

**WPLYW TERMINU APLIKACJI GRZYBÓW *TRICHODERMA*
NA NOŚNIKACH ORGANICZNYCH
NA WSCHODY I WZROST MARCHWI I CEBULI**

THE EFFECT OF TERM OF APPLICATION OF *TRICHODERMA*
FUNGI ON ORGANIC CARRIERS ON THE GERMINATION
AND GROWTH OF ONION AND CARROTS

Urszula Smolińska, Beata Kowalska, Magdalena Szczech

Instytut Ogrodnictwa

ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

urszula.smolinska@inhort.pl

Abstract

The agro-industrial wastes are applied sometimes on the field without composting. However, introduction of a fresh organic material into soil may cause phytotoxicity towards many plants and may increase the level of soil-borne pathogens. The aim of this work was to evaluate the effect of organic waste materials (GII) overgrowing with *Trichoderma* fungi isolates on seed germination and the growth of carrot and onion. If sowing the seeds was conducted immediately after application of granulates, it was found that the granulates GII decreased germination of onion and carrots seeds. Results obtained showed that the granulates GII overgrowing with selected *Trichoderma* isolates significantly stimulated the growth of carrot seedlings.

Key words: organic wastes, *Trichoderma*, phytotoxicity

WSTĘP

Odpady z przemysłu rolno-spożywczego są aplikowane na pola uprawne ze względu na ich wysokie wartości nawozowe. Często są one kompostowane, jednak czasami świeże odpady są przyorywane bezpośrednio do gleby. Odpady te zawierają znaczne ilości związków biologicznie aktywnych, mogących wpływać bezpośrednio lub pośrednio po rozkładzie w glebie na organizmy żywe (Joshi i in. 2012). Wiadomo jest, że rozkład tych związków może obniżać kiełkowanie lub wywoływać uszkodzenia roślin następczych (Bonanomi i in. 2006; 2007). Jest to spowodowane toksycznymi właściwościami związków powstających w pierwszej fazie degradacji materii organicznej, wskutek działalności mikroorganizmów glebowych (Bonanomi i in. 2011). Związkami, które uważa się za

najbardziej odpowiedzialne za ten efekt są m.in. kwasy organiczne, związki fenolowe, amoniak, azotyny i inne (Patrick 1971). Niektóre z nich, jak np. związki fenolowe mogą zalegać w glebie przez dłuższy czas. Niewątpliwie najlepsze są materiały organiczne przekompostowane, natomiast nie zawsze jest możliwość przeprowadzenia tego procesu.

Zastosowanie na pola uprawne nieprzekompostowanych odpadów organicznych może być także niekorzystne z powodu możliwości namnażania się na tych materiałach grzybów patogenicznych bytujących w glebie (Smolińska i Kowalczyk 2014). Może być to szczególnie istotne w przypadku gleb silnie porażonych przez patogeny odglebowe np. *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* czy *Botrytis*. Materiały odpadowe z przemysłu rolno-spożywczego są bogatym źródłem substancji odżywczych. Dobrym rozwiązaniem jest wykorzystanie materiału organicznego jako nośnika mikroorganizmów korzystnych dla roślin. Wprowadzanie do gleby substancji organicznej zasiedlonej przez „korzystne” dla roślin grzyby, np. z rodzaju *Trichoderma*, może zapobiegać zwiększonemu namnażaniu się patogenów bytujących w glebie. Z tego powodu materiał organiczny zastosowany w prezentowanych badaniach został przerośnięty (zainokulowany) wyselekcjonowanymi grzybami z rodzaju *Trichoderma*. Korzystne właściwości tych grzybów w stosunku do roślin opisano w wielu pracach (Druzhinina i in. 2011; Hermosa i in. 2012; Stewart i Hill 2014). Grzyb namnażając się na odpadach zajmuje nisze ekologiczne, które mogłyby być zasiedlone przez grzyby patogeniczne. Ekspansywność grzybów z rodzaju *Trichoderma* wynika także z faktu, że dzięki możliwościom wykorzystania wielu związków jako źródła pokarmu, są one silnie konkurencyjne w stosunku do innych mikroorganizmów bytujących w środowisku glebowym. Dzięki szybkiemu wzrostowi są jednymi z pierwszych grzybów zasiedlających gleby i podłoża po fumigacji.

