



Wpływ herbicydu Attribut 70 WG na aktywność fizjologiczną wybranych grzybów entomofagicznych

Kinga Mazurkiewicz-Zapałowicz¹, Wiera Michalcewicz²,
Ryszard Miętkiewski³, Krystyna Janowicz⁴, Lila Daraż¹

¹ Zakład Hydrobiologii, Akademia Rolnicza, Szczecin

² Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiska, Akademia Rolnicza, Szczecin

³ Katedra Ochrony Roślin, Akademia Podlaska, Siedlce

⁴ Katedra Entomologii Stosowanej, Akademia Rolnicza, Szczecin

The effect of Attribut 70 WG herbicide on physiological activity of selected entomophagous fungi

Summary

In vitro examination has been carried out to determine the influence of sodium propoxycarbazon, an active ingredient of Attribut 70 WG herbicide, in a dose of 1,10,100 and 1000 ppm on the growth, sporulation, respiration and lipolytic and proteolytic activities of *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch and *Metarrhizium flavoviride* Gams et Rozsypol mycelia. A specific response of each strain to the contact with the tested herbicide was found. Higher concentrations of Attribut 70 WG (100 and 1000 ppm) stimulated *M. flavoviride* sporulation, whereas they significantly reduced the reproductive potentials of *B. brongniartii*. However, the contact of *B. brongniartii* with higher doses of Attribut 70 WG had an effect on significant increase of lipolytic and proteolytic activities of that entomophage. Such a response is very indicated for soil ecosystem, as it may be employed in biological plant protection in which *B. brongniartii* is a very valuable fungi species that produces epizootics of numerous plant pest insects.

Key words:

entomopathogenic fungi, proteolytic and lipolytic activity.

Adres do korespondencji

Kinga
Mazurkiewicz-Zapałowicz,
Zakład Hydrobiologii,
Akademia Rolnicza,
ul. Kazimierza Królewicza 4,
71-550 Szczecin.

1. Wstęp

Grzyby entomofagiczne należą do wyjątkowo cennych w każdej biocenozie gleby, ponieważ w sposób naturalny redukują populacje wielu szkodników roślin uprawnych. Badania wpływu herbicydów na grzyby entomofagiczne są nieliczne, mimo że zużycie tych środków wzrasta z roku na rok, a do gleby wprowadzane są coraz to nowe związki o wysokiej aktywności biologicznej w stosunku do żyjącej tam mikroflory. Wyniki dotychczasowych doświadczeń, prowadzonych zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i wazonowych, wskazują jednak na możliwości ograniczania rozwoju grzybów entomofagicznych przez preparaty ochrony roślin (1,2). Dodatkowo stwierdzono, że fungistatyczne działanie pestycydów wywołuje zmiany w strukturze i barwie kolonii entomofagów (3-5). W znacznie mniejszym zakresie poznano natomiast reakcje fizjologiczne, w tym aktywność hydrolityczną mikroorganizmów entomofagicznych w obecności środków chwastobójczych.

Celem pracy było określenie wpływu propoksykarbazonu sodowego – s.a. herbicydu Attribut 70 WG nie tylko na wzrost liniowy i zarodnikowanie, ale także na właściwości proteolityczne, lipolityczne oraz intensywność oddychania szczepów dwóch gatunków grzybów entomofagicznych: *Beauveria brongniartii* i *Metarrhizium flavoviride*. Do tej pory nie prowadzono bowiem żadnych badań dotyczących oddziaływania propoksykarbazonu sodowego, na drobnoustroje glebowe oraz ich właściwości, podczas gdy zakres stosowania tego herbicydu jest coraz powszechniejszy i obejmuje ciągle nowe rośliny uprawne (6,7).

2. Materiał i metody

W badaniach wykorzystano szczepy grzybów entomofagicznych: *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch i *Metarrhizium flavoviride* Gams et Rozsypol., wyizolowane z zainfekowanych owadów. Patogeniczność badanych szczepów wymienionych gatunków grzybów sprawdzono na larwach barciaka większego (*Galleria mellonella* L.).

Jako materiał wykorzystano także Attribut 70 WG – nowy herbicyd o działaniu układowym, stosowany przeciw chwastom jednoliściennym, w uprawach pszenicy, w dawce 60 g/ha. Preparat otrzymano z firmy Bayer Crop Science.

