 DOI: http://dx.doi.org/10.14199/ppp-2014-083

Influence of the selected active substances of fungicides on the growth of *Trichoderma viride*

Wpływ wybranych substancji czynnych fungicydów na wzrost *Trichoderma viride*

Ilona Świerczyńska, Agnieszka Perek, Katarzyna Pieczul

Summary

The fungi of *Trichoderma* genus as antagonists of plant pathogenic fungi can reduce development of plant diseases. They also positively affect agriculture value of the soil and support plant resistance. Therefore *Trichoderma* spp. are used as bioproducts in a biological plant protection. However, the use of fungicides due to their efficiencies or a combination of both methods are the common practices in the crop protection. The aim of the study was to estimate the effect of 13 active substances of fungicides on the growth of *T. viride* under the laboratory conditions. Among 13 active ingredients carbendazim showed the strongest impact on the *T. viride* development; at each dose inhibited completely the colony growth. The least toxic to *T. viride* were azoxystrobin, kresoxim-methyl, cyproconazole and tetraconazole.

Key words: *Trichoderma viride*; active substance of fungicides; *in vitro* growth inhibition

Streszczenie

Grzyby rodzaju *Trichoderma* wykazują skuteczne działanie antagonistyczne przeciwko grzybom patogenicznym ograniczając rozwój chorób roślin. Wpływają również korzystnie na wartość rolniczą gleby oraz wspomagają odporność roślin. Z tego względu *Trichoderma* spp. wykorzystywane są w biologicznej ochronie roślin jako biopreparaty. Powszechną praktyką w ochronie roślin jest jednak stosowanie fungicydów z uwagi na skuteczniejsze działanie lub łączenie obydwu metod. W przeprowadzonym doświadczeniu badano wpływ 13 substancji czynnych, będących składnikami fungicydów, na wzrost kolonii *T. viride* w warunkach laboratoryjnych. Najsilniejszym oddziaływaniem wykazał się karbendazym, który w każdej dawce całkowicie zahamował wzrost kolonii grzyba *T. viride*. Najmniej toksyczne dla *T. viride* okazały się: azoksystrobina, krezoksym metylu, cyprokonazol i tetrakonazol.

Słowa kluczowe: *Trichoderma viride*; substancja czynna fungicydu; hamowanie wzrostu *in vitro*

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Mikologii
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
I.Swierczynska@iorpib.poznan.pl

Prog. Plant Prot. 54 (4): 487-490
ISSN 1427-4337

Wstęp / Introduction

Gatunki rodzaju *Trichoderma* są saprofitycznymi grzybami występującymi powszechnie w środowisku naturalnym. Ze względu na właściwości antagonistyczne grzyby tego rodzaju wykorzystywane są w biologicznej ochronie roślin, np. w postaci biopreparatów (Wojtkowiak-Gębarowska 2006). *T. viride* wykazuje silne działanie mykopasożytnicze w stosunku do wielu patogenów roślin w tym m.in. *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. (Wojtkowiak-Gębarowska i Pietr 2006). Jednocześnie pozytywnie oddziałuje na kondycję roślin stymulując ich wzrost oraz poprawiając wartość rolniczą gleby. Wymienione korzyści powodują, że *T. viride* w niektórych warunkach może skutecznie zastąpić chemiczne środki ochrony roślin lub umożliwić zredukowanie ich dawek (Khalko i wsp. 2006; Ashraf i Zuhaib 2013). Aby zintegrowana ochrona przy użyciu fungicydu i antagonisty była efektywna należy ocenić, które substancje czynne i w jakich stężeniach mogą hamować rozwój patogena bez negatywnego wpływu na antagonistę (Kumar i Gupta 1999; Dubey i Patel 2001; Khalko i wsp. 2006; Madhavi i wsp. 2011).

Celem badań była ocena wpływu substancji czynnych wchodzących w skład powszechnie stosowanych fungicydów na wzrost kolonii *T. viride*.