Celem prowadzonych badań było określenie jaki wpływ na kiełkowanie nasion oraz wzrost siewek cebuli i marchwi mogą mieć odpadowe materiały organiczne zastosowane jako nośniki grzybów z rodzaju *Trichoderma*.

MATERIAŁY I METODY

Przygotowanie nośnika organicznego dla grzybów *Trichoderma*

Do wytworzenia nośnika organicznego (granulat GII) wykorzystano materiały odpadowe z przemysłu rolno-spożywczego. Wytłoczyny z jabłek i truskawki zakupiono w firmie Agropol z Potyczza; wytłoczyny z rzepaku w firmie Ardex, natomiast suche łuski cebuli oraz liście kapusty pekińskiej

uzyskano z Pola Doświadczalnego IO. Rozdrobnione materiały wymieszano w równej proporcji objętościowej, zwilżono wodą i zgranulowano za pomocą pelecziarki (P-300, Protechnika, Łuków). Po wysuszeniu w temperaturze 18-22 °C granulaty przechowywano w workach foliowych. Opis przygotowania granulatu przedstawiono w publikacji Smolińska i in. (2014).

Namnożenie grzybów *Trichoderma* na nośniku GII

W doświadczeniach wykorzystano wyselekcjonowane izolaty grzybów z rodzaju *Trichoderma*. Zastosowano następujące izolaty: *T. atroviride* TRS25; *T. atroviride* TRS40; *T. harzianum* sensu stricto TRS59. Izolaty przechowywano w 2% glicerolu, w temperaturze -80 °C.

Granulaty GII (w ilości 2 dm³) umieszczano w workach foliowych (30 × 25 cm) i zaszczepiano wodną zawiesiną zarodników grzybów *Trichoderma* w ilości 6,5 ml, zawierającą ok. 10⁷-10⁸ jtk·ml⁻¹. Dodatkowo granulaty zwilżono wodą wodociągową w ilości 200 ml na worek, w celu zapewnienia odpowiednich warunków dla wzrostu dla grzyba. Odpowiednie napowietrzenie uzyskano poprzez nakłucie worków igłą preparacyjną, po 5 nakłuc z każdej strony. Worki z granulatami przechowywano w temp. pokojowej (20-22 °C) przez 2-3 tygodnie. Analizy liczebności grzyba *Trichoderma* w przerośniętym podłożu wykazały liczebność ok. 10⁸ jednostek propagacyjnych grzyba w 1 gramie nośnika.

Ocena wpływu *Trichoderma* na nośniku GII na kiełkowanie nasion oraz na wzrost marchwi i cebuli

Do 9 dm³ gleby (gleba pseudo-bielicowa) dodano przerośnięty grzybami *Trichoderma* granulaty GII w ilości 1%. Po wymieszaniu i doprowadzeniu wilgotności do ok. 70% glebę podzielono na trzy porcje, po 3 dm³ każda. Pierwszą porcję gleby (Termin I) przesypano do sześciu 0,5 dm³ doniczek, do których wysiano bezpośrednio po 10 nasion marchwi odm. 'Nerac F1' (3 doniczki) oraz po 10 nasion cebuli odm. 'Grabowska' (3 doniczki). Przygotowano następujące kombinacje: 1/ kontrola – gleba bez dodatków organicznych oraz grzyba *Trichoderma*; 2/ GII + *T. atroviride* TRS25; 3/ GII + *T. harzianum* TRS59; 4/ GII + *T. atroviride* TRS40; 5/ GII (gleba z dodatkiem nośnika GII).