Oddziaływanie fungistatyczne i fungicydalne Attributu 70 WG oceniono na podstawie określenia wpływu różnych dawek (1; 10; 100 oraz 1000 ppm) propoksykarbazonu sodowego, na aktywność fizjologiczną *B. brongniartii* i *M. flavoviride*. Spośród testowanych stężeń dawką zbliżoną do zalecanej w praktyce jest 100 ppm.

2.1. Badanie wpływu propoksykarbazonu sodowego na wzrost i zarodnikowanie grzybni

Do standardowego podłoża PDA dodano s.a. Attributu 70 WG w stężeniach odpowiednio: 1; 10; 100 i 1000 ppm i rozlano do szalek Petriego. W centrum każdej z nich umieszczano inokulum grzybni *B. brongniartii* i *M. flavoviride*. Każdą kombinację wykonano w 5 powtórzeniach. Kontrolę (0 ppm) stanowił rozwój grzybni na podłożu PDA bez herbicydu. W wynikach oceniono końcowy rozwój kolonii grzybni po 21 dniach inkubacji w testowanych dawkach herbicydu. Jako parametry charakteryzujące rozwój grzybni przyjęto średnią średnicę wzrostu liniowego oraz średnią sporulację (8).

2.2. Badanie wpływu propoksykarbazonu sodowego na intensywność oddychania grzybni

Badania intensywności oddychania grzybni szczepów *B. brongniartii* i *M. flavoviride* przeprowadzono wykorzystując 21-dniowe kultury inkubowane na podłożu PDA z dodatkiem s.a. Attributu 70 WG. Pomiar oddychania wykonano za pomocą analizatora CO₂ Ultragas U4S firmy Wösthoff. Z każdej, wymienionej kombinacji wycinano krążki grzybni o masie 1 g, które umieszczano w kolumnach pomiarowych analizatora. Wydzielanie dwutlenku węgla rejestrowano w sposób ciągły przez 3 godziny. Następnie mierzono wielkość pików krzywej CO₂ oraz, według skali umieszczonej w rejestratorze, przeliczono długość pików na mg CO₂/dobę/ 100 g grzybni.

2.3. Badanie wpływu propoksykarbazonu sodowego na właściwości hydrolytyczne grzybów

Właściwości lipolityczne *B. brongniartii* i *M. flavoviride* w obecności herbicydu Attribut 70 WG, badano na podstawie hydrolizy tributyriny w pożywce standardowej sporządzonej wg Burbianki i in. (9), a właściwości proteolityczne tych grzybów oceniono na podstawie hydrolizy odtłuszczonego mleka w pożywce standardowej sporządzonej wg Kędzi i Koniar (10).

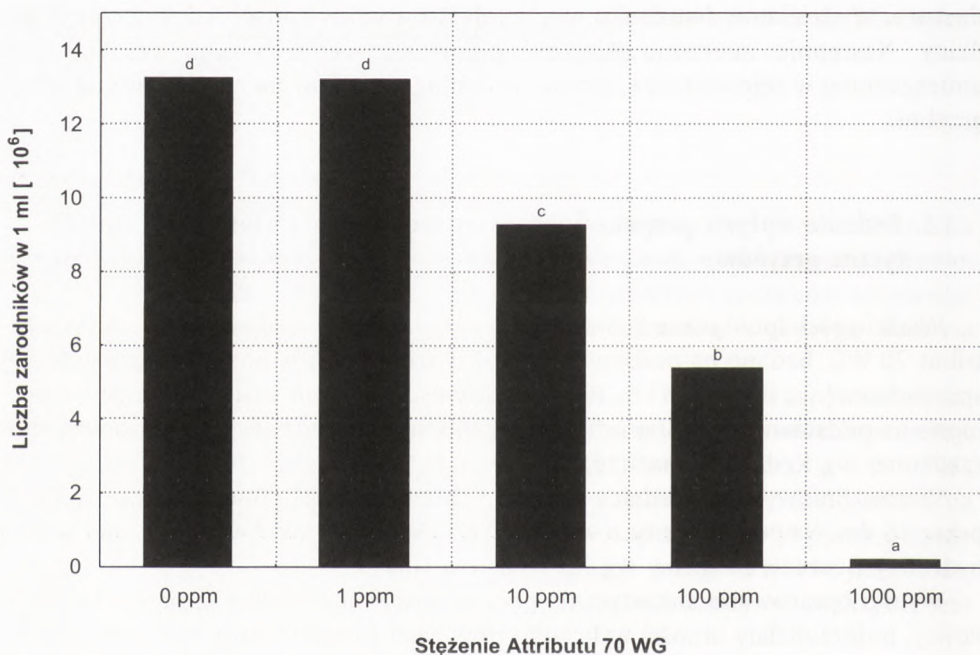
Wzrost liniowy oraz średnicę hydrolizy tłuszczu i białka odczytywano co 3 dni, przez 16 dni. Na podstawie tych wyników, po 16. dniach inkubacji obliczono indeks hydrolizy tłuszczu i kazeiny wg Ho i Fostera (11).

