

Mycosis – increasing threat to buxus and the effect of some of natural compounds and attempts at their control

Mikozy – narastające zagrożenie dla bukszpanu oraz przydatność niektórych naturalnych substancji w ich zwalczaniu

Halina Kurzawińska¹, Małgorzata Nadziakiewicz¹, Piotr Muraś²

Summary

The most dominant fungi, isolated from the diseased shoots of *Buxus sempervirens* cultivar Suffruticosa included: *Pestalotia sydowniana*, *Alternaria alternata* and *Volutella buxi*. From diseased roots the following species were most numerous isolated: *Phytophthora cactorum*, *P. cinnamomi*, *Fusarium avenaceum* and *F. oxysporum*. From diseased leaves the most frequent isolates were: *Macrophoma candollei* and *Volutella buxi*. The obtained overall research results indicated a complex participation of phytopathogenes in the infection process. In the laboratory experiments it was shown, that among the tested fungi, the most infective to *Buxus* were *F. avenaceum* and *A. alternata*. Fungistatic activity expressed as a percentage of mycelium growth inhibition depended on the test preparation, its concentration and the tested fungus. Prev-AM 060 SL (active substance – orange oil) showed the best fungistatic activity against *A. alternata*, *F. avenaceum* and *P. sydowniana*.

Key words: *Buxus sempervirens*, isolation, microorganism pathogenicity, biocontrol agents, fungistatic activity

Streszczenie

Najczęściej izolowanymi z chorych pędów bukszpanu wieczniezielonego odmian Suffruticosa były: *Pestalotia sydowniana*, *Alternaria alternata* i *Volutella buxi*. Z chorych korzeni tej rośliny izolowano najliczniej: *Phytophthora cactorum*, *P. cinnamomi*, *Fusarium avenaceum* i *F. oxysporum*. Natomiast z chorych liści najliczniej wyisobnionymi były: *Macrophoma candollei* i *Volutella buxi*. Uzyskane wyniki wskazują na kompleksowy udział fitopatogenów w procesie chorobowym. W doświadczeniach laboratoryjnych z przebadanych gatunków grzybów najbardziej patogenicznymi okazały się izolaty *F. avenaceum* i *A. alternata*.

Aktywność fungistatyczna wyrażona procentem zahamowania wzrostu grzybnii zależała od badanego preparatu, jego stężenia i testowanego grzyba. Spośród środków biotechnicznych Prev-AM 060 SL (substancja aktywna – olej z pomarańczy) charakteryzował się najlepszą aktywnością fungistatyczną zarówno w stosunku do *A. alternata*, *F. avenaceum*, jak i *P. sydowniana*.

Słowa kluczowe: bukszpan wieczniezielony, izolacja, mikroorganizmy, patogeniczność, preparaty zawierające naturalne substancje, fungistatyczna aktywność

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja
Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

¹ Katedra Ochrony Roślin
h.kurzawinska@ogr.ur.krakow.pl

² Katedra Dendrologii i Architektury Krajobrazu

Wstęp / Introduction

Bukszpan wieczniezielony (*Buxus sempervirens*) stosowany jest przede wszystkim na formowane, strzyżone żywopłoty, obwódki rabat i alejek, jest idealny do formowania wszelkiego rodzaju form geometrycznych (najczęściej stożka, kuli, walca). Ma wiele odmian, do popularnych należy odmiana *Suffruticosa*, która tworzy drobne, jajowate liście o długości 1–2 cm i odznacza się gęstym wzrostem.

Patogeny grzybowe stanowią poważną przyczynę degradacji walorów dekoracyjnych krzewów liściastych, w tym również bukszpanu. Z dostępnej literatury wynika, że do często występujących mikoz na bukszpanie należą: zamieranie pędów powodowane przez *Volutella buxi*, zamieranie pędów i liści wywoływane przez *Macrophoma candollei*, fytoftorę powodowaną przez *Phytophthora* spp. oraz biała plamistość liści – *Mycosphaerella patouillardii*. Pod koniec lata 2010 roku zaobserwowano na liściach, pędach i systemie korzeniowym 2-letniego bukszpanu wieczniezielonego odmiany *Suffruticosa* wyraźne zmiany chorobowe. Na różnej wysokości pędów widoczne były brązowe, szybko powiększające się plamy. Na niektórych krzewach nekroza była u podstawy pędu. Na chorych liściach widać było dość ostro zarysowane jasnobrązowe plamy z ciemnobrunatną obwódką. Na niektórych po spodniej stronie był białoróżowy nalot. Blaszkki liściowe wędły i zasychały.

