

THE OCCURRENCE OF YEASTS AND MYCELIAL FUNGI ON GRAIN OF WINTER WHEAT GROWN UNDER CONVENTIONAL AND ECOLOGICAL SYSTEMS

Summary

In the years 2006-2008 the effects of two cultivation systems (conventional and ecological) on the number of yeasts and mycelial fungi on grains of winter wheat cultivars: Roma and Zyta (in 2006 and 2007), as well as cultivars Legenda and Bogatka (in 2008) were studied. Quantitatively populations of these microorganisms on winter wheat grain were in most cases not significantly differentiated under the compared systems. The dominating genera within mycelial fungi were: *Cladosporium*, *Fusarium* and *Alternaria*. Moreover, qualitative analyses of mycelial fungi have shown that grains of winter wheat under the ecological system were in a lower extent colonized with *Fusarium* species than grains under the conventional system. *Fusarium poe* was most frequently isolated from the studied grain, while *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium tricinctum* were rare.

WYSTĘPOWANIE DROŻDŻY I GRZYBÓW STRZĘPKOWYCH NA ZIARNIE PSZENICY OZIMEJ UPRAWIANEJ W SYSTEMIE KONWENCJONALNYM I EKOLOGICZNYM

Streszczenie

W latach 2006-2008 badano wpływ systemu uprawy (konwencjonalnego i ekologicznego) na liczebność drożdży i grzybów strzępkowych występujących na ziarnach pszenicy ozimej odmian: Roma i Zyta w roku 2006 i 2007 oraz Legenda i Bogatka w roku 2008. Pod względem ilościowym badane grupy grzybów występujących na ziarnach pszenicy ozimej uprawianej w porównywanych systemach na ogół nie różniły się istotnie. Wśród grzybów strzępkowych dominowały rodzaje: *Cladosporium*, *Fusarium* i *Alternaria*. Analizy jakościowe grzybów strzępkowych wykazały ponadto, że ziarno pszenicy ozimej uprawianej w systemie ekologicznym było w słabszym stopniu zasiedlane przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, niż ziarno pszenicy ozimej pochodzące z pola systemu konwencjonalnego. Najczęściej wyodrębnianym z analizowanego ziarna gatunkiem rodzaju *Fusarium* okazał się *F. poe*, rzadziej występowały *F. sporotrichioides* i *F. tricinctum*.

1. Wstęp

Na częściach nadziemnych roślin występuje wiele grup mikroorganizmów tj.: bakterie, drożdże, grzyby, pierwotniaki i glony [12, 17]. Wśród wymienionych grup drobnoustrojów fylosferowych dominują gatunki saprofityczne, nie mające bezpośredniego wpływu na wzrost i rozwój roślin, jednak części nadziemne wiech zasiedlane są również przez fitopatogeny będące przyczyną wielu chorób. Skład ilościowy i jakościowy drobnoustrojów fylosferowych jest bardzo zróżnicowany i uzależniony od wielu czynników środowiskowych takich jak: warunki klimatyczne (temperatura, opady, promieniowanie słoneczne), rodzaj i pH gleby, a także od wieku i budowy morfologicznej rośliny [1, 2, 4, 12, 16, 17]. W przypadku roślin uprawnych zabiegi agrotechniczne, a zwłaszcza chemiczne środki ochrony oraz nawozy dolistne mają również istotny wpływ na występowanie i rozwój mikroorganizmów epifitycznych [2, 4, 17]. Wśród grzybów zasiedlających fylosferę występują zarówno grzyby strzępkowe jak i drożdżaki, przy czym drożdże przewyższają zwykle pod względem ilościowym grzyby strzępkowe [16, 17]. Fokkema i in [6] wykazali, że grzyby drożdżoidalne zasiedlające liście pszenicy mogą hamować rozwój grzybów fitopatogenicznych, m.in. na drodze konkurencji o składniki odżywcze zawarte w wydzielinach powierzchniowych liści. Stwierdzono również, że drożdże rozwijające się na liściach zbóż przyczyniają się do usuwania z nich spadzi mszyc, która może być ważnym