Wyniki opracowano statystycznie przy zastosowaniu analizy wariancji 1-czynnikowej, półprzedziały ufności wyliczono przy zastosowaniu testu Newmana-Keulsa, przy poziomie istotności 0,05. Wyniki nie różniące się statystycznie oznaczono na rysunkach takimi samymi literami.

3. Wyniki i dyskusja

Stwierdzone w badaniach fakty dowodzą, że wrażliwość *B. brongniartii* i *M. flavoviride* na s.a. Attributu 70 WG jest różna i przejawiać się może w specyficznej modyfikacji wielu czynności metabolicznych tych grzybów. Charakter rozwoju *B. brongniartii* (w wielu punktach podłoża) nie pozwolił na jednoznaczne określenie **wzrostu liniowego**. W badaniach wykazano natomiast, że stężenia propoksykarbazonu sodowego 1; 10 i 100 ppm stymulują wzrost liniowy grzybni *M. flavoviride* o ponad 10%, w porównaniu z kombinacją kontrolną. Nieznaczne (5%) ograniczenie rozwoju kolonii *M. flavoviride* stwierdzono jedynie podczas hodowli tego gatunku na podłożu wzbogaconym 1000 ppm s.a. Attributu 70 WG.

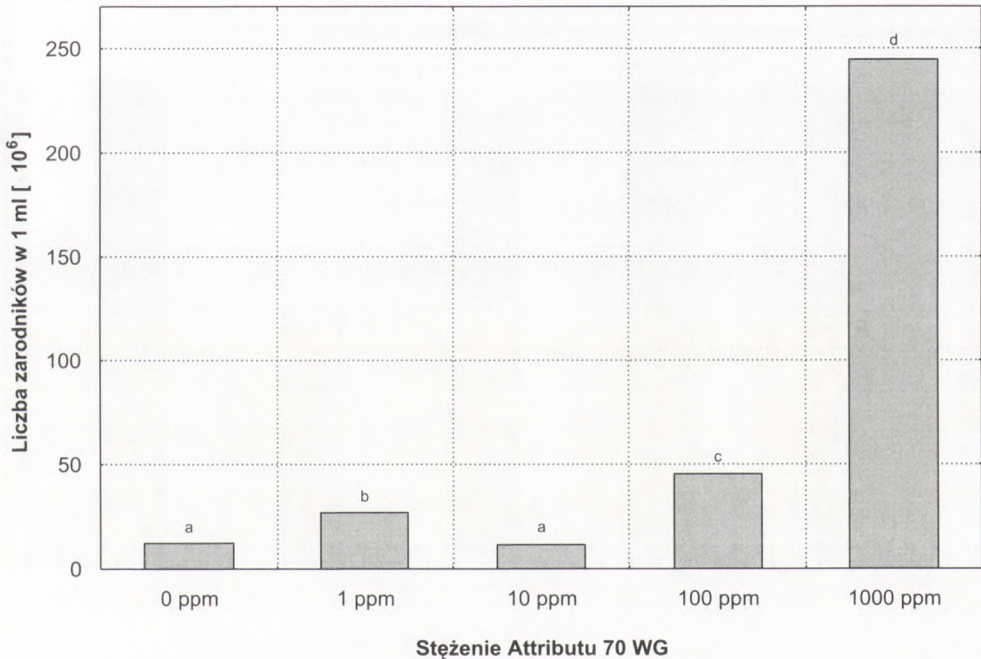
W warunkach *in vitro*, wykazano, że **liczba zarodników** wytwarzanych zarówno przez *B. brongniartii* jak i *M. flavoviride* zmieniała się pod wpływem zróżnicowanych dawek Attributu 70 WG. W odniesieniu do *B. brongniartii* stwierdzono, że zarodnikowanie tego gatunku jedynie w kombinacji ze stężeniem 1ppm Attributu 70 WG, jest identyczne jak w kombinacji kontrolnej. Udowodniono natomiast, że wyższe stężenia s.a. tego herbicydu, powodują istotne ograniczenie możliwości reprodukcyjnych *B. brongniartii* w porównaniu z kontrolą (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ zróżnicowanych dawek propoksykarbazonu sodowego – s.a. Attributu 70 WG na zarodnikowanie grzybni *Beauveria brongniartii*.