Celem badań było wyizolowanie i zidentyfikowanie czynników powodujących opisane objawy oraz ocena *in vitro* skuteczności wybranych preparatów zawierających naturalne substancje: Biochikol 020 PC (substancja aktywna – s.a. chitosan), Prev-AM 060 SL (s.a. olej z pomarańczy) i HF-Mycol (s.a. ekstrakt z kopru włoskiego) w ograniczeniu wzrostu liniowego grzybów potencjalnie patogenicznych: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* i *Pestalotia sydowniana*. Jako preparat standardowy zastosowano Amistar 250 SC (s.a. azoksystrobina).

Materiały i metody / Materials and methods

Materiał do badań pochodził ze szkółki zlokalizowanej na terenie południowej Polski. W latach 2010–2011 z chorego pędu, systemu korzeniowego i liści bukszpanu wieczniezielonego odmiany *Suffruticosa* pobierano niewielkie fragmenty na pograniczu nekroz i tkanki zdrowej (około 3 mm). Materiał ten dezynfekowano 70% roztworem alkoholu etylowego przez 5 minut, płukano w sterylnej wodzie destylowanej i osuszano w sterylnej bibule filtracyjnej. Odkazone fragmenty wykładano po 5 sztuk na zestaloną w szalkach Petriego pożywkę glukozowo-ziemniaczaną PDA (Potato Dextrose Agar). Wyrastające kultury grzybów odszczepiano sukcesywnie na skosy, również z pożywką PDA. Wybrane reprezentatywne kultury identyfikowano, posługując się dostępnymi kluczami mikologicznymi i monografiami (Booth 1971; Domsch i wsp. 1980; Nelson i wsp. 1983; Ellis i Ellis 1985; Kwaśna i wsp. 1991).

Do badań nad chorobotwórczością wybrano: *A. alternata*, *F. avenaceum* i *P. sydowniana* mające największy

udział procentowy w zasiedlaniu chorego bukszpanu. Około 5-centymetrowej długości części pędów bukszpanu wieczniezielonego odmiany *Suffruticosa* układano w kuwetach wyłożonych wilgotną bibulą filtracyjną. Na uszkodzone mechanicznie pędy nakładano krążki pożywki o średnicy 3 mm przerośnięte grzybnia 14-dniowych kultur, na pożywcę PDA. Kuwety przykryto szczelnie cienką folią. Doświadczenie założono w 4 powtórzeniach po 5 pędów. Miara patogeniczności była powierzchnia nekrozy powodowanej przez poszczególne gatunki grzybów, którą mierzono po 7 dniach inokulacji w temperaturze 22–23°C.