Materiały i metody / Materials and methods

Do badań wykorzystano trzynaście czystych substancji czynnych (Sigma) należących do grup: strobiluryn (azoksystrobina, krezoksym metylu, piraklostrobina), anilinopirymidyn (cyprodinil), triazoli (cyprokonazol, epoksykonazol, flusilazol, tebukonazol, tetrakonazol), imidazoli (prochloraz), morfolin (fenpropimorf) oraz benzimidazoli (karbendazym i tiofanat metylowy). Badane związki zostały rozpuszczone w metanolu w stężeniu 5 mg/ml. Każdą z substancji czynnych dodano do sterylnej pożywki PDA (Potato Dextrose Agar; Difco) w dawkach: 1, 3 i 10 ppm, a następnie rozlano na płytki Petriego (90 mm). Na tak przygotowane podłoża wyszczepiono centralnie krążki pożywki PDA o powierzchni 0,5 cm^2, przerośnięte grzybnią *T. viride*. Wykorzystany w badaniu izolat *T. viride* został wcześniej wyizolowany z gleby i oznaczony makroskopowo oraz mikroskopowo do gatunku. Kontrolę stanowiły kultury *T. viride* wyszczepione w ten sam sposób na pożywkę PDA bez dodatku substancji czynnych. Doświadczenie przeprowadzono w pięciu powtórzeniach. Średnice kolonii *T. viride* mierzono po pięciu dniach licząc od momentu inokulacji. Analizie statystycznej poddano różnice wzrostu grzybów rosnących na pożywce PDA oraz na pożywce z dodatkiem substancji czynnych. Zastosowano analizę wariancji dwuczynnikowej przy użyciu testu Duncana na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Zastosowane w doświadczeniu substancje czynne środków ochrony roślin dodane do pożywki PDA wykazały zróżnicowany wpływ na wzrost liniowy *T. viride* (tab. 1). Wszystkie substancje czynne najsilniej hamowały rozwój grzyba w dawce 10 ppm. Większość substancji czynnych wykazała słabsze, hamujące oddziaływanie w dawce 3 ppm oraz najsłabsze w stężeniu 1 ppm. Tylko azoksystrobina i cyprodinil dodane do pożywki w stężeniach 1 i 3 ppm oddziaływały podobnie na wzrost *T. viride*, a jedyną substancją, której działanie było podobne we wszystkich badanych dawkach był karbendazym. Środek wykazał najsilniejsze, hamujące oddziaływanie na rozwój grzyba ograniczające całkowicie jego wzrost. Podobne dane otrzymali Dubey i Patel (2001), Singh i Varma (2005), Khalko i wsp. (2006), Khan i Shahzad (2007) Amalraj i wsp. (2010) oraz Devi i Singh (2012). W badaniach wymienionych autorów karbendazym wykazał najsilniejsze działanie toksyczne na *T. viride*. Malathi i wsp. (2002) stwierdzili, że izolaty *T. viride* nie rozwijały się na pożywkach z dodatkiem karbendazymu w dawce powyżej 1 ppm. Khan i Shahzad (2007) stwierdzili silne działanie hamujące karbendazymu na wzrost kolonii *T. viride* już w dawce 1 ppm i coraz silniejsze w przypadku wzrostu koncentracji tej substancji czynnej. Uzyskane wyniki wskazują na brak możliwości łączenia karbendazymu wraz z biologiczną ochroną roślin opartą na biopreparatach zawierających *T. viride*.

Część z badanych substancji czynnych dodanych do pożywki w stężeniu 1 ppm nie hamowała wzrostu *T. viride*. Średnica kolonii rosnących na pożywkach z zawartością 1 ppm azoksystrobiny, cyprodinilu, cyprokonazolu, krezoksymu metylu, tetrakonazolu oraz tiofanatu metylowego nie różniła się od wielkości kolonii rosnących w kombinacji kontrolnej i wynosiła 90 mm po 5 dniach inkubacji (tab. 1). W podobnym doświadczeniu Malathi i wsp. (2002) wykazali, że tiofanat metylowy, zastosowany w dawce 1 ppm, nie hamował wzrostu *T. viride*. Jednakże podwyższenie zawartości tej substancji czynnej do 5 ppm powodowało całkowite zahamowanie wzrostu *T. viride*. Pozostałe substancje czynne w dawce 1 ppm wykazały wyraźne oddziaływanie hamujące na liniowy wzrost kolonii grzyba. Prochloraz ograniczył wzrost kultury *T. viride* o 84%. Nieco słabsze oddziaływanie wykazał epoksykonazol (63,6% hamowania wzrostu), fenpropimorf (52,4%), tebukonazol (55,3%) i piraklostrobina (42,9%). Stosunkowo słabe oddziaływanie na rozwój antagonisty wykazywał flusilazol (18,9% hamowania wzrostu) (tab. 1).

