

KATARZYNA NAWROT-CHORABIK

Możliwości wykorzystania kultur dualnych w praktyce leśnej

Possible use of dual cultures in the forestry practice

ABSTRACT

Nawrot-Chorabik K. 2013. Możliwości wykorzystania kultur dualnych w praktyce leśnej. Sylwan 157 (1): 54-62.

The paper provides the review of research on interaction in dual cultures *in vitro* (fungus and plant tissue culture of its host plant) with marking test results in this area in order to show usefulness of this method in testing pathogenicity and the possibility of its use in forest practice.

KEY WORDS

dual cultures, callus, fungi, *in vitro*, pathogenicity tests

ADDRESSES

Katarzyna Nawrot-Chorabik – e-mail: rlnawrot@cyf-kr.edu.pl

Katedra Fitopatologii Leśnej; Uniwersytet Rolniczy w Krakowie; Al. 29 Listopada 46; 31-425 Kraków

Wstęp

Nasilający się w ostatnich dziesięcioleciach wpływ czynników antropogenicznych powoduje zmiany w środowisku przyrodniczym pewnych regionów naszego kraju. Drzewa leśne jako ważny element ekosystemu wykazują podatność na zmiany klimatyczne i środowiskowe. Fakt ten przemawia za tym, by dogłębniej poznać przyczyny oraz wyjaśnić problem zamierania drzew na skutek abiotycznych i biotycznych czynników środowiska.

Zjawisko obumierania ważnych gospodarczo gatunków drzew leśnych na skutek działalności grzybów chorobotwórczych jako biotycznych elementów środowiska nie jest w pełni poznane. Fakt ten można wytłumaczyć tym, iż proces chorobowy uzależniony jest między innymi od właściwości rośliny gospodarza oraz właściwości grzybów – potencjalnych sprawców choroby. Na obydwie grupy organizmów oddziałują czynniki środowiska, które mogą wpływać na zwiększenie lub zmniejszenie predyspozycji chorobowej. W większości przypadków ocenę podatności rośliny gospodarza oraz właściwości patogenicznych grzybów dokonuje się poprzez ocenę częstości pojawu objawów chorobowych w powiązaniu z obecnością danego gatunku grzyba oraz na podstawie testów na patogeniczność. Realizacja takich testów jest niekiedy bardzo utrudniona, gdyż w przypadku ekosystemów leśnych mamy do czynienia z roślinami wieloletnimi.

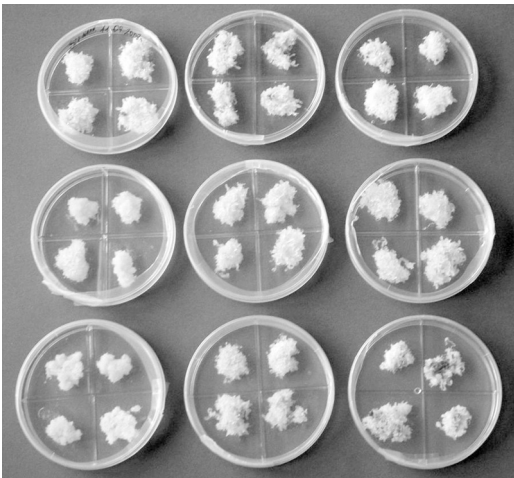
W latach osiemdziesiątych XX wieku pojawiła się nowa metoda badań wykazująca wzajemne relacje (interakcje) między dwoma organizmami polegające na stymulacji lub inhibicji ich rozwoju. Są to badania w kulturach dualnych (dwuorganizmowych), w których jednym z organizmów jest kalus (tkanka przyranna rośliny w stadium embrionalnym bądź nieembrionalnym wyhodowana w warunkach *in vitro*), drugim zaś – badany gatunek grzyba. Hrib i Rypacek [1978] oraz Johnson i Whitney [1988] jako jedni z pierwszych badali patogeniczność na poziomie embrionalnym w kulturach dualnych *in vitro*. Tego typu badania prowadzono później w Finlandii

[Terho i in. 2000; Niemi, Häggman 2002], Niemczech [Sirrenberg i in. 1995; Peters i in. 1998], Norwegii [Kvaalen, Solheim 2000; Kvaalen i in. 2001], na Słowacji [Hrib i in. 1995; Vookova i in. 2006] i w Wielkiej Brytanii [Hendry i in. 1993]. Na podstawie dotychczasowych badań prowadzonych w Polsce [Nawrot-Chorabik, Jankowiak 2010] można stwierdzić, że są one bardzo obiecujące, gdyż wypracowanie wiarygodnych testów w kulturach dualnych z udziałem grzyba i stadium embrionalnego tkanki roślinnej jego gospodarza może dać podstawę do oceny patogeniczności i stopnia zagrożenia ze strony grzyba. Może również umożliwić wybór genotypu rośliny bardziej odpornego na dany patogen, co ma szczególne znaczenie w odniesieniu do grzybów znanych z możliwości epifitozyjnego występowania. Wyselekcjonowanie na poziomie embrionalnym genotypów drzew odpornych na porażenie mogłoby wyłonić nowy kierunek hodowli odpornościowej [Minter, Millar 1980].