Gatunek *M. flavoviride* na kontakt z Attributem 70WG reagował wprost przeciwnie. Stwierdzono bowiem wysoce istotną stymulację sporulacji tego entomofaga w kontakcie ze stężeniami 100 i 1000 ppm s.a. Attributu, w porównaniu z kombinacją kontrolną (rys. 2). Reakcja taka może wynikać z maksymalnej reprodukcji, którą preferują organizmy w warunkach stresowych, o czym w odniesieniu do innych grzybów nadmieniali już Lilly i Barnett (12). Taka modyfikacja rozwoju świadczyć może jednocześnie o dużej odporności *M. flavoviride* na propoksykarbendazon sodowy.

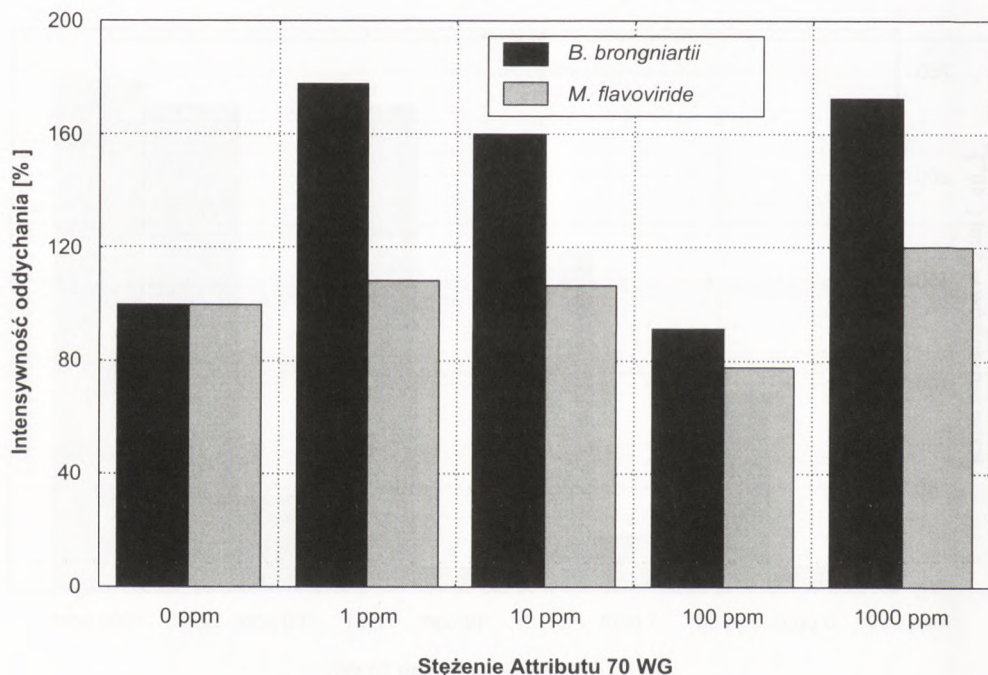
W doświadczeniu *in vitro* wykazano zróżnicowanie intensywności oddychania porównywanych szczepów *B. brongniartii* i *M. flavoviride* w efekcie ich kontaktu z Attributem 70 WG. Stwierdzono, że w warunkach kontrolnych *B. brongniartii* wydziela około 22% więcej CO₂ niż *M. flavoviride*. Natomiast obecność herbicydu w stężeniach 1;10 i 1000 ppm spowodowała zwiększenie intensywności oddychania grzybni obu szczepów od ok. 20 do 80% w porównaniu z kombinacją kontrolną (rys. 3). W odniesieniu do *B. brongniartii* wzrost wydzielania CO₂ na podłożu z propoksykarbazonem sodowym był większy niż w przypadku *M. flavoviride*. Jedynie na podłożu z herbicydem w stężeniu 100 ppm szczepy *M. flavoviride* i *B. brongniartii* charakteryzowały się zmniejszoną o około 30% intensywnością oddychania. Podobne wyniki, związane