W dawce 3 ppm jedynie azoksystrobina i cyprodinil nie wykazały działania hamującego na wzrost kolonii *T. viride*. Cyprokonazol, krezoksym metylu oraz tetrakonazol, które w dawce 1 ppm nie ograniczyły wzrostu kolonii, w stężeniu 3 ppm tylko nieznacznie zahamowały rozwój grzybni *T. viride* (odpowiednio o 2, 8,7 i 2%). Niewielkie oddziałływanie hamujące na *T. viride* wykazywały flusilazol (34,7%) i tiofanat metylowy (19,6%) (tab. 1). Wymienione substancje czynne mogą być więc wykorzystane w trakcie stosowania biologicznej ochrony roślin, nie powodując zahamowania rozwoju antagonisty. Podobne wyniki otrzymali Dubey i Patel (2001) stosując m.in. tiofanat metylowy. W badaniach tych autorów działanie hamujące tej substancji czynnej na wzrost grzyba *T. viride* było niewielkie, ale w miarę zwiększenia koncentracji w pożywce coraz silniejsze. Khan i Shahzad (2007) wykazali brak hamowania wzrostu kultur *T. viride* po 5 dniach inkubacji

Tabela 1. Średnica [mm] oraz procent hamowania wzrostu u 5-dniowych kolonii *T. viride*
Table 1. The diameter [mm] and percentage of growth inhibition of 5-day-old colonies of *T. viride*

Substancje czynne Active substances	Grupa fungicydu Group of fungicide	Zawartość substancji czynnej w pożywce [ppm] Content of active substance in the medium [ppm]			Średnia dla substancji czynnej Mean for active substance
		1	3	10	
Azoxystrobin	strobilurin	90,0 (0%) m	90,0 (0%) m	76,4 (15,1%) jk	85,5 (5%) j
Cyprodinil	anilinopyrimidine	90,0 (0%) m	90,0 (0%) m	56,0 (37,8%) h	78,7 (12,6%) i
Cyproconazole	triazole	90,0 (0%) m	88,2 (2%) m	71,8 (20,2%) i	83,3 (7,4%) j
Epoxiconazole	triazole	32,8 (63,6%) e	16,2 (82%) c	9,4 (89,6%) b	19,5 (78,3%) c
Fenpropimorph	morpholine	42,8 (52,4%) f	28,4 (68,4%) d	17,0 (81,1%) c	29,4 (67,3%) e
Flusilazole	triazole	73,0 (18,9%) ij	58,8 (34,7%) h	41,4 (54%) f	57,7 (35,9%) g
Carbendazim	benzimidazole	0,0 (100%) a	0,0 (100%) a	0,0 (100%) a	0,0 (100%) a
Kresoxim-methyl	strobilurin	90,0 (0%) m	82,2 (8,7%) l	77,4 (14%) k	83,2 (7,6%) j
Pyraclostrobin	strobilurin	51,4 (42,9%) g	34,6 (61,6%) e	27,0 (70%) d	37,7 (58,1%) f
Prochloraz	amidazile	14,4 (84%) c	8,8 (90,2%) ab	7,8 (91,3%) ab	10,3 (88,6%) b
Tebuconazole	triazole	40,2 (55,3%) f	17,8 (80,2%) c	10,0 (88,9%) b	22,7 (74,8%) d
Tetraconazole	triazole	90,0 (0%) m	88,2 (2%) m	74,8 (16,9%) i-k	84,3 (6,3%) j
Tiophanate-methyl	benzimidazole	90,0 (0%) m	72,4(19,6%) ij	35,4 (60,7%) e	65,9 (26,8%) h
Kontrola – Control		90,0 m	90,0 m	90,0 m	90,0 k
Średnia dla substancji czynnych w poszczególnych dawkach Mean for active substances for each dose		63,5 (29,4%) c	55,0 (38,9%) b	42,8 (52,4%) a	

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się między sobą na poziomie istotności α = 0,05
Means followed by the same letter do not differ significantly at α = 0.05

w obecności tiofanatu metylowego w dawce 1 i 10 ppm. W przeprowadzonych badaniach najsilniej w dawce 3 ppm oddziaływał karbendazym (100% hamowania wzrostu) i prochloraz (90,2 %) prawie zupełnie ograniczając wzrost kolonii, następnie epoksykonazol (82%), tebukonazol (80,2%), fenpropimorf (68,4%) i piraklostrobina (61,6%) (tab. 1).