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie dotychczas podjętych badań z zakresu interakcji między grzybami a tkanką kalusa rośliny żywicielskiej w kulturach dualnych dla zwrócenia uwagi na przydatność tej metody do badań patogeniczności i jej możliwości zastosowania w praktyce leśnej.

Badania metodyczne w kulturach dualnych

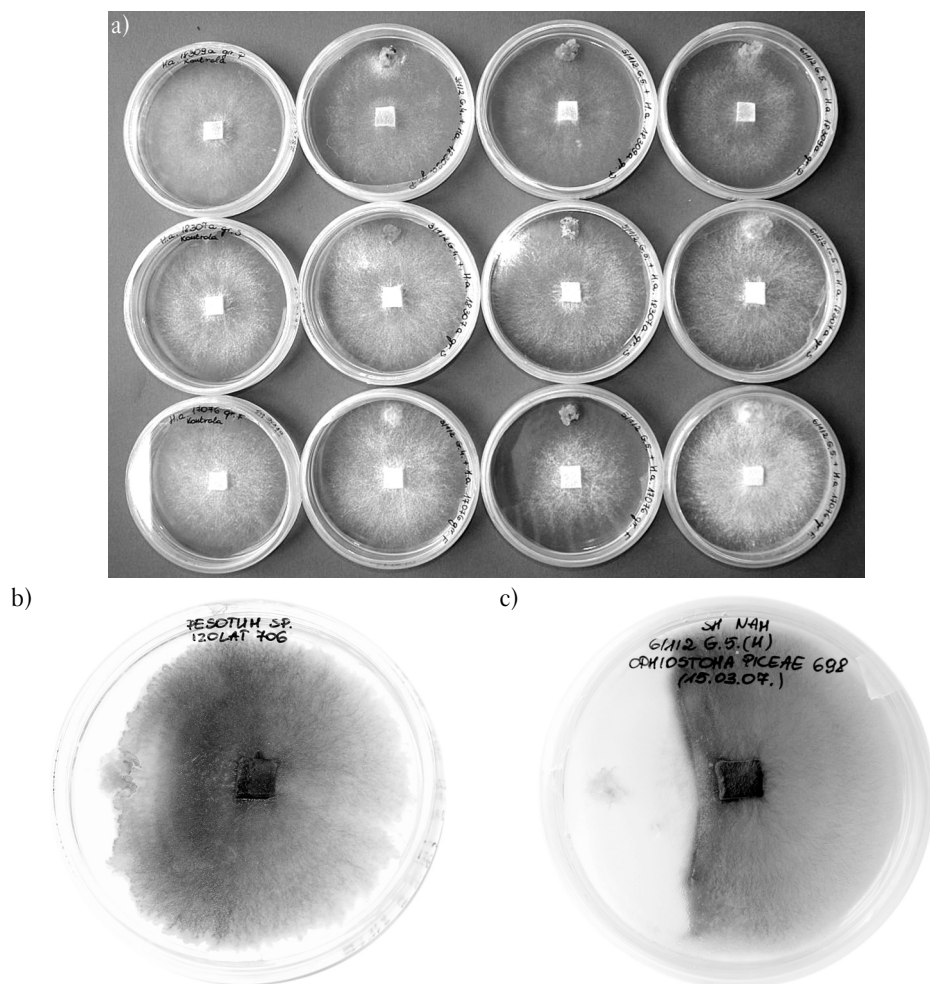
Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań własnych w Katedrze Fitopatologii Leśnej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie stwierdzono, że podstawą „materiałową” do założenia kultur dualnych (kalus roślinny – grzyb) jest umiejętność inicjacji i proliferacji w kulturach *in vitro* kalusa nieembriogennego (nieuorganizowanej masy dzielących się komórek, w naturze – tkanka przyranna) lub embriogennego (nieuorganizowanej masy dzielących się komórek, zdolnej do tworzenia zarodków somatycznych, a w dalszych etapach organogenezy do regeneracji w rośliny w procesie mikrorozmnazania) w dostatecznie dużej ilości (ryc. 1) oraz izolacja i identyfikacja grzybów, które potem poddawane są testom. W przypadku roślin nagozalążkowych w celu inicjacji kalusa wykorzystuje się metodę biotechnologiczną somatycznej embriogenezy, polegającą na indukcji na zdezynfekowanym eksplantacie pierwotnym (np. na zarodku zygotycznym wyizolowanym z nasiona) kalusa. Opracowanie optymalnych metod dezynfekcji eksplantatów oraz dobór pożywki i zawartych w niej regulatorów wzrostu, stężenia cukrów oraz wyselekcjonowanie najlepszych genotypów stanowi nieodzowną część metody, którą należy opracować i przystosować do badanego gatunku rośliny [Nawrot-Chorabik 2007, 2008, 2009]. W sterylnych szalkach