Rys. 2. Wpływ zróżnicowanych dawek propoksykarbazonu sodowego – s.a. Attributu 70 WG na zarodnikowanie *Metarrhizium flavoviride*.

z obniżeniem wydzielania dwutlenku węgla, uzyskano w efekcie oddziaływania różnych stężeń oxadiagrylu (s.a. preparatu EXP 400 S.C.) na inne gatunki grzybów – *Trichocladium asperum* i *Trichoderma viride* (13). Uzyskana w badaniach stymulacja oddychania *M. flavoviride* w kombinacji z 1000 ppm s.a. Attributu 70 WG, związana jest z maksymalną liczbą zarodników tworzonych przez szczep tego grzyba. Takie zależności w fizjologii grzybów potwierdzają Lilly i Barnett (12), a otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że także szereg innych substancji chemicznych znajdujących się w glebie może wzmacniać procesy metaboliczne mikroorganizmów.

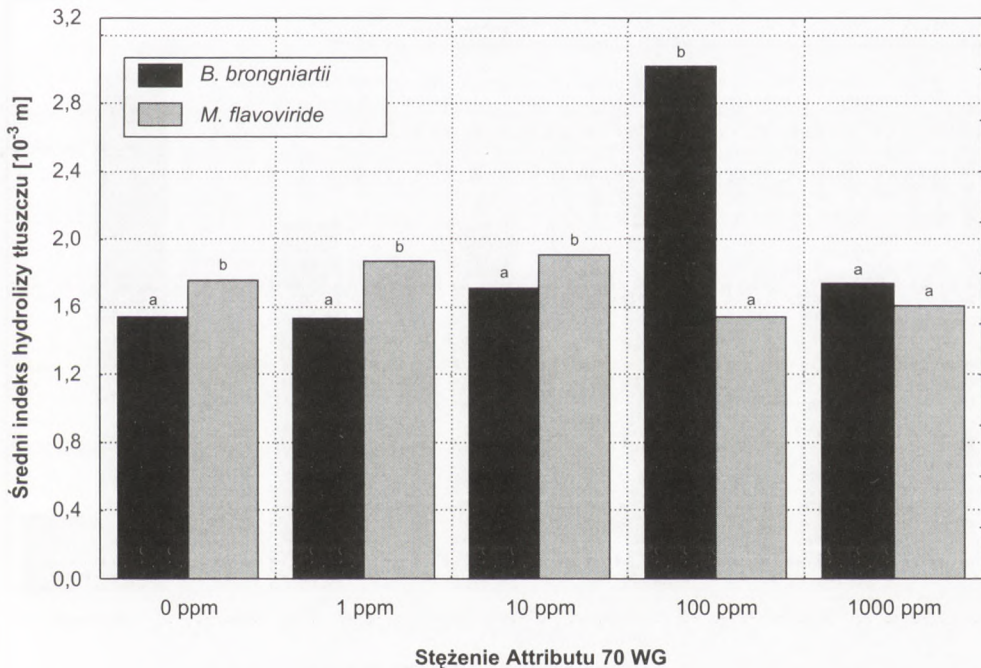
W badaniach wykazano, że zarówno *B. brongniartii* jak i *M. flavoviride* w warunkach kontrolnych mają silniejsze **właściwości lipolityczne** aniżeli **proteolityczne**, o czym świadczy większy indeks hydrolizy tłuszczu niż białka. Jednocześnie udowodniono, że kombinacja kontrolna *M. flavoviride* charakteryzuje się większą aktywnością lipolityczną i proteolityczną aniżeli *B. brongniartii* (rys. 4 i 5). Właściwości hydrolityczne testowanych grzybów entomofagicznych modyfikuje jednak kontakt z Attributem 70 WG. Stwierdzono bowiem, że *M. flavoviride* nie zmienia istotnie intensywności rozkładu tłuszczu jedynie w kontakcie ze stężeniami 1 i 10 ppm s.a. tego herbicydu, podczas gdy działanie 100 i 1000 ppm s.a. Attributu już istotnie ha-