Pozostałą glebę z granulatami GII przerośniętymi szczepami *Trichoderma* (lub bez granulatu w przypadku kombinacji kontrolnej) przechowywano w 3-litrowych, plastikowych pojemnikach, w temperaturze ok. 18-20 °C. Po okresie dwóch (Termin II), a następnie czterech tygodni (Termin III), glebę przesypano do 0,5 dm³ doniczek (po 3 doniczki na kombinację), do których wysiano po 10 nasion marchwi i cebuli. Uprawę

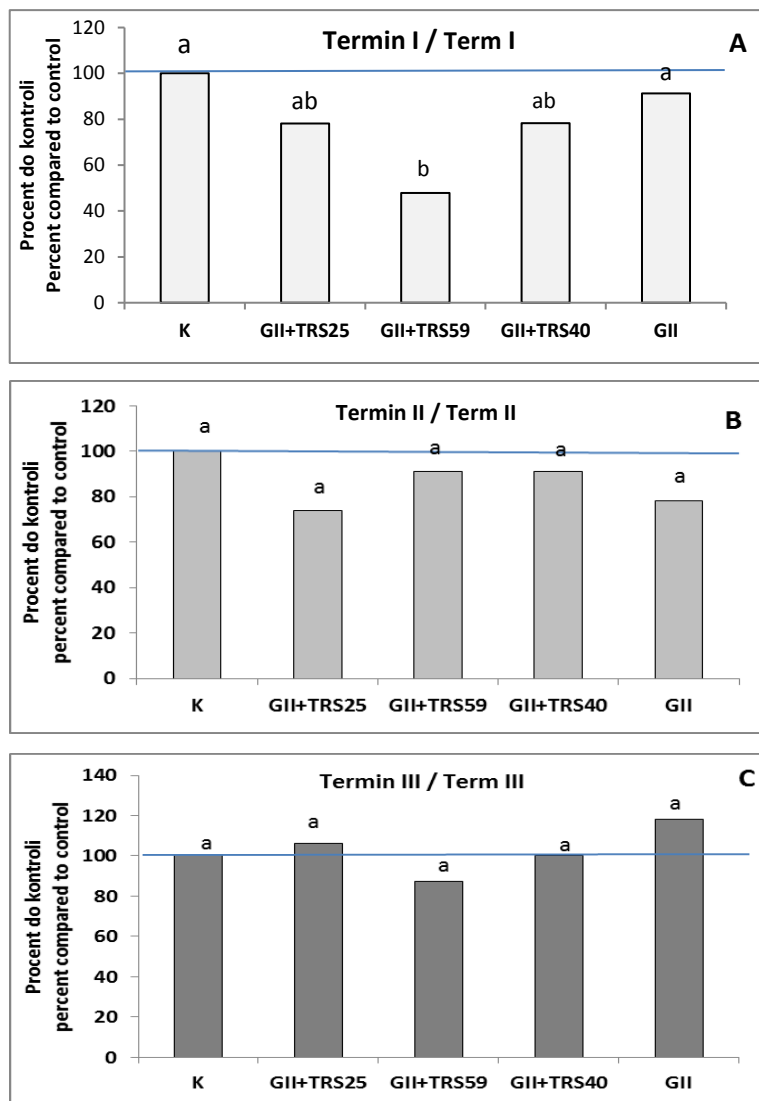
roślin prowadzono w komorze wzrostowej, w temperaturze 18 °C. Liczono wschody roślin oraz po 2 miesiącach od wysiewu nasion określono świeżą masę części nadziemnych siewek. Doświadczenia były powtórzone.