Ryc. 1.

Klony kalusa embriogennego jodły pospolitej (*Abies alba* Mill.) zainicjowane w roku 2005 na genotypie nr 5 jodły pochodzącej z Nadleśnictwa Skarżysko (fot. K. Nawrot-Chorabik)
Clones of embriogenic callus of *Abies alba* Mill. started in 2005 on genotype #5 from Skarżysko Forest District (photo K. Nawrot-Chorabik)

Petriego z zestaloną pożywką do proliferacji zakładamy hodowle dualne (ryc. 2). Na środku szalki znajduje się inokulum grzyba o wymiarach 0,5×0,5 cm, a w odległości 5 mm od krawędzi szalki należy umieścić kalus rośliny gospodarza o średnicy 1 cm i masie około 0,5 g [Nawrot-Chorabik, Jankowiak 2010]. Kultury w powtórzeniach (ich ilość zależy od frekwencji embriogenezy i zdolności proliferacyjnych genotypów kalusa) przetrzymuje się w inkubatorach lub fitotronie w temperaturze 25°C i wilgotności 40-50%. Obserwacje makro- i mikroskopowe dokonuje się co 24 godziny (w przypadku grzybów szybko rosnących) lub co 48 godzin. Dodatkowo należy mikroskopowo analizować anomalia w komórkach kalusa narażonych na stres oraz identyfikować białka odpornościowe. Celem wyjaśnienia podstaw molekularnych patogeniczności grzybów na poziomie embrionalnym w kulturach dualnych *in vitro* przeprowadza się analizy genetyczne przy użyciu markerów molekularnych.



Ryc. 1.

Kultury dualne, składające się z kalusa jodły pospolitej oraz grzybów z rodzaju *Heterobasidion* (a), *Pesotum* sp. (b) i *Ophiostoma piceae* (c) (fot. K. Nawrot-Chorabik)

Dual cultures consisting of silver fir callus and fungi from *Heterobasidion* (a), *Pesotum* sp. (b) and *Ophiostoma piceae* (c) (photo K. Nawrot-Chorabik)

Dotyychczas zdobyta wiedza na temat kultur dualnych *in vitro* poparta praktyką pozwoliła autorce niniejszej pracy zwrócić uwagę na aspekty dotyczące kierunku badań. Analizy można bowiem skierować na poznanie rodzaju interakcji między testowanymi organizmami oraz ocenę zachowania patogenu pod wpływem oddziaływania kalusa rośliny gospodarza i jego zachowania pod wpływem działalności patogenu, a ponadto na selekcjonowanie roślin odpornych na dany patogen. W związku z powyższym doświadczenia w kulturach dualnych można prowadzić na wybranym genotypie kalusa lub na wielu genotypach – w zależności, czy chcemy wyselekcjonować genotypy odporne na patogena, czy raczej chcemy dogłębnie zbadać dany genotyp pod tym względem.