czynnikiem ograniczającym fotosyntezę, a więc i plony zbóż [3]. Martyniuk i Oroń [14] wykazali, że drożdżaki występują także na ziarnie pszenicy ozimej, a ich liczebności przewyższają zwykle liczebności grzybów strzępkowych na ziarniakach. Łukanowski i Sadowski [13] analizowali skład zespołów grzybów strzępkowych występujących na ziarniakach pszenicy ozimej w zależności od systemu uprawy i stwierdzili, że ziarno pszenicy uprawianej w systemie ekologicznym było na ogół w mniejszym stopniu zasiedlane przez niektóre gatunki grzybów z rodzaju *Fusarium* niż ziarniaki pszenicy ozimej uprawianej w systemie konwencjonalnym, pomimo stosowania fungicydów w tym systemie.

Celem badań przedstawionych w niniejszej pracy było stwierdzenie czy system uprawy (konwencjonalny *versus* ekologiczny) wpływa na zasiedlenie ziarna pszenicy ozimej przez grzyby drożdżoidalne i czy liczebność populacji tej grupy grzybów różnicuje ilościowy i jakościowy skład zespołów grzybów strzępkowych na ziarnie pszenicy ozimej.

2. Materiał i metody

Badania przeprowadzono w latach 2006-2008 w oparciu o wieloletnie doświadczenie polowe zlokalizowane w Stacji Doświadczalnej IUNG-PIB w Osinach. Pole doświadczalne podzielone zostało na trzy części w zależności od systemu rolniczego upraw: konwencjonalna, zintegrowana i ekologiczna. Na potrzeby badań kłosa pszenicy ozimej

pobrano z dwóch systemów upraw: konwencjonalnym i ekologicznym. W systemie ekologicznym, w przeciwieństwie do konwencjonalnego, nie stosowano nawozów sztucznych oraz chemicznych środków ochrony roślin (pestycydów, fungicydów, herbicydów itd.) w celu zwalczania chorób, szkodników i chwastów. W zastępstwie wykorzystano przede wszystkim prawidłowy płodozmiar oraz metody biologiczne i agrotechniczne. W 2006 i 2007 roku do badań pobrano kłosa dwóch odmian pszenicy ozimej, tj. Roma i Zyta, a w roku 2008 badaniami objęto odmiany Legenda i Bogatka.

Kłosa w stadium dojrzałości twardej pobrano według wcześniej opracowanego schematu z różnych miejsc w obrębie pola doświadczalnego. Kłosa bezpośrednio po zerwaniu wkładano do sterylnych torebek i przewożono do laboratorium. Na miejscu za pomocą sterylnej pęsety wyjmowano z różnych kłosów każdej odmiany po 3 próbki ziarniaków. Następnie każdą próbkę składającą się z 10 ziarniaków umieszczano w probówkach ze sterylną wodą (9 ml) z dodatkiem Tween 80 i wytrząsano przez 20 min, po czym wykonano odpowiednie rozcieńczenia, a uzyskane zawiesiny naniesiono w ilości po 0,1 ml na powierzchnię pożywek agarowych w płytkach Petriego, w celu określenia ogólnej liczebności jednostek tworzących kolonie (jtk) grzybów oraz liczebności drożdżaków. Liczebność grzybów obydwu grup oznaczono na pożywce Martina z dodatkiem 1g wyciągu drożdżowego zawierającego antybiotyki – streptomycynę i penicylinę – celem zahamowania wzrostu bakterii. Kolonie grzybów liczono po upływie 7-8 dni inkubacji w temperaturze 27°C, a uzyskane liczebności jtk grzybów przeliczano na 1g suchej masy (s.m.) ziarna. Grzyby strzępkowe wyodrębnione z ziarniaków przeszczepiano na skosy agarowe, sprawdzano ich czystość, a następnie poddawano je identyfikacji do odpowiedniego rodzaju lub gatunku [5, 9, 11].

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie metodą wariancji dwuczynnikowej (ANOVA), stosując póprzędział ufności Tukeya ($\alpha = 0,05$) do oceny istotności różnic pomiędzy średnimi.

