrost odporności cisa na czynnik chorobotwórczy. O indukowaniu odporności difenbachii na *Myrothecium roridum* przez wyciąg z grejpfruta wskazują badania Orlikowskiego i Skrzypczaka [2001].

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa
Zakład Ochrony Roślin Ozdobnych
ul. Waryńskiego 14, 96-100 Skierniewice
tel. (046) 8332366, 8332041
e-mail: lorlikow@insad.pl

Literatura

Orlikowski L.B.: Sporulation of *Phytophthora cryptogea* from diseased gerbera in water and soil extracts. Bull. Pol. Acad. Sci., 1979, 27, 9: 755-760.

Orlikowski L.B.: *Phytophthora* species in Polish nurseries. II. Chemical and biological control of *P. cinnamomi* on *Chamaecyparis lawsoniana* cv. Ellwoodii. Phytopath. Polonica, 1996, 11: 111-120.

Orlikowski L.B.: Selective media for evaluation of propagules densities of *Phytophthora* spp. and *Fusarium oxysporum* and biocontrol agents efficacy in the pathogens control. Bull. Pol. Acad. Sci., Biol. Sci, 1999, 47, 1-4: 167-172.

Orlikowski L.B.: Najgroźniejsze patogeny w szkółkach roślin ozdobnych. Sylwan, 2000, 4: 155-159.

Orlikowski L.B.: Effect of grapefruit extract on develpment of *Phytophthora cryptogea* and control of foot rot of gerbera. J. Plant Prot. Res., 2001, 41, 3: 84-90.

Orlikowski L.B., Gabarkiewicz R., Skrzypczak C.: *Phytophthora* species in Polish nurseries. I. Isolation and identification of *Phytophthora* species. Phytopath. Polonica, 1995, 9 (XI): 73-79.

Orlikowski L.B., Skrzypczak C.: Biopreparat z wyciągu z grejpfruta – postęp w biologicznej ochronie roślin przed chorobami. Annales UMCS s. EEE, Horticulture, 2001, IX: 261-269.

Van Steekelenburg N.A.M.: La maladie a *Phytophthora* des coniferes. Les problemes sanitaires actuels en pepinieres. J. d'etude de l'Hortic. des Pepinieres, Paris, 1974: 85-94.

Zentmyer G.A.: *Phytophthora cinnamomi* and the diseases its causes. American Phytopath Soc., St Paul, Minesota, 1980: 1-95.

Summary

Use of grapefruit extract in the control of *Phytophthora cinnamomi* on yew, Lawson cypress and heather

Biological activity of grapefruit extract in the inhibition of growth and development of *Phytophthora cinnamomi* and control of *Phytophthora* root and stem rot of yew, Lawson cypress and heather were evaluated. Amendment of potato-dextrose agar and soil leachate with grapefruit extract already at conc. 8 μg /cm^3 resulted in the inhibition of mycelium growth and formation of zoosporangia. At dose 200 μg of grapefruit extract/cm^3 the pathogen did not sporulate. Application of grapefruit extract already at dose 165 μg/cm^3 as peat drench, immediately after planting, suppressed the *Phytophthora* root and stem rot spread about 50%. The product was the most effective in the disease control on yew.