Możliwości wykorzystania kultur dualnych

Prace badawcze w kulturach dualnych rozpoczęto w drugiej połowie lat osiemdziesiątych XX wieku. Badania *in vitro* prowadzono wówczas na grzybach endofitycznych i kalusie rośliny żywicielskiej. W doświadczeniach tych uwzględniono zarówno drzewa leśne, jak i rośliny zielne [Johnson, Whitney 1988; Sieber i in. 1990]. Późniejsze analizy dotyczyły wybranych gatunków grzybów o właściwościach patogenicznych [Hendry i in. 1993; Spanos, Woodward 1997; Kvalen, Solheim 2000; Deeks i in. 2002], endofitycznych [Peters i in. 1998] i ektomikoryzowych [Sirrenberg i in. 1995; Niemi i in. 1998; Niemi, Häggman 2002]. Grzyby saprotroficzne poddawano testom najczęściej w celach porównawczych (negatywna kontrola) [Hendry i in. 1993]. W Polsce badania takie zainicjowano w roku 2006 w Katedrze Fitopatologii Leśnej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Na wybranych genotypach wyhodowanego *in vitro* kalusa jodły pospolitej badano reakcje obronne tkanki embriogenicznej względem różnych izolatów grzybów z rodzaju *Heterobasidion*. W następnych latach analizy poszerzono o testy z grzybami o różnym statusie ekologicznym [Nawrot-Chorabik, Jankowiak 2010; Nawrot-Chorabik i in. 2011].

Organizmy patogeniczne

W odniesieniu do patogenów w kulturach dualnych uwzględniane były różne organizmy: bakterie, grzyby oraz organizmy grzybobopodobne (*Chromista*), które testowano z różnymi roślinami: uprawianymi w rolnictwie, drzewami owocowymi, drzewami leśnymi oraz pasożytniczymi roślinami kwiatowymi [Deeks i in. 2002].

Uwzględniając chronologię badań w kulturach dualnych, można zauważyć, że sukcesywnie nabierają one znaczenia, czego przejawem jest stosowanie przez autorów prac coraz bardziej skomplikowanych analiz. Jedne z pierwszych prac w tym zakresie prowadzili Hrib i Rypacek [1978, 1981, 1983], badając *in vitro* świerk, buk, brzozę i topolę. Podjęli oni próbę określenia roli grzybów podstawkowych (*Basidiomycota*) w zjawisku zamierania niektórych gatunków drzew leśnych.

Zaobserwowanie pobudzenia wzrostu grzyba przez kalus było znaczącym momentem dla celowości prowadzenia badań dwuorganizmowych kultur *in vitro*. Zjawisko to zostało najwcześniej odnotowane przez Hriba i Rypacka [1981], którzy zdecydowali się na wprowadzenie kultur dualnych do badań nad patogennością. Autorzy ci pokazali, że grzyby powodujące rozkład drewna, zdolne do infekowania żywych tkanek drzew, były stymulowane przez kalus, zaś te grzyby, które są w stanie zasiedlać tylko tkanki martwe, były hamowane w rozwoju. W oparciu o te wyniki nasunęły się konkluzje, że stopień wzrostu stymulacji jest pozytywnie skorelowany z wirulencją grzybów.

Hendry i in. [1993], biorąc pod uwagę zmiany, jakie następują w środowisku leśnym pod wpływem działalności różnych gatunków grzybów patogenicznych i saprotroficznych w kulturach

dwuorganizmowych *in vitro* z bukiem, rozważali implikacje szerszego stosowania tego rodzaju metod dla wyjaśniania zagadnień związanych z patologią lasu. Eksperymenty wykazały, że z użyciem systemów dualnych można wykazać w większym stopniu niż innymi metodami specyficzność danego gatunku grzyba względem konkretnej tkanki roślinnej lub organu. Stwierdzono przy tym, że w przypadku grzybów leśnych metoda kultur dwuorganizmowych może być właściwa, gdyż dostarcza model dzielenia komórek, analogiczny do podziałów komórek kambium drzew [Hendry i in. 1993].

W doświadczeniu Spanosa i Woodwarda [1997] oraz Kvaalena i Solheima [2000] wzrost grzybów patogenicznych był obserwowany w obecności kalusa uzyskanego z kilku genotypów świerka pospolitego (*Picea abies*) i cyprysa wiecznie zielonego (*Cupressus sempervirens*). Kvaalen i Solheim [2000] wykazali wyraźny wpływ kalusa świerkowego na wzrost grzybni. Wynik ten pokrył się z konkluzjami wyciągniętymi przez Hriba i Rypacka [1978]. W eksperymentach tych dwa genotypy roślinnego kalusa różniły się znacznie podatnością na grzyby patogeniczne. *Heterobasidion annosum* w kulturze z kalusem świerkowym jednego genotypu wykazał wyraźną inhibicję wzrostu po 60 godzinach, zaś na inny genotyp nie reagował inhibicją po tym samym czasie.