3. Wyniki i dyskusja

3.1. Analizy ilościowe grzybów strzępkowych i drożdżaków

Największe liczebności grzybów na analizowanym ziarnie pszenicy ozimej stwierdzono w 2006 roku, prawdopodobnie dlatego, że rok ten charakteryzował się częstszymi niż lata 2007 i 2008 opadami deszczu w okresie przedziwnym (tab. 1). W roku 2006 najwięcej grzybów ogółem oraz drożdżaków wykryto na ziarnie odmiany Zyta uprawianej w systemie rolnictwa ekologicznego, jednak liczebności te nie różniły się pod względem statystycznym od pozostałych wartości ze względu na duże zróżnicowanie wyników w poszczególnych powtórzeniach (tab. 1). Drożdże stanowiły od około 54% do 85% ogólnej populacji grzybów występujących na ziarniakach pszenicy ozimej w 2006 roku.

W następnym roku również nie stwierdzono istotnego wpływu porównywanych systemów uprawy pszenicy ozimej na liczebności grzybów zasiedlających ziarniaki (tab. 1). Na ziarnach odmiany Roma uprawianej w systemie konwencjonalnym stwierdzono większe populacje grzybów ogółem oraz drożdżaków, niż uprawianej w systemie

ekologicznym. W przypadku drugiej odmiany (Zyta), podobnie jak w poprzednim roku, zależność była odwrotna, czyli grzybów, w tym również drożdży, znajdowało się mniej na ziarnach tej pszenicy w systemie konwencjonalnym niż ekologicznym. Liczebności drożdżaków na ziarnach pszenicy ozimej uprawianej w 2007 roku stanowiły od 65,2% do 92,3% ogólnej populacji grzybów, co wskazuje, że ta grupa grzybów dominowała w zasiedlaniu ziarna pszenicy (tab. 1).

W 2008 roku nastąpiła zmiana odmian pszenicy ozimej uprawianych w doświadczeniu polowym w Osinach. Ziarniaki odmiany Bogatka uprawianej w systemie konwencjonalnym zasiedlone były przez około 5-krotnie wyższe populacje grzybów niż ziarniaki pszenicy tej odmiany uprawianej w systemie ekologicznym (tab. 1). W przypadku odmiany Legenda nie stwierdzono wyraźnych i istotnych różnic w populacjach grzybów na ziarnie pszenicy ozimej w zależności od systemu uprawy. Poza tym na ziarnach odmiany Bogatka uprawianej w systemie konwencjonalnym stwierdzono 7-krotnie wyższe populacje grzybów oraz drożdżaków niż na ziarnach odmiany Legenda uprawianej w tym samym systemie (tab. 1). W tym drożdżaki stanowiły od 40,1% do 90,2% wszystkich grzybów wyizolowanych z ziarna pszenicy ozimej.

W podsumowaniu tej części analiz można stwierdzić, że grzyby drożdżoidalne stanowiły dominującą grupę grzybów na ziarnie pszenicy ozimej i że porównywane w pracy systemy uprawy nie miały wyraźnego wpływu na liczebność grzybów występujących na ziarnie.