Wpływ preparatów zawierających naturalne substancje na wzrost liniowy grzybni *A. alternata*, *F. avenaceum* i *P. sydowniana* wykonano w warunkach *in vitro*. Badanymi środkami były: Biochikol 020 PC w stężeniach: 2,0; 4,0; 6,0%; Prev-AM 060 SL w stężeniach: 0,2; 0,4; 0,6%; HF-Mycol w stężeniach: 0,2; 0,4; 0,6%; Amistar 250 SC w stężeniach: 0,05; 0,1; 0,2%. Do płynnej pożywki PDA dodawano odpowiednie ilości środków, po czym rozlewano ją do szalek Petriego. Po zestaleniu się pożywki wykładano krążek agar o średnicy 5 mm przerośnięty grzybnia odpowiedniego gatunku grzyba testowego. W kombinacji kontrolnej grzyby hodowano na pożywce nie zawierającej środka. Doświadczenie zakładano w 5 powtórzeniach. Od drugiego dnia po inokulacji codziennie (aż do zarośnięcia całej powierzchni szalek w kombinacji kontrolnej) mierzono średnicę kolonii. Miara aktywności patogenu był procent zahamowania wzrostu grzybni na pożywce ze środkiem w stosunku do wzrostu na pożywce kontrolnej. Fungistatyczna aktywność działania badanych środków była obliczana za pomocą wzoru Abbota (Borecki 1984). Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji. Istotność różnic między kombinacjami oceniano na podstawie testu Duncana przy $p = 0,05$.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Z chorych roślin bukszpanu wieczniezielonego odmiany *Suffruticosa* wyizolowano ogółem 143 kolonie grzybów i organizmów grzybopodobnych. Chore pędy bukszpanu zasiedlone były głównie przez grzyby, wśród nich najliczniej wyodrębnionymi były: *P. sydowniana* (19,3%), *A. alternata* (15,8%) i *Volutella buxi* (14,0%). Mniej licznie wyisobniono organizmy grzybopodobne rodzaju *Phytophthora*, reprezentowane przez gatunki: *P. cactorum* (7,0%) i *P. cinnamomi* (5,3%) (tab. 1). Gatunki te liczniej były izolowane z chorych korzeni bukszpanu, każdy po 15,0%. Ponadto w takim samym procencie wyizolowano z korzeni grzyby rodzaju *Fusarium* reprezentowane przez *F. avenaceum* i *F. oxysporum* (tab. 1). Natomiast z chorych liści bukszpanu wyizolowano najliczniej: *Macrophoma candollei* (26,0%), *V. buxi* (22,0%). Mniej licznie wyisobniono: *F. buxicola* (8,7%), *Cylindrocladium* spp. i *A. alternata* – każdy po 6,5% (tab. 1). Stompor-Chrzan i Gargala (2011) stwierdziły wysoki procent izolatów grzybów rodzaju *Fusarium* wyisobnionych z liści bukszpanu. Szczególnie bardzo wysoką frekwencję odnotowały w przypadku *F. buxicola*, uznając go za głównego sprawcę symptomów chorobowych

Tabela 1. Mikroorganizmy wyizolowane z chorych roślin bukszpanu wieczniezielonego (średnia z lat 2010–2011)
Table 1. Microorganisms isolated from diseased *B. sempervirens* (mean for 2010–2011)

Rodzaj/Gatunek Genus/Species	Pędy – Shoots		Korzenie – Roots		Liście – Leaves	
	liczba kolonii number of colonies	[%]	liczba kolonii number of colonies	[%]	liczba kolonii number of colonies	[%]
<i>Alternaria alternata</i>	9	15,8	3	7,5	3	6,5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	–	–	–	–	2	4,3
<i>Cylindrocladium</i> spp.	2	3,5	–	–	3	6,5
<i>Fusarium avenaceum</i>	2	3,5	6	15,0	2	4,3
<i>F. buxicola</i>	–	–	–	–	4	8,7
<i>F. lateritium</i>	2	3,5	2	5,0	1	2,2
<i>F. oxysporum</i>	3	5,3	6	15,0	–	–
<i>Humicola fuscoatra</i> var. <i>fuscoatra</i>	–	–	2	5,0	1	2,2
<i>Macrophoma candollei</i>	5	8,8	–	–	12	26,0
<i>Penicillium</i> spp.	–	–	2	5,0	4	8,7
<i>Pestalotia sydowiana</i>	11	19,3	–	–	2	4,3
<i>Phoma medicaginis</i>	4	7,0	–	–	–	–
<i>Phytophthora cactorum</i>	4	7,0	6	15,0	–	–
<i>P. cinnamomi</i>	3	5,3	6	15,0	–	–
<i>P. citricola</i>	–	–	2	5,0	–	–
<i>Trichoderma</i> spp.	4	7,0	5	12,5	2	4,3
<i>Volutella buxi</i>	8	14,0	–	–	10	22,0
Razem – Total	57	100,0	40	100,0	46	100,0