W będących pod wpływem wirulentnego szczepu *Cryphonectria parasitica* kulturach tkankowych kasztana jadalnego (*Castanea sativa*) obserwowano zmiany polegające na redukcji żywej masy kalusa i zwiększaniu udziału obumarłej masy. Badania te potwierdziły całkowicie obserwacje poczynione *in vivo* [Piagnani i in. 1997]. Z wielu analiz wynika, że wirulentne patogeny w kulturach dwuorganizmowych są stymulowane przez kalus, zaś grzyby saprotroficzne lub grzyby, które wtórnie zasiedlają drewno, są inhibowane [Hendry i in. 1993; Kvaalen, Solheim 2000; Vookova i in. 2006]. Zjawisko to zostało już wcześniej odnotowane przez Hriba i Rypacka [1981], którzy zdecydowali się na wprowadzenie kultur dualnych do badań nad patogenicznością, włączając do badań grzyby podstawkowe powodujące rozkład drewna drzew żywych.

Spośród grzybów występujących na drzewach owocowych stosunkowo dużo uwagi poświęcono wykorzystaniu kultur dualnych do selekcji jabłoni odpornych na parcha jabłoni powodowanego przez *Venturia inaequalis*. Natomiast spośród bakterii w połączeniu z drzewami owocowymi najwięcej badań poświęcono *Agrobacterium tumefaciens* – sprawcy guzowatości korzeni oraz *Erwinia amylovora* – sprawcy zarazy ogniowej. Z kolei spośród organizmów z gromady *Chromista* uwzględniano głównie rodzaj *Phytophthora*, obejmujący sprawców fytoftoroz różnych drzew i krzewów leśnych oraz roślin ozdobnych [Ostry, Skilling 1992]. Przykładem najwcześniejszego praktycznego wykorzystania kultur tkankowych w ochronie roślin była hodowla hybryd topoli wolnych od wirusów [Ostry, Skilling 1992].

Przydatność kultur dualnych do oceny patogeniczności grzybów potwierdzono także w odniesieniu do pasożytniczych roślin kwiatowych. Jemiola karłowata występująca na *Arceuthobium tsugense* była opanowana *in vivo* przez *Cylindrocarpon cylindroides* i *Colletotrichum gloeosporioides*. Badania dwuorganizmowe wykazały wysoką patogeniczność obu gatunków grzybów. Kolonizowały one między- oraz wewnątrzkomórkowo tkankę rośliny, powodując degradację ścian komórkowych [Deeks i in. 2002].

Grzyby endofityczne

Jedne z pierwszych prac nad grzybami endofitycznymi w kulturach dualnych poświęcono kulturom klonu wielkolistnego (*Acer macrophyllum*) [Sieber i in. 1990] oraz roślinom zielnym: jasnocie purpurowej (*Lamium purpureum*) i ożance nierównoząbkowej (*Teucrium scorodonia*) [Peters i in. 1998]. Efekty interakcji między endofitem *Cryptodiaporthe hystrix* i kalusem klonu badano

w kulturach dualnych jako wzajemne oddziaływania. Wszystkie izolaty *C. hystrix* hamowały wzrost kalusa (odwrotnie było ze wzrostem grzyba, który zawsze silnie był stymulowany przez obecność kalusa). Autorzy pracy sugerują, że *C. hystrix* i gospodarz egzystują w stanie zbliżonej równowagi do pewnego czasu. W warunkach naturalnych klon jest w stanie zapobiec rozległemu wzrostowi *C. hystrix* w jego tkance. Jednak w końcowym efekcie *C. hystrix* nie tylko zahamował wzrost kalusa, ale ostatecznie porósł go i zabił [Sieber i in. 1990]. Może to oznaczać, że *C. hystrix* jest przedstawicielem tej grupy endofitów, które w warunkach stresu rośliny mogą przejść do patogenicznej działalności. Doświadczenia w kulturach dualnych potwierdzają badania prowadzone *in vivo*, podkreślając właściwość endofitów, które w warunkach stresu (imisje przemysłowe, owady pasożytnicze, niekorzystne warunki pogodowe) oraz podczas starzenia organów mogą przejść do działalności choobotwórczej [Kowalski 1996, 1999; Kowalski, Sadłowski 1993]. Dzięki badaniom dualnym *in vitro* można by uzyskać bardziej szczegółowe wyniki, które dałyby podstawę do określenia, które gatunki grzybów endofitycznych są w stanie powodować choroby drzew w warunkach stresu [Sieber i in. 1990].

Spośród roślin zielnych w kulturach dualnych z endofitami uwzględniano między innymi roślinę żywicielską (gospodarza) i rośliny spoza kręgu roślin żywicielskich (jasnotę purpurową *Lamium purpureum* i ożankę nierównoząbkową *Teucrium scorodonia*) [Peters i in. 1998]. Grzyby endofityczne: *Coniothyrium palmarum*, *Geniculosporium* sp. i *Phomopsis* sp. pod wpływem kalusa rośliny zielnej cechowały się zwiększonym wzrostem, w przeciwieństwie do zachowania się tych grzybów w kulturach dualnych z kalusem roślin spoza kręgu roślin żywicielskich.