3.2. Analizy jakościowe grzybów strzępkowych

Wśród grzybów strzępkowych wyizolowanych z ziarniaków pszenicy ozimej w latach 2006-2008 znalazły się zarówno typowe saprofity, np. rodzaj *Cladosporium*, jak i potencjalne patogeny z rodzajów *Fusarium* i *Alternaria*. W roku 2006 ziarniaki badanych odmian pszenicy uprawianej w porównywanych systemach zasiedlone były przede wszystkim przez *Cladosporium herbarum*, grzyb obficie zarodnikujący na resztkach organicznych i łatwo rozprzestrzeniający się w atmosferze. Wyraźnie więcej izolatów tego grzyba uzyskano z ziarniaków obydwu odmian pszenicy ozimej uprawianych w systemie ekologicznym niż w systemie uprawy konwencjonalnym i był to prawdopodobnie efekt fungicydów zastosowanych w tym drugim systemie uprawy (tab. 2). Wydaje się, że pomimo dość długiego okresu (około miesiąca), jaki upłynął od ostatniego oprysku (początek kwitnienia) fungicydem systemicznym Artea do zbioru pszenicy w 2006 roku, zahamowanie zasiedlania kłosów przez grzyby w pierwszych tygodniach po oprysku fungicydowym skutkowało słabszym zanieczyszczeniem ziarna zarodnikami *C. herbarum* w czasie zbiorów. W 2007 roku uzyskano z analizowanych ziarniaków znacznie mniej izolatów wszystkich grzybów strzępkowych niż w poprzednim roku (tab. 2). Był to głównie skutek suchej i gorącej pogody w lipcu 2007, ale również tego, że w analizie mikrobiologicznej zastosowano zbyt duże rozcieńczenie wyjściowego zmywu (zawiesiny zarodników) z badanych ziarniaków. W trzecim, 2008 roku analizowano ziarniaki dwu nowych odmian pszenicy ozimej tj. Bogatki i Legendy i zidentyfikowano na nich podobne rodzaje grzybów strzępkowych jak w latach

poprzednich. Reprezentowane były one w większości przez *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, oraz grzyba niezarodnikującego i w związku z tym niezidentyfikowanego (tab. 2).

Tab. 1. Ogólna liczba grzybów i drożdżaków (jtk/1 g s.m.) na ziarnie pszenicy ozimej w latach 2006-2008 w zależności od systemu uprawy (E = ekologiczny, K = konwencjonalny)
 Table 1. Total numbers of fungi and yeasts (cfu/1 g d. m.) on winter wheat grain in 2006-2008 as influenced by farming system (E = ecological, K = conventional)

Odmiana/System uprawy Cultivar/Cultivation system	Rok; Year					
	2006		2007		2008	
	Grzyby ogółem × 10 ⁶	Drożdże × 10 ⁶	Grzyby ogółem × 10 ⁵	Drożdże × 10 ⁵	Grzyby ogółem × 10 ⁵	Drożdże × 10 ⁵
Roma E	3,63	1,97 (54,3%)	5,06	3,30 (65,2%)		
Roma K	4,42	2,97 (67,2%)	9,53	8,80 (92,3%)		
Zyta E	13,67	11,63 (85,1%)	7,42	5,63 (75,9%)		
Zyta K	5,11	3,63 (71,0%)	4,02	3,20 (79,6%)	3,11	2,18 (70,1%)
Legenda E					3,45	2,86 (82,9%)
Legenda K					4,54	1,82 (40,10%)
Bogatka E					24,09	21,72 (90,20%)
Bogatka K						
NIR (0,05) dla: systemu uprawy for: cultivation system dla: odmiany for: cultivar system uprawy × odmiana cultivation system × cultivar	r.n.*	r.n.	r.n.	r.n.	4,72	2,33
	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	4,72	2,33
	r.n.	r.n.	r.n.	r.n.	6,67	3,29

* r.n. = różnice nieistotne; differences not significant

Tab. 2. Liczba izolatów grzybów strzępkowych występujących na ziarnie pszenicy ozimej w latach 2006-2008 w zależności od systemu uprawy (E = ekologiczny, K = konwencjonalny)

Table 2. Number of mycelial fungi isolates occurring on winter wheat grain in the years 2006 - 2008 as influenced by cultivation system (E = ecological, K = conventional)