Rys. 3. Wpływ zróżnicowanych dawek propoksykarabazonu sodowego – s.a. Attributu 70 WG na intensywność oddychania w odniesieniu do kontroli [100%].

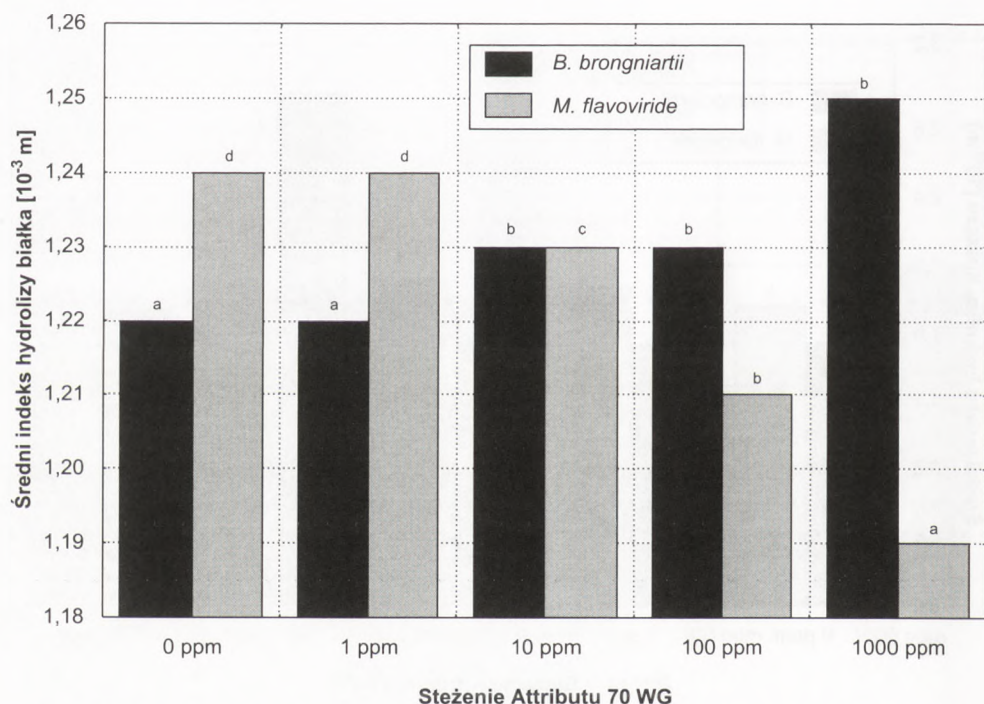
muje rozkład lipidów przez *M. flavoviride*, w porównaniu z kombinacją kontrolą i niższymi stężeniami propoksykarbazonu sodowego (rys. 4). Podobny wpływ hamujący hydrolizę tłuszczu przez *Rhizoctonia solani* wykazał herbicyd Titus 25 DF (14). Ograniczenie tych właściwości u *M. flavoviride* ma istotne znaczenie, ze względu na charakter patogenezę wywołaną przez ten gatunek na zakażonych stawonogach (15). Patogeneza i rozwój zooksemii możliwy jest jedynie po skutecznej infekcji i wnikięciu strzępek grzybni do ciała owada, co gwarantują enzymy hydrolityczne rozpuszczające złożoną strukturę oskórka (16). Z tych samych powodów cenna jest, jak się wydaje, stymulacja właściwości lipolitycznych *B. brongniartii* w stężeniu 100 ppm s.a. Attributu 70 WG, w porównaniu z kombinacją kontrolą i pozostałymi stężeniami preparatu (rys. 4). Fakt ten jest szczególnie istotny, ponieważ stężenie 100 ppm odpowiada dawkom połowym zalecanym przez producenta. Dowodzi to jednocześnie minimalnego, negatywnego wpływu zalecanych dawek herbicydu na tego ważnego w ekosystemie entomofaga.