Grzyby ektomikoryzowe

Pierwsze prace nad grzybami ektomikoryzowymi w kulturach dualnych rozpoczęto w Niemczech [Sirrenberg i in. 1995]. Badano kalus świerka pospolitego (*Picea abies*) i grzyby tworzące związki mikoryzowe: *Amanita muscaria*, *Lactarius deterrimus*, *Hebeloma crustuliniforme* oraz *Suillus variegatus*. Jako kontroli użyto *Heterobasidion annosum* – patogenicznego grzyba niepowodującego mikoryzacji. Tylko dwa spośród badanych grzybów mikoryzowych (*S. variegatus* i *L. deterrimus*) spowodowały wyraźną reakcję komórek świerka, które oplecione siecią Hartiga charakteryzowały się lepszą wymianą składników odżywczych szczególnie w strefie interakcji kultury dualnej. Ponadto zaobserwowano nieregularności w strukturach komórkowych kalusa, m.in. w cytoplazmie komórkowej, która cofnęła się na rzecz strzępek grzyba.

Podobne prace prowadzili Niemi i in. [1998], którzy badaniom poddali trzy genotypy kalusa sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) i grzyby ektomikoryzowe: *Laccaria bicolor*, *L. proxima*, *Pisolithus tinctorius*, *Paxillus involutus* oraz *Suillus variegatus*. Analizowano wpływ tych grzybów na inicjację i proliferację kalusa embriogenego. W zależności od gatunku grzyba zaobserwowano pozytywną (lepszy wzrost kalusa) lub negatywną (brązowienie, nekrozy kalusa) reakcję tkanki embriogennej. Strzępki grzyba *Laccaria bicolor* „spenetrowały” komórki embriogenne sosny zwyczajnej, a oplatając je, wywołały ich pozytywną reakcję wzrostową. Niemi i Häggman [2002] powtórnie podjęli badania w kulturach dualnych grzyba *Pisolithus tinctorius* i sosny zwyczajnej. Tym razem wykazano, że grzyb ten poprawia kiełkowanie *in vitro* somatycznych zarodków sosny. Mikoryzacji poddano zarodki somatyczne sosny zwyczajnej zaindukowane *in vitro* na embriogennym kalusie. Przy wykorzystaniu różnych pożywek oraz zawartych w nich odmiennych stężeniach cukru i innych niezbędnych zabiegów hodowlanych, uzyskano w kulturach dualnych pożądaný efekt. Przy pomocy tej metody ulepszono jeden z trudniejszych etapów somatycznej embriogenezy sosny, tj. kiełkowanie somatycznych zarodków w siewki.

Białka jako wykładnik wirulencji grzyba

Ważnym czynnikiem, decydującym o tym, czy tkanki roślinne będą broniły się przed atakiem patogena lub nie będą wykazywały właściwości obronnych, są wytwarzane przez komórki rośliny żywicielskiej metabolity wtórne oraz białka. Takie analizy były wykonywane w kulturach dualnych przez Siebera i in. [1990]. Stwierdzono, że metabolity rozpuszczalne w wodzie, wyprodukowane przez kalus klonu wielkolistnego mogły być odpowiedzialne za stymulację wzrostu grzybni. Podobne wyniki podają Peters i in. [1998], którzy twierdzą, że metabolity wydzielone przez badane przez nich trzy endofity w kulturze dwuorganizmowej zarówno z kalusem zielonej rośliny żywicielskiej, jak i z kalusem rośliny spoza kręgu roślin żywicielskich prowadziły do nekroz i śmierci jego komórek. Metabolity te były niespecyficzne, bowiem hamowały nie tylko jednego z gospodarzy (*Lamium purpureum*), ale również *Lepidium sativum* i *Cantharis fusca*.