Grzyb, <i>Fungus</i>	Rok 2006, Year 2006			
	Roma E	Roma K	Zyta E	Zyta K
<i>Alternaria alternata</i>	2	2	-	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	3	5	1
<i>Cladosporium herbarum</i>	138	85	78	39
<i>Fusarium poe</i>	-	-	-	29
<i>Penicillium sp.</i>	1	-	1	-
Grzyb niezarodnikujący	-	-	-	1
	Rok 2007, Year 2007			
	Roma E	Roma K	Zyta E	Zyta K
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	1	-
<i>Alternaria tenuissima</i>	1	1	1	-
<i>Cladosporium herbarum</i>	-	1	-	2
<i>Fusarium poe</i>	-	-	-	1
<i>Fusarium tricinctum</i>	-	-	-	1
<i>Verticillium sp.</i>	2	-	-	-
Grzyb niezarodnikujący	7	2	3	1
	Rok 2008, Year 2008			
	Legenda E	Legenda K	Bogatka E	Bogatka K
<i>Alternaria alternata</i>	11	1	25	14
<i>Aspergillus sp.</i>	-	5	-	-
<i>Cladosporium herbarum</i>	10	7	4	4
<i>Fusarium poe</i>	1	17	1	1
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	-	1	-	5
Grzyb niezarodnikujący	8	9	23	23

Identyfikując grzyby strzępkowe zwracano szczególną uwagę na występowanie chorobotwórczych i toksynotwórczych grzybów z rodzaju *Fusarium*. Patogeny te mogą być przyczyną zgorzeli przed powschodowej siewek, zgnilizny korzeni i podstawy źdźbła oraz fuzariozy kłosów, której towarzyszy porażenie ziarna [7, 8, 10, 11, 15]. Na analizowanych w 2006 roku ziarnach pszenicy ozimej stwierdzono występowanie jednego gatunku z rodzaju *Fusarium*, a mianowicie *Fusarium poe*. Uzyskano 29 izolatów tego gatunku, przy czym grzyb ten występował jedynie na ziarnach odmiany Zyta uprawianej w systemie konwencjonalnym (tab. 2). Z ziarniaków analizowanych w 2007 roku uzyskano najmniej izolatów fusariów (2) i stwierdzono występowanie dwóch gatunków, tj. *Fusarium poe* (1 izolat) i *Fusarium tricinctum* (1 izolat). Podobnie jak w roku 2006 oba gatunki występowały jedynie na odmianie Zyta uprawianej w systemie konwencjonalnym. Tak więc system uprawy miał wyraźny wpływ na liczebność fusariów zasiedlających ziarniaki tej odmiany pszenicy. W roku 2008 uzyskano 26 izolatów w obrębie dwu gatunków: *Fusarium poe* – 20 izolatów i *Fusarium sporotrichioides* – 6 izolatów, przy czym liczniejsze populacje tych grzybów występowały na ziarniakach obydwu odmian pszenicy ozimej uprawianej w systemie konwencjonalnym niż w systemie ekologicznym (tab. 2). Podobnie jak w latach ubiegłych utrzymała się podobna zależność pomiędzy systemem uprawy a liczebnością grzybów z rodzaju *Fusarium* występujących na ziarniakach pszenicy ozimej. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że ziarno pszenicy ozimej zbierane z pól systemu ekologicznego zasiedlone było w mniejszym stopniu przez grzyby z rodzaju *Fusarium* niż ziarno z pól systemu konwencjonalnego, mimo stosowania fungicydów w tym systemie (tab. 2). Wcześniej podobne wyniki otrzymali Łukanowski i Sadowski [13], stwierdzając słabsze

zasiedlenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium* ziarniaków pszenicy ozimej uprawianej w systemie ekologicznym w porównaniu z systemem konwencjonalnym.

4. Podsumowanie

Podjmując opisane w tej pracy badania autorzy stali na stanowisku, że fungicydy stosowane w warunkach rolnictwa konwencjonalnego zwalczają nie tylko grzyby chorobotwórcze na liściach i kłosach zbóż, ale mogą także hamować zasiedlanie kłosów i ziarna przez grzyby saprofityczne, zwłaszcza drożdżaki i tym samym osłabiać ich antagonistyczne oddziaływania na grzyby patogeniczne, w tym *Fusarium*. Wyniki naszych badań nie potwierdziły tego przypuszczenia, bowiem pod względem ilościowym zespoły grzybów, w tym saprofitycznych drożdżaków, zasiedlających ziarno badanych odmian pszenicy ozimej uprawianej w systemie konwencjonalnym i ekologicznym na ogół nie różniły się istotnie. Przyczyną liczniejszego występowania grzybów z rodzaju *Fusarium* na ziarnie pszenicy ozimej w systemie konwencjonalnym, w porównaniu do systemu ekologicznego, mogły być różnice w budowie łanu. Niższe i bardziej zwarte, a więc i mniej przewiewne łany pszenicy w systemie konwencjonalnym zatrzymują dłużej wilgoć, która jest ważnym czynnikiem sprzyjającym zasiedlaniu kłosów, a więc i ziarna, przez różne mikroorganizmy, w tym grzyby fitopatogeniczne.