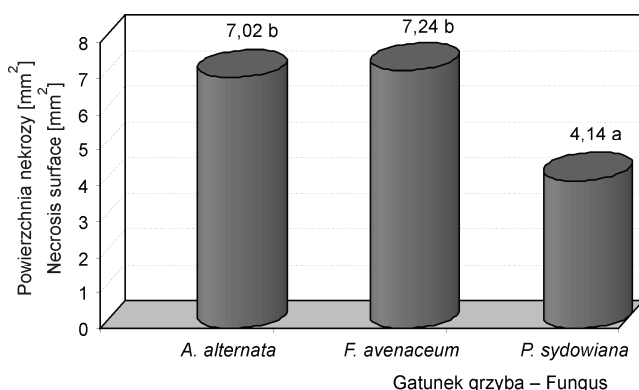
występujących na liściach bukszpanu wieczniezielonego *Elegans*. Zdaniem Werner i Kwaśnej (1998) *F. avenaceum* oprócz liści może atakować łodygi. Ponadto według autorek liście krzewów i drzew ozdobnych mogą być infekowane przez *A. alternata*. O pojawieniu się we Włoszech nowej choroby liści bukszpanu odmiany *Suffruticosa*, której sprawcą jest *C. buxicola* donoszą Saracchi i wsp. (2008). W latach dziewięćdziesiątych w Anglii i Nowej Zelandii stwierdzono obecność tego patogenu na liściach bukszpanu. Uzyskane wyniki wskazują na to, że

celowe byłoby dalsze kontynuowanie identyfikacji gatunków w oparciu o ich patogeniczność dla bukszpanu.

Na podstawie wyników badań patogeniczności grzybów stwierdzono, że badane gatunki powodowały zmiany nekrotyczne inokulowanych pędów bukszpanu. Grzyb *F. avenaceum* wykazał największą aktywność chorobotwórczą (rys. 1). Z miejsc z objawami chorobowymi reisolowano zarówno *A. alternata*, *F. avenaceum*, jak i *P. sydowiana* – co potwierdziło ich właściwości chorobotwórcze.

Aktywność fungistatyczna wyrażona procentem zahamowania wzrostu grzybni zależała od badanego środka, jego stężenia i testowanego patogenu. Spośród badanych preparatów zawierających naturalne substancje *Prev-AM 060 SL* we wszystkich zastosowanych stężeniach (0,2; 0,4; 0,6%) najskuteczniej hamował wzrost grzybni testowanych patogenów: *F. avenaceum* odpowiednio: 70,74; 72,68; 73,70%; *P. sydowiana* odpowiednio: 79,92; 80,64; 81,84%. W nieco mniejszym procencie środek ten hamował wzrost grzybni *A. alternata* (67,34; 70,56; 73,22%) (tab. 2). Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia środków, w pożywce wzrastał procent zahamowania wzrostu grzybni badanych patogenów (tab. 2). Fakt ten znajduje potwierdzenie we wcześniejszych badaniach Kurzawińskiej i Mazur (2008).

Najsłabsze działanie w ograniczeniu wzrostu liniowego grzybni badanych patogenów wykazał *HF-Mycol* i *Biochikol 020 PC*. Według licznych autorów Orlikowski i wsp. (1998), Kurzawińska i Mazur (2008), Kurzawińska i wsp. (2010) aktywność *in vitro* chitozanu jest niewielka.



Rys. 1. Patogenicność wybranych gatunków grzybów w stosunku do pędów bukszpanu; średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($p = 0,05$) wg testu Duncana

Fig. 1. Pathogenicity of chosen fungi species to shoots Buxus; means followed by the same letter are not significantly different at $p = 0.05$ according to Duncan's multiple range test

Tabela 2. Procent zahamowania wzrostu liniowego grzybni badanych patogenów przez środki ochrony roślin
Table 2. Percentage of tested fungi mycelium linear growth inhibited by plant protection agent