Prowadzone obecnie analizy molekularne nad współpracą białek i DNA są jedną z najbardziej obiecujących dziedzin. W procesach takich jak transkrypcja, replikacja oraz naprawa DNA biorą udział białka pełniące funkcje aktywatorów bądź represorów. Ponieważ wiele czynników transkrypcyjnych jest odpowiedzialnych za regulację określonych grup genów (np. związanych z cyklem komórkowym), aktywność tych białek ma zasadniczy wpływ na przebieg podstawowych procesów komórkowych, takich jak proliferacja kalusa, różnicowanie, organogeneza oraz odpowiedź na czynniki stresowe (m.in. patogeny roślin). Ze względu na to, że rośliny wykazują duży stopień specyficzności w zakresie rozpoznawania czynnika chorobotwórczego, jakim jest patogen, prowadzi to do różnego stopnia oporu, który pociąga za sobą cały mechanizm reakcji biochemicznych. Geny uruchamiają odpowiednie białka, które chcą wyeliminować patogen. W ostatnich latach badania ukierunkowano na tzw. białka związane z patogenezą, które zostały opisane dla różnych interakcji czynnika chorobotwórczego roślin. Mówimy wówczas o białkach PRs (ang. pathogenesis-related proteins), których funkcje uczyniły je potencjalnymi białkami antymikrobowymi. PRs zostały wyznaczone i zidentyfikowane biochemicznie dla 14 różnych rodzin roślin. Biochemicznie zidentyfikowano następujące białka enzymatyczne: α -1,3 – glukanaza (PR-2), chitynaza (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11), proteinaza (PR-6) czy peroksydaza (PR-9) [Van Loon, Van Strien 1999]. Białka te kodowane przez odpowiednie geny występowały w tkankach zakażonych przez czynnik chorobotwórczy [Walters i in. 2007].

Literatura

- Deeks S. J., Shamoun S. F., Punja Z. K. 2002. Histopathology of callus and germinating seeds of *Arceuthobium tsugense* subsp. *tsugense* infected by *Cylindrocarpon cylindroides* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *International Journal of Plant Sciences* 163: 765-773.
- Hendry S. J., Boddy L., Lonsdale D. 1993. Interactions between callus cultures of European beech, indigenous Ascomycetes and derived fungal extracts. *New Phytologist* 123: 421-428.
- Hříb J., Rypáček V. 1978. The growth response of wood – destroying fungi to the presence of spruce callus. *Mycology* 32: 55-60.
- Hříb J., Rypáček V. 1981. A simple callus test to determine the aggressiveness of wood destroying fungi. *European Journal of Forest Pathology* 11: 270-274.
- Hříb J., Rypáček V. 1983. *In vitro* testing for the resistance of conifers to the fungus *Phaeolus schweinitzii* on callus cultures. *European Journal of Forest Pathology* 13: 86-91.
- Hříb J., Vookova B., Salajová T., Bolvanský M., Flak P. 1995. Testing of embryogenic and non-embryogenic calli of European black pine (*Pinus nigra* Arn.) for defence reactions to the fungus *Phaeolus schweinitzii*. *Biologia, Bratislava* 50(4): 403-410.
- Johnson J. A., Whitney N. 1988. A preliminary study of conifer tissue reaction to the presence of endophytic fungi using issue culture, light and electron microscopy techniques. *Canadian Journal of Plant Pathology* 10: 366.
- Kowalski T. 1996. Grzyby endofityczne. III. Możliwości ograniczania populacji *Mikiola fagi* (Hartig) przez *Apiognomonia errabunda* (Rob. ex Desm.) Hhn. Materiały z Sympozjum „Choroby roślin na środowisko”. Poznań 27-28.06.1996. Polskie Towarzystwo Fitopatologiczne, Poznań. 83-89.