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie za pomocą analizy wariancji dla doświadczeń jednoczynnikowych na wartościach transformowanych według funkcji $\sqrt{x+0.5}$. Do oceny różnic między średnimi użyto testu Newmana-Keulsa przy poziomie istotności $\alpha \leq 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Materiały odpadowe z przemysłu rolno-spożywczego wykorzystano jako „nośnik” dla grzybów *Trichoderma*. Zestaw materiałów organicznych dobrano w taki sposób, aby grzyb intensywnie zasiedlił materiał. W przeprowadzonym doświadczeniu dodatek materiału organicznego przerośniętego (lub nie) grzybami *Trichoderma* wpływał niekorzystnie na kiełkowanie nasion cebuli oraz marchwi, zwłaszcza jeżeli nasiona wysiano bezpośrednio po aplikacji granulatu do gleby. Największy szkodliwy efekt obserwowano w przypadku marchwi, po zastosowaniu dodatku GII przerośniętego izolatem *T. harzianum* TRS59 (rys. 1A). W przypadku cebuli taka tendencja była również wyraźnie zaznaczona (rys. 2A). Po inkubacji gleby przez następne 2 i 4 tygodnie wprawdzie obserwowano niewielkie obniżenie kiełkowania po wzbogaceniu materiałem organicznym i grzybem *Trichoderma*, ale różnice między tymi traktowaniami a kontrolą nie były istotne statystycznie (rys. 1B,C i 2B,C). Zjawisko negatywnego wpływu rozkładających się resztek posprzętnych i uwalniania się z nich toksycznych związków jest dobrze znane, zarówno badaczom, jak i producentom (Politycka i Wójcik-Wojtkowiak 1988; Sołtys i in. 2010; Ayongwa i in. 2011).

Znacznie wyraźniejszy wpływ granulatów z odpadów obserwowano na wzrost i masę badanych roślin. Korzystniejszy efekt zastosowania GII obserwowano w przypadku marchwi (rys. 3) niż cebuli (rys. 4). Obecność zarówno samego nośnika, jak i odpadów przerośniętych *Trichoderma* była korzystna bez względu na termin wysiewu nasion. Wzbogacenie gleby granulatem GII, przerośniętym izolatem *T. atroviride* TRS25, a po 2 tygodniach wysianie nasion, stymulowało masę siewek do 230,8% w porównaniu z kontrolą (rys. 3B). Niewiele gorzej działał izolat *T. harzianum* TRS59, który powodował wzrost masy do 215,4%. Podobny korzystny efekt obserwowali autorzy pracy w doświadczeniach wazonowych z pietruszką (Smolińska i in. 2014). Wzbogacenie gleby granulatem T-GRAN (o składzie podobnym do GII), przerośniętym izolatem *T. harzianum* TRS59, stymulowało masę siewek tej rośliny powyżej 300%.



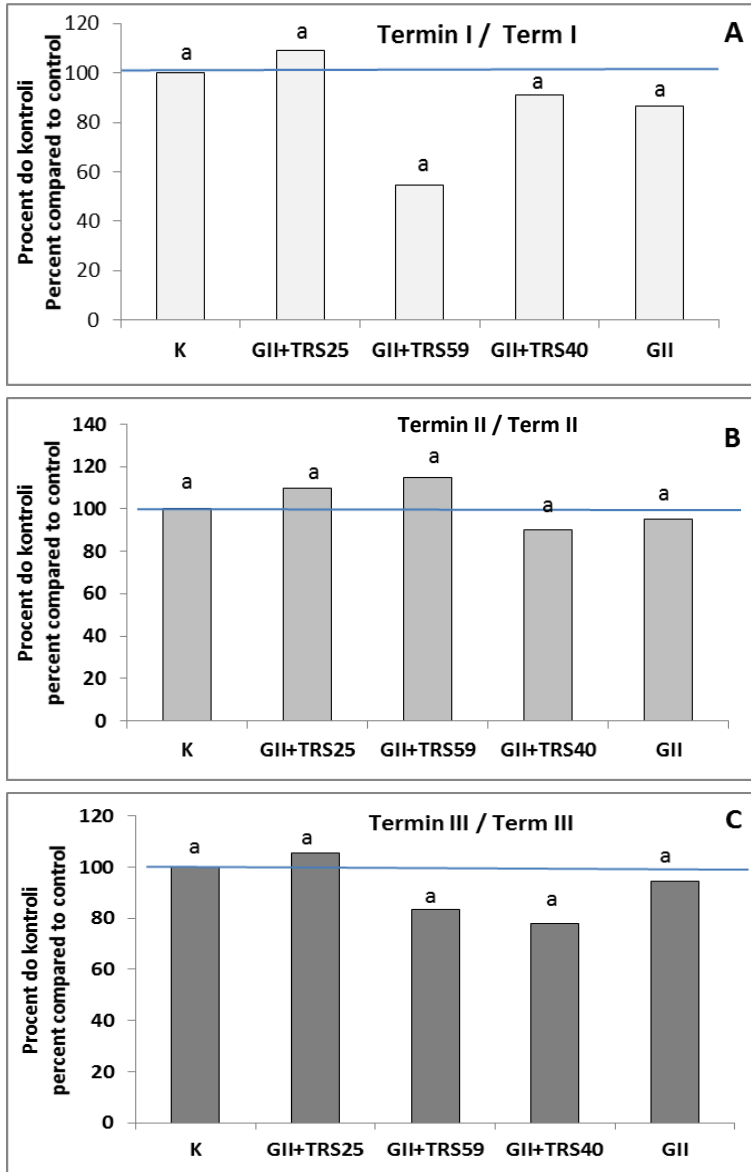
A – Termin I – wysiew bezpośrednio po wymieszaniu gleby z granulataми GII; The term I – sowing the seeds directly after granulates GII application