Substancje czynne dodane do pożywki w dawce 10 ppm wywarły najbardziej zróżnicowany wpływ na wzrost kolonii grzybów (od 14 do 100%) (tab. 1). Wśród najaktywniejszych substancji czynnych znalazły się: karbendazym, prochloraz, epoksykonazol i tebukonazol, które skutecznie zahamowały wzrost kolonii. Silne działanie hamujące tebukonazolu na *T. viride* stwierdził Bagwan (2010). W badaniach autora środek ten dodany do pożywki w zalecanej dawce całkowicie hamował wzrost 3-dniowych kultur *T. viride*. Fenpropimorf, piraklostrobina, tiofanat metylowy i flusilazol znacznie ograniczyły wzrost kolonii grzyba – odpowiednio o 81,1, 70, 60,7 i 54%. Najsłabsze działanie hamujące wykazały cyprodinil (37,8%), cyprokonazol (20,2%), tetrakonazol (16,9%), azoksystrobina (15,1%) oraz krezoksym metylu (14%). Podobnie w badaniach Archana i wsp. (2012) azoksystrobina dodana do pożywki w dawce 10 ppm nie hamowała wzrostu kultur *T. viride* po 5 dniach inkubacji. Także w badaniach Ranganathswamy i wsp. (2013) spośród zastosowanych substancji czynnych azoksystrobina znalazła się wśród substancji najsłabiej działających na *T. viride*. Sarkar i wsp. (2008) badając wpływ azoksystrobiny i tebukonazolu stwierdzili skuteczniejsze działanie hamujące rozwój *T. harzianum* w przypadku tebukonazolu i słabe w odniesieniu do azoksystrobiny.

Uzyskane wyniki wskazują, że możliwe jest dobranie fungicydów do łącznego stosowania z biopreparatami opartymi na *T. viride*. Mało toksyczne dla *T. viride* są: azoksystrobina, krezoksym metylu, cyprokonazol, tetrakonazol i cyprodinil. Do substancji czynnych, których zdecydowanie należy unikać stosując biopreparaty zawierające *T. viride* należą: karbendazym, prochloraz, epoksylonazol i tebukonzol. Ciekawą obserwacją jest różne oddziaływanie na wzrost kolonii *T. viride* substancji czynnych należących do tej samej grupy chemicznej fungicydów, nie różniących się mechanizmem działania grzybobójczego. Azoksystrobina i krezoksym metylu (strobiluryny) nie wykazywały silnego wpływu na hamowanie wzrostu kolonii *T. viride* (średnia hamowania wzrostu 5 i 7,6%), inaczej niż kolejna substancja z tej grupy – piraklostrobina, która średnio ograniczyła wzrost badanych izolatów o 58,1%. Podobne wyniki uzyskano dla fungicydów z grupy triazoli. Do substancji bezpiecznych dla *T. viride* możemy zaliczyć cyprokonazol i tetrakonazol (średnie hamowania wzrostu 7,4 i 6,3%), a zdecydowanie hamujących wzrost epoksykonazol i tebukonazol (średnie hamowania wzrostu 78,3 i 74,8%) (tab. 1).

Wnioski / Conclusions

1. Najmniej toksyczne dla *T. viride* okazały się: azoksystrobina, krezoksym metylu, cyprokonazol, tetrakonazol

i cyprodinil. Stosowanie fungicydów zawierających wymienione substancje czynne wydaje się bezpieczne dla prawidłowego funkcjonowania *T. viride*.