- Kowalski T. 1999. Grzyby endofityczne a choroby zgorzelowe drzew w warunkach oddziaływania emisji przemysłowych. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie* 348: 83-99.
- Kowalski T., Sadłowski W. 1993. Grzyby endofityczne II. Znaczenie dla roślin i możliwości ich wykorzystania. *Sylwan* 137 (10): 9-15.
- Kvaalen H., Christiansen E., Johnsen Ø., Solheim H. 2001. Is there a negative genetic correlation between initiation of embryogenic tissue and fungus susceptibility in Norway spruce? *Canadian Journal of Forest Research* 31: 824-831.
- Kvaalen H., Solheim H. 2000. Co-inokulation of *Ceratocystis polonica* and *Heterobasidion annosum* with callus of two Norway spruce clones with different *in vivo* susceptibility. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60: 221-228.
- van Loon L. C., van Strien E. A. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Minter D. W., Millar C. S. 1980. Ecology and biology of three *Lophodermium species* on secondary needles of *Pinus sylvestris*. *European Journal of Forest Pathology* 10: 169-181.
- Nawrot-Chorabik K. 2007. Induction and development of grand fir (*Abies grandis* Lindl.) callus in tissue cultures. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 10 (4): 1-11.
- Nawrot-Chorabik K. 2008. Embryogenic callus induction and differentiation in silver fir (*Abies alba* Mill.) tissue culture. *Dendrobiology* 59: 31-40.
- Nawrot-Chorabik K. 2009. Somaclonal variation in embryogenic cultures of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Plant Biosystems* 143: 377-385.
- Nawrot-Chorabik K., Jankowiak R. 2010. Interakcje pomiędzy kalusem trzech genotypów *Abies alba* a grzybami o różnym statusie ekologicznym. *Leśne Prace Badawcze* 71(4): 381-389.
- Nawrot-Chorabik K., Jankowiak R., Grad B. 2011. Growth of two blue-stain fungi associated with *Tetropium* beetles in the presence of callus cultures of *Picea abies*. *Dendrobiology* 66: 41-47.
- Niemi K., Häggman H. 2002. *Pisolithus tinctorius* promotes germination and forms mycorrhizal structures in Scots pine somatic embryos *in vitro*. *Mycorrhiza* 12: 263-267.
- Niemi K., Krajinakova J., Häggman H. 1998. Interaction between embryogenic cultures of Scots pine and ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 8: 101-107.
- Ostry M. E., Skilling D. D. 1992. Applications of tissue culture for studying tree defense mechanisms. W: Blanchette R. A., Biggs A. R. [red.]. *Defense mechanisms of woody plants against fungi*. New York, Springer Verlag. 405-423.
- Peters S., Draeger S., Aust H.-J., Schulz B. 1998. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. *Mycologia* 90 (3): 360-367.
- Piagnani C., Faoro F., Sant S., Vercesi A. 1997. Growth and ultrastructural modifications to chestnut calli induced by culture filtrates of virulent and hypovirulent *Cryphonectria parasitica* strains. *European Journal of Forest Pathology* 27: 23-32.
- Sieber T. N., Sieber-Canavesi F., Dorworth C. E. 1990. Simultaneous stimulation of endophytic *Cryptodiaporthe hystrix* and inhibition of *Acer macrophyllum* callus in dual culture. *Mycologia* 82: 569-575.
- Sirrenberg A., Salzer P., Hager A. 1995. Induction of mycorrhiza-like structures and defence reaction in dual cultures of spruce callus and ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 130: 149-156.
- Spanos K. A., Woodward S. 1997. Responses of *Cupressus* and *Chamaecyparis* callus tissues to inoculation with *Seiridium cardinale*. *European Journal of Forest Pathology* 27: 13-21.
- Terho M., Pappinen A., von Weissenberg K. 2000. Growth reactions of a *Gremmeniella abietina* isolate and Scots pine embryogenic tissue cultures differ in a host-parasite *in vitro* system. *Forest Pathology* 30: 285-295.
- Vookova B., Hřib J., Kormutak A., Adamec V. 2006. Defence reactions of developing somatic embryos of Algerian fir (*Abies numidica*). *Forest Pathology* 36: 215-224.
- Walters D., Newton A., Lyon G. [red.]. 2007. *Induced Resistens for Plant Defence. Mechanism of defence to pathogens: biochemistry and physiology*. Blackwell Publishing, Oxford. 6: 109-131.

SUMMARY

Possible use of dual cultures in the forestry practice

The phenomenon of dieback of economically important forest tree species as a result of the activity of pathogenic fungi as biotic components of the environment has not been fully examined yet. This can be explained by the fact that the disease process in trees depends inter alia on the properties of the host plant and the fungi, the potential causes of the disease. In the 1980s, researchers in Canada and Slovakia started to develop a new method of testing pathogenicity on the level of embryos in dual cultures. In the following years, other countries also undertook

this issue. Numerous experiments have been conducted with the participation of pathogenic, endophytic, ectomycorrhizal and saprotrophic fungi as well as the embryonic stage of their host plant tissue grown *in vitro*; the results have shown the applicability of various dual cultures in practical forest management. The development of reliable *in vitro* tests may provide a basis for the assessment of the pathogenicity and the degree of harmfulness of a given fungus. It may also allow for the selection of a plant genotype that is more resistant to a given pathogen, which is particularly important in relation to fungi known for the possibility of epiphytic occurrence. Moreover, the dual *in vitro* studies allow for obtaining more detailed results which provide the basis for determining which species of endophytic fungi are able to cause tree diseases under stress. In Poland, research on *in vitro* dual cultures started in 2006 in the Department of Forest Pathology, University of Agriculture in Krakow for the purposes of development of research on pathogenicity and the possible emergence of a new direction of resistance cultures.