B – Termin II – wysiew nasion 2 tyg. po wymieszaniu z granulataми GII; The term II – sowing the seeds 2 weeks after granulates GII application

C – Termin III – wysiew 4 tyg. po wymieszaniu gleby z granulataми GII; The term III – sowing the seeds 4 weeks after granulates GII application

Rys. 1. Wpływ granulatów GII przerośniętych izolatami *Trichoderma* TRS25, TRS59, TRS40 na wschody nasion marchwi

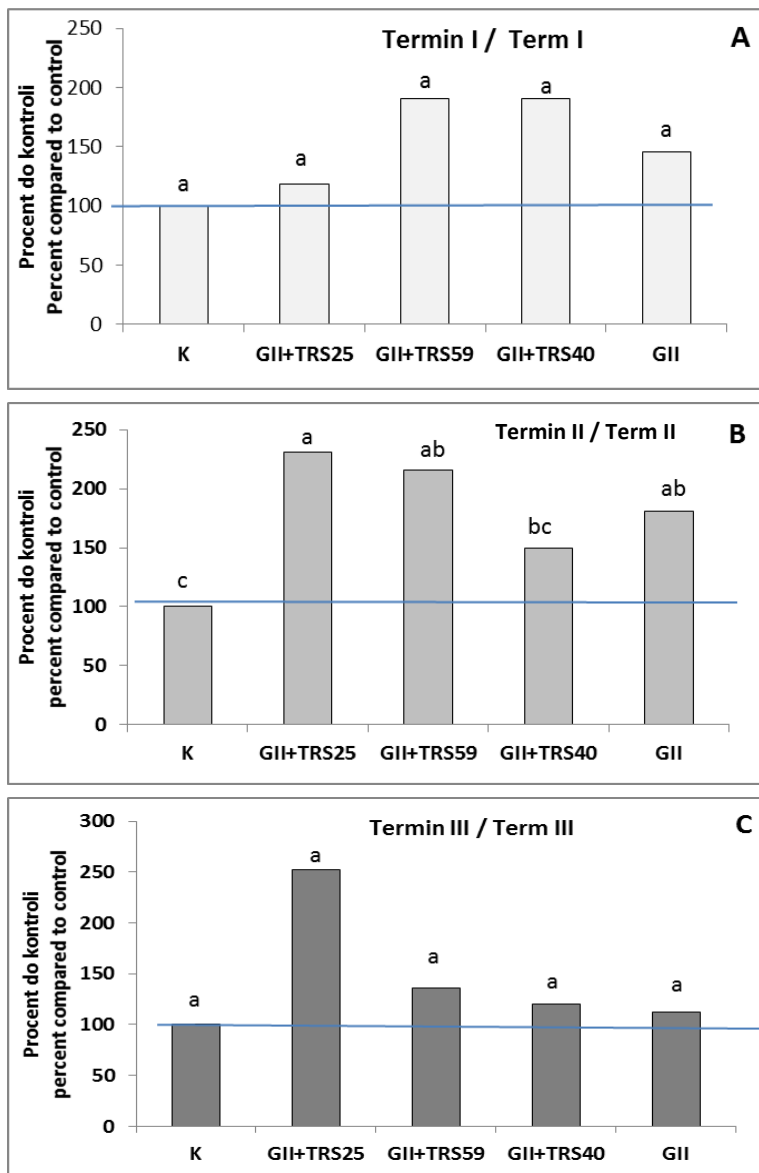
Fig. 1. The effect of GII granulates overgrowing with *Trichoderma* isolates TRS25, TRS59, TRS40 on the carrot seed germination