2. Karbendazym całkowicie, a prochloraz, epoksylonazol i tebukonzol bardzo silnie hamowały wzrost *T. viride* we wszystkich zastosowanych stężeniach, co wyklucza łączne stosowanie fungicydów z wymienionymi substancjami czynnymi z biopreparatami zawierającymi *T. viride*.
3. Wszystkie substancje czynne najsilniej hamowały wzrost *T. viride* w dawce 10 ppm, co wskazuje na korzyści ze stosowania możliwie najniższych zalecanych dawek fungicydów wraz z ochroną biologiczną preparatami zawierającymi *T. viride*.

Literatura / References

Amalraj L.D.E., Kumar P.G., Desai S., Ahmed M.H.S.K. 2010. *In vitro* characterization of *Trichoderma viride* for abiotic stress tolerance and field evaluation against root rot disease in *Vigna mungo* L. J. Biofertil. Biopestici. 2 (3): 1–5.

Archana S., Hubballi M., Ranjitham T.P., Prabakar K., Raguchander T. 2012. Compatibility of azoxystrobin 23 SC with biocontrol agents and insecticides. Madras Agric. J. 99 (4–6): 374–377.

Ashraf S., Zuhaib M. 2013. Fungal biodiversity: a potential tool in plant disease management. p. 69–90. In: „Management of Microbial Resources in the Environment" (A. Malik, E. Grohmann, M. Alves, eds). Springer, Berlin, 532 pp.

Bagwan N.B. 2010. Evaluation of *Trichoderma* compatibility with fungicides, pesticides, organic cakes and botanicals for integrated management of soil borne disease of soybean [*Glycine max* (L.) Merril]. Int. J. Plant Prot. 3 (2): 206–209.

Devi T.N., Singh M.S. 2012. Evaluation of suitable fungicide for integration with *Trichoderma* isolates for the control of tomato wilt. J. Mycopathol. Res. 50 (2): 223–228.

Dubey S.C., Patel B. 2001. Determination of tolerance in *Thanatephorus cucumeris*, *Trichoderma viride*, *Gliocladium virens* and *Rhizobium* sp. to fungicides. Indian Phytopathol. 54 (1): 98–101.

Khalko S., Jash S., Bose S., Roy M., Pan S. 2006. Evaluation of tolerance in *Macrophomina phaseolina*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* and *Gliocladium virens* to fungicides. J. Mycopathol. Res. 44 (1): 109–111.

Khan M.O., Shahzad S. 2007. Screening of *Trichoderma* species for tolerance to fungicides. Pak. J. Bot. 39 (3): 945–951.

Kumar A., Gupta J.P. 1999. Variations in enzyme activity of tebuconazole tolerant biotypes of *Trichoderma viride*. Indian Phytopathol. 52 (3): 263–266.

Madhavi G.B., Bhattiprolu S.L., Reddy V.B. 2011. Compatibility of biocontrol agent *Trichoderma viride* with various pesticides. J. Hortlic. Sci. 6 (1): 71–73.

Malathi P., Viswanathan R., Padmanaban P., Mohanraj D., Sunder A.R. 2002. Compatibility of biocontrol agents with fungicides against red rot disease of sugarcane. Sugar Tech. 4 (3–4): 131–136.

Ranganathswamy M., Patibanda A.K., Rao G.N. 2013. Evaluation of toxicity of agrochemicals on *Trichoderma* isolates *in vitro*. J. Mycopathol. Res. 51 (2): 289–293.

Sarkar S., Narayanan P., Divakaran A., Balamurugan A., Premkumar R. 2008. The in vitro effect of certain fungicides, insecticides, and biopesticides on mycelial growth in the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Turk. J. Biol. 34 (2010): 399–403.

Singh G., Varma R.K. 2005. Compatibility of fungicides and neem products against *Fusarium solani* f. sp. *glycines* causing root rot of soybean and *Trichoderma* spp. J. Mycopathol. Res. 43 (2): 211–214.

Wojtkowiak-Gębarowska E. 2006. Mechanizmy zwalczania fitopatogenów glebowych przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*. Post. Mikrobiol. 45 (4): 261–273.

Wojtkowiak-Gębarowska E., Pietr S.J. 2006. Colonization of roots and growth stimulation of cucumber by iprodione-resistant isolates of *Trichoderma* spp. applied alone and combined with fungicides. Phytopathol. Pol. 41: 51–64.