Obecność Attributu 70 WG w stężeniach s.a. od 10 ppm w podłożu, stymuluje także aktywność proteolityczną *B. brongniartii*, podczas gdy te same stężenia propoksykarbazonu sodowego istotnie hamują rozkład białka przez *M. flavoviride*, w porównaniu z kombinacją kontrolną (rys. 5).



Rys. 4. Wpływ zróżnicowanych dawek propoksykarbazonu sodowego – s.a. Attributu 70 WG na właściwości lipolityczne *Beauveria brongniartii* i *Metarrhizium flavoviride*.

Uzyskane wyniki dowodzą, że *M. flavoviride* jest bardziej wrażliwy na obecność wyższych dawek propoksykarbazonu sodowego aniżeli *B. brongniartii*, co wyraża się modyfikacją wielu parametrów fizjologicznych tego grzyba, świadczących o ograniczeniu jego aktywności biologicznej. Ciekawa i godna dalszych, interdyscyplinarnych badań jest stymulacja właściwości hydrolitycznych *B. brongniartii* przez Attribut 70 WG. Wpływ taki może wzmacniać naturalny opór środowiska i stanowić istotny, dynamiczny element w biologicznej ochronie roślin przed szkodnikami. W uzyskanych wynikach po raz kolejny potwierdza się, że dogłębowa aplikacja herbicydów wywołuje często trudne do przewidzenia reakcje drobnoustrojów, co w dużym stopniu zmieniać może życie gleby. Istotne jest aby te zmiany wszechstronnie poznawać, co umożliwi wykorzystanie niektórych z nich w biologicznej ochronie roślin.



Rys. 5. Wpływ zróżnicowanych dawek propoksykarbazonu sodowego – s.a. Attributu 70 WG na właściwości proteolityczne *Beauveria brongniartii* i *Metarrhizium flavoviride*.

Literatura

1. Bajan C., Kmitowa K., (1982), *Pol. Ecol. Stud.*, 8(3-4), 489-497.
2. Gardner W. A., Story G. K., (1985), *J. Econ. Ent.*, 78, 1275-1279.
3. Miętkiewski R., Sapięha A., Miętkiewska Z., (1989-1990), *Acta Mycol.*, 25(2), 35-50.
4. Miętkiewski R., Miętkiewska Z., Sapięha A., (1991), *Z. Nauk. WSRP Siedlce*, 29, 215-228.
5. Sapięha A., Miętkiewski R., (1991-1992), *Acta Mycol.*, 27 (2), 189-195.
6. Adamczewski K., Banaszak K., Snarska K., (2000), *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin*, 40(2), 774-775.
7. Adamczewski K., Paradowski A., (2002), *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin*, 42 (2), 501-504.
8. Kiraly Z., Klement Z., Solymosy F., Vörös J., (1977), *Fitopatologia. Wybór metod badawczych*, PWRiL, Warszawa.
9. Burbianka M., Pliszka A., Janczura E., Teisseyra T., Zaleńska H., (1971), *Mikrobiologia żywności*, PZWL, Warszawa.
10. Kędzia W., Koniar H., (1974), *Diagnostyka mikrobiologiczna*, PZWL, Warszawa.
11. Ho H. H., Foster B., (1972), *Mycopath. et Mycol. Appl.*, 46(4), 335-339.
12. Lilly V. G., Barnett H. L., (1959), *Fizjologia grzybów*, PWRiL, Warszawa.
13. Mazurkiewicz-Zapałowicz K., Janowicz K., Nowak A., (1998), *Ekologiczne aspekty mikrobiologii gleby*, Wyd. AR, Poznań, 199-204.
14. Mazurkiewicz-Zapałowicz K., Janowicz K., Niedzielska A., (1997), *Drobnoustroje w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie*, Kraków, 457-466.
15. Müller-Kögler E., (1965), *Pilzkrankheiten bei Insekten*, Berlin, Hamburg.
16. Samsňáková A., Mišikova S., (1973), *Čes. Mykol.*, 27(1), 55-60.