Objaśnienia jak na rys 1; Explanation see fig. 1

Rys. 2. Wpływ granulatów GII przerośniętych izolatami *Trichoderma* TRS25, TRS59, TRS40 na wschody nasion cebuli

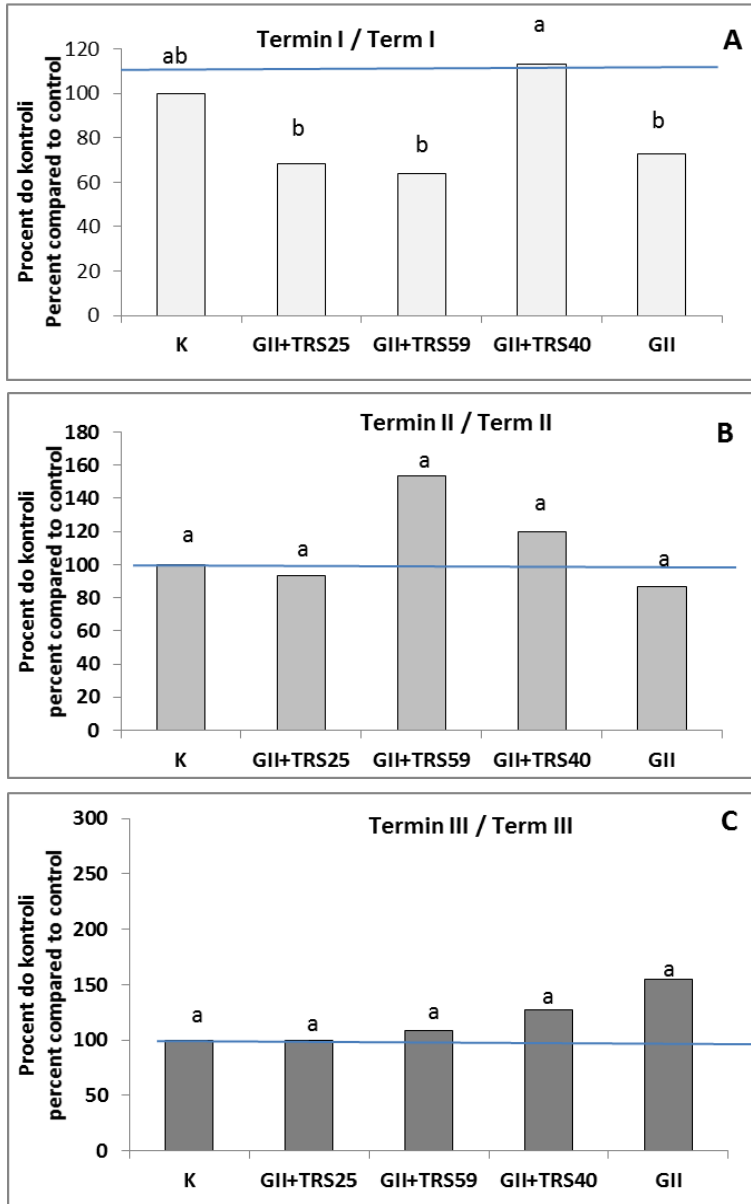
Fig. 2. The effect of GII granulates overgrowing with *Trichoderma* isolates TRS 25, TRS59, TRS40 on the onion seed germination