5. Literatura

- [1] De Azeredo L.A.I., Gomes E.A.T., Mendonca-Hagler L.C., Hagler A.N. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. *Internat Microbiol.*, 1: 205-208, 1998.
- [2] Buck J.W., Burpee L.L. The effects of fungicides on the

- phylloplane yeast populations of creeping bentgrass. *Can. J. Microbiol.*, 48(6): 522-529, 2002.
- [3] Dik A.J., Fokkema N.J., Van Pelt J.A. Consumption of aphid honeydew, a wheat yield reducing factor, by phyllosphere yeasts under field conditions. *Neth. J. Pl. Pathol.*, 97: 209-232, 1991.
- [4] Dik A.J., Fokkema N.J., Van Pelt J.A. Influence of climatic and nutritional factors on yeast population dynamics in phyllosphere of wheat. *Microb. Ecol.*, 23: 41-52, 1992.
- [5] Domsch K.H., Gams W., Anderson T-H. *Compendium of soil fungi*. Acad. Press. London, New York, Toronto, Sydney, 1980.
- [6] Fokkema N.J., Riphagen I., Poot R., De Jong C. Aphid honeydew, a potential stimulant of *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum* and the competitive role of saprophytic mycoflora. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 81: 355-363.
- [7] Kiecana I. 1986. Fuzarioza kłosów pszenżyta. *Rocz. Nauk Roln.*, 16(2): 59-68, 1983.
- [8] Kiecana I., Mielniczuk E., Perkowski J., Goliński P. Porażenie wiech przez *Fusarium poe* (Peck.) Wollenw. oraz zawartość mikotoksyn w ziarnie owsa. *Acta Agrobot.*, 59(2): 91-102, 2005.
- [9] KwaśnaH., Chełkowski J., Zajkowski P. *Grzyby*, t.XXII, PAN, Instytut Botaniki.
- [10] Lemańczyk G. 2008. Zasiadlenie ziarna pszenicy ozimej przez grzyby rodzaju *Fusarium* w zależności od zdrowotności podstawy źdźbła. *Z. Probl. Post. Nauk Rol.*, 529: 65-71, 1991.
- [11] Leslie J.F., Zeller K.A., Summerell B.A. Icebergs and species in populations of *Fusarium*. Mini-Review. *Physiol. Molec. Plant Pathol.*, 59: 107-117, 2001.
- [12] Lindow S.L., Brandl M.T. Microbiology of phyllosphere, *Appl. Environm. Microbiol.*, 69: 1875-1883, 2003.
- [13] Łukanowski A., Sadowski Cz. Wykorzystywanie metody PCR do badania jakości ziarna pszenicy ozimej uprawianej w systemach ekologicznym, integrowanym, konwencjonalnym oraz monokulturze w aspekcie fitopatologicznym. *Acta Agrobot.*, 59(2): 55-69, 2005.
- [14] Martyniuk S., Oroń J. Plon i niektóre cechy jakości ziarna pszenicy ozimej porażonej przez *Cephalosporium gramineum*. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin.*, 235: 133138, 2005.
- [15] Miller J.D. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals, w: *Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin*. St Paul, Mn. Eagan., 19-36, 1994.
- [16] Nix-Stohr S., Burpee L.L., Buck W. The influence of exogenous nutrients on the abundance of yeasts on the phylloplane of turfgrass. *Microbial Ecology.*, 55(1): 15-, 2007.
- [17] Whipps J.M., Hand P., Pink D., Bending G.B. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.*, 105:1744-1755, 2008.