Preparat i stężenie Agents and its concentration	Gatunek grzyba – Fungal species		
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Fusarium avenaceum</i>	<i>Pestalotia sydowniana</i>
Biochikol 020 PC 2%	19,52 b	29,18 b	32,02 b
Biochikol 020 PC 4%	33,03 c	30,98 c	50,40 c
Biochikol 020 PC 6%	47,65 d	50,54 d	57,12 d
Prev-AM 060 SL 0,2%	67,34 b	70,74 b	79,92 b
Prev-AM 060 SL 0,4%	70,56 c	72,68 c	80,64 b
Prev-AM 060 SL 0,6%	73,22 d	73,70 d	81,84 c
HF-Mycol 0,2%	47,38 b	37,72 b	31,38 b
HF-Mycol 0,4%	50,54 c	39,84 c	42,76 c
HF-Mycol 0,6%	52,86 d	44,86 d	52,06 d
Amistar 250 SC 0,05%	79,52 b	54,32 b	61,90 b
Amistar 250 SC 0,1%	80,40 c	61,16 c	71,42 c
Amistar 250 SC 0,2%	82,10 d	75,34 d	81,28 d

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $p = 0,05\%$ testu Duncana

Means followed by the same letter do not differ at 5% significance level (Duncan's multiple range test)

Wnioski / Conclusions

- Otrzymane wyniki dwuletnich badań wskazują na kompleksowy udział fitopatogenów w procesie chorobowym bukszpanu wieczniezielonego odmiany Suffruticosa.
- Najbardziej patogenicznymi z przebadanych grzybów w stosunku do pędów bukszpanu były izolaty *F. avenaceum* i *A. alternata*.

- Spośród badanych preparatów zawierających naturalne substancje, w warunkach laboratoryjnych, najskuteczniejszym w hamowaniu wzrostu liniowego grzybni testowanych patogenów okazał się Prev-Am 060 SL.

Pracę wykonano częściowo w ramach DS.-3500/KOR/2012.

Literatura / References

- Booth C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, 237 pp.
- Borecki Z. 1984. Fungicydy Stosowane w Ochronie Roślin. PWN, Warszawa, 176 ss.
- Domsch K.H., Gams W., Andersen T.H. 1980. Compendium of Soil Fungi. Acad. Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 859 pp.
- Ellis M.B., Ellis J.P. 1985. Microfungi on Land Plants. Croom Helm, London, Sydney, 818 pp.
- Kwaśna H., Chełkowski J., Zajkowski P. 1991. Grzyby. T. 22. PAN, Warszawa-Kraków, 136 ss.
- Nelson P.E., Toussoun Y.A., Marasas W.F.O. 1983. *Fusarium* Species. The Pennsylvania State University Press, University Park and London, 193 pp.
- Kurzawińska H., Duda-Surman J., Muras P. 2008. Fungistatyczna aktywność wybranych preparatów biologicznych w stosunku do grzybów patogenicznych wyizolowanych z liści stewartcji pseudokameliiowatej. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 529: 53–57.
- Kurzawińska H., Mazur S. 2008. Wpływ preparatów biologicznych na ograniczenie występowania zgnilizn bulw w okresie przechowywania. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 531: 105–112.
- Kurzawińska H., Kapczyńska A., Daniel N. 2010. Grzyby izolowane z cebul lachenalii oraz patogeniczność wybranych gatunków i próby ich zwalczania. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 551: 149–155.
- Orlikowski L.B., Skrzypczak Cz., Wojdyła A. 1998. Mikrokryształiczny chitozan – mechanizm oddziaływania na grzyby chorobotwórcze oraz skuteczność w ochronie roślin ozdobnych. Zesz. Nauk. AR Kraków 333 (57): 729–733.
- Saracchi M., Roschi F., Pizzatti C., Cortesi P. 2008. Box blight, a new disease of *Buxus* in Italy caused by *Cylindrocladium buxicola*. J. Plant Pathol. 90 (3): 581–584.
- Stompór-Chrzan E., Gargała M. 2011. Zdrowotność ozdobnych krzewów liściastych w produkcji szkółkarskiej. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 562: 229–234.
- Werner M., Kwaśna M. 1998. Choroby pędów i liści różanecznika. Ochrona Roślin 6: 10–11.