Objaśnienia jak na rys 1; Explanation see fig. 1

Rys. 3. Wpływ granulatów GII przerośniętych izolatami *Trichoderma* TRS25, TRS59, TRS40 na masę 1 siewki marchwi

Fig. 3. The effect of GII granulates overgrowing with *Trichoderma* isolates TRS 25, TRS59, TRS40 on the mass of 1 carrot plant



Objaśnienia jak na rys 1; Explanation see fig. 1

Rys. 4. Wpływ granulatów GII przerośniętych izolatami *Trichoderma* TRS25, TRS59, TRS40 na masę 1 siewki cebuli

Fig. 4. The effect of GII granulates overgrowing with *Trichoderma* isolates TRS 25, TRS59, TRS40 on the mass of 1 onion plant

Wysiew nasion cebuli bezpośrednio po aplikacji materiałów organicznych wpływał zdecydowanie niekorzystnie na wzrost roślin (rys. 4A). Granulaty GII (bez *Trichoderma*) obniżyły masę siewek cebuli do 72,8%, w porównaniu do roślin kontrolnych. Zastosowanie granulatu przerośniętego *T. atroviride* TRS25 obniżyło masę do 68,2%, a *T. harzianum* TRS59 – do 63,7%. Zdecydowanie na korzyść wyróżniał się izolat *T. atroviride* TRS40. Granulaty przerośnięte tym szczepem istotnie zwiększyły masę cebuli do 113%. Rośliny cebuli, których nasiona wysiano dwa lub cztery tygodnie po zastosowaniu granulatu GII z dodatkiem grzybów *Trichoderma*, nie wykazywały obniżonej masy w porównaniu z roślinami kontrolnymi (rys. 4B,C). W niektórych przypadkach obserwowano znaczny wzrost siewek, jednak nie były to różnice statystycznie istotne. Analizując wpływ samych izolatów *Trichoderma* nie można jednoznacznie stwierdzić, że któryś z nich wykazywał lepsze niż pozostałe szczepy właściwości stymulujące wzrost. Należy jednak zaznaczyć, że nie były to izolaty przypadkowe, ale wcześniej wyselekcjonowane w badaniach pod kątem ich przydatności w uprawie roślin.

Po dodaniu substancji organicznej do gleby zachodzi wiele zjawisk, które oddziałują na rośliny (Joshi i in. 2012; Sołtys i in. 2010). W pierwszym okresie najsilniejszy wpływ toksyczny wykazują związki powstające w trakcie rozkładu białek, wielocukrów, kwasów nukleinowych, związków fenolowych i innych. Ulegają one szybkiemu przekształceniu przez mikroorganizmy glebowe, ale jeżeli występują w dużej ilości mogą ograniczać kiełkowanie nasion i hamować wzrost roślin. Dostarczane do gleby związki organiczne służą także jako źródło pokarmu dla mikroorganizmów bytujących w glebie (Weyman-Kaczmarkowa i Wójcik-Wojtkowiak 1991; Smolińska i Kowalska 2008). Wiele z nich posiada właściwości stymulujące wzrost roślin (bakterie tzw. PGPR) (Saharan i Nehra 2011). W doświadczeniach prezentowanych w tej pracy dochodził jeszcze czynnik dodatkowy, którym były namnożone na materiałach organicznych grzyby *Trichoderma*.

PODSUMOWANIE

Wyniki pokazują, że granulaty GII uzyskane z odpadów organicznych można wykorzystać jako nośniki grzybów z rodzaju *Trichoderma* w uprawach cebuli i marchwi. Należy jednak zaznaczyć, że ze względu na fitotoksyczne właściwości, należy zachować przynajmniej dwutygodniowy odstęp między aplikacją granulatu a wysiewem nasion. Ponadto GII dużo korzystniej wpływał na wzrost siewek marchwi niż cebuli.

Literatura

- Ayongwa G.C., Stomph T.J., Belder P., Leffelaar P.A., Kuyper T.W. 2011. Organic matter and seed survival of *Striga hermonthica* – mechanisms for seed depletion in the soil. *Crop Protection* 30: 1594-1600.
- Bonanomi G., Sicurezza M.G., Caporaso S., Esposito A., Mazzoleni S. 2006. Phytotoxicity dynamics of decaying plant materials. *New Phytologist* 169: 571-578.
- Bonanomi G., Del Sorbo G., Mazzoleni S., Scala F. 2007. Autotoxicity of decaying tomato residues affects susceptibility of tomato to *Fusarium* wilt. *Journal of Plant Pathology* 89: 219-226.
- Bonanomi G., Antignani V., Barile E., Lanzotti V., Scala F. 2011. Decomposition of *Medicago sativa* residues affects phytotoxicity, fungal growth and soil-borne pathogen diseases. *Journal of Plant Pathology* 93: 57-69.
- Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E. i in. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature Reviews Microbiology* 9: 749-759.
- Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology* 158: 17-25.
- Joshi V.K., Kumar A., Kumar V. 2012. Antimicrobial, antioxidant and phytochemicals from fruit and vegetable waste: A review. *International Journal of Food and Fermentation Technology* 2: 123-136.
- Patrick Z.A. 1971. Phytotoxic substances associated with the decomposition in soil of plant residues. *Soil Science* 111: 13-18.
- Politycka B., Wójcik-Wojtkowiak D. 1988. Phytotoxic substances as the cause of sickness of substrates used for many years in cucumber growing. *Roczniki AR w Poznaniu* 189: 147-157.
- Saharan B.S., Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Science and Medicine Research* 21: 1-30.
- Smolińska U., Kowalska B. 2008. Wpływ organicznych materiałów z roślin *Brassicaceae* i *Solanaceae* oraz *Trichoderma harzianum* na rozwój *Verticillium dahliae* Kleb. *Vegetable Crops Research Bulletin* 69: 93-104.
- Smolińska U., Kowalska B., Kowalczyk W., Szczech M. 2014. The use of agro-industrial wastes as carriers of *Trichoderma* fungi in the parsley cultivation. *Scientia Horticulturae* 179: 1-8.
- Smolińska U., Kowalczyk W. 2014. The impact of the Brassicaceae plant materials added to the soil on the population of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. and *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Journal of Horticultural Research* 22: 123-129. DOI: 10,2478/johr-2014-0015.
- Sołtys D., Dębska K., Bogatek R., Gniazdowska A. 2010. Autotoksyczność roślin jako przykład oddziaływań allelopatycznych. *Kosmos* 59: 551-565.
- Stewart A., Hill R. 2014. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. W: Gupta V.K., Schmoll M., Herrera-Estrella A., Upadhyay R.S.,

Druzhinina I., Tuohy M.G., Biotechnology and biology of *Trichoderma*. Elsevier, s. 415-428.

Weyman-Kaczmarkowa W., Wójcik-Wojtkowiak D. 1991. The dynamics of microflora and the occurrence of phytotoxic substances in different soils with corn residues and inorganic nitrogen. *Plant and Soil* 132: 11-20.

Badania były finansowane w ramach projektu pt. „Polskie szczepy *Trichoderma* w ochronie roślin i zagospodarowaniu odpadów organicznych” współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Regionalnego w ramach Działania 1.3 Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, Poddziałanie 1.3.1, umowa nr: UDA-POIG.01.03.01-00129/9-09.