

HANNA KWAŚNA, JERZY DUX

Możliwości ograniczenia zgorzeli siewek sosny zwyczajnej przez *Trichoderma* spp.

The possibility of control the Scots pine seedlings damping-off with *Trichoderma* spp.

Wstęp

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* zaliczane są obecnie do najbardziej skutecznych saprofitycznych grzybów antagonistycznych, szeroko stosowanych w biologicznej ochronie roślin drzewiastych, rolniczych i ogrodniczych. Grzyby z tego rodzaju, zwłaszcza *T. viride* łączą w sobie wiele cech dobrego antagonisty, do których należy: szybki wzrost, obfite zarodnikowanie, powszechne występowanie w środowisku lasu, tworzenie substancji fungitoksycznych (głównie antybiotyków peptydowych), produkcja enzymów hydrolytycznych i celulolitycznych, możliwość egzystencji na wielu substratach, łatwość w wykorzystywaniu wielu substancji organicznych i nieorganicznych oraz zdolność do pasożytnictwa. Zastosowane w formie biopreparatu zasiedlają szybko traktowane podłoża chroniąc rośliny przed działaniem grzybów patogenicznych. Najnowsze badania potwierdzają również dużą rolę *Trichoderma* spp. w stymulowaniu wzrostu nowych korzeni, również u roślin drzewiastych.

W niewielkim doświadczeniu infekcyjnym zbadano wpływ *T. harzianum* i *T. viride* w trocinach sosnowych i bukowych oraz biopreparatu opartego na *T. harzianum* na trzy najczęściej występujące grzyby zgorzelowe: *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum* i *Rhizoctonia solani* – wywołujące zgorzel siewek i zamieranie systemu korzeniowego sadzonek wielu gatunków drzew i krzewów w szkółkach leśnych i podłożach szkółkarskich

Materiał i metody

Do badań użyto trzy grzyby zgorzelowe: *C. destructans* (Zinssm.) Scholten, *F. oxysporum* Schlecht. oraz *R. solani* Kuhn, wyizolowane z siewek sosny zwyczajnej z terenu Polski zachodniej w latach 1996-1997, oraz dwa gatunki *Trichoderma*: *T. harzianum* Rifai i *T.*

viride Pers. wyizolowane z gleby leśnej z okolic Warszawy w roku 1996, jak również preparat biologiczny oparty na *T. harzianum*.

Sterylnie trociny sosnowe i bukowe zaszczepiano wodną zawiesiną zarodników *T. harzianum* i *T. viride* w kolbach. Kolby umieszczono w temp. 24°C na 14 dni mieszając zawartość co drugi dzień.

Doniczki wypełniono nie sterylizowaną glebą leśną. Część doniczek przykrywano dwucentymetrową warstwą gleby leśnej zmieszanej w stosunku 1:1 lub 3:1 z trocinami bukowymi lub sosnowymi, sterylnymi lub przerośniętymi *T. viride* lub *T. harzianum*. Inne doniczki przykrywano dwu centymetrową warstwą niesterylnej kory sosnowej lub mieszaniny kory sosnowej i torfu zmieszanych w stosunku 3:1. Dodawano do nich odpowiednio preparat biologiczny z *T. harzianum* stosowany w postaci roztworu w stężeniu 0,1% w ilości 25 ml/doniczkę (kombinacja 8), lub w postaci proszku w ilości 0,01g/130 g mieszaniny kory i torfu (kombinacja 9). Do doniczek wysiewano po 25 podkiełkowanych nasion sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). Nasiona podlewano 5 ml zawiesiny *C. destructans* lub *F. oxysporum* otrzymanej przez wyflukanie zarodników i strzępek, rosnącej w 200 ml kolbce 2-tygodniowej kultury, w 120 ml wody destylowanej, sterylnej. W doświadczeniu z *R. solani* 9 mm² fragmenty pożywki PDA przerośniętej przez patogena wykładano do podłoża, po czym umieszczano na nich podkiełkowane nasiona. W kombinacjach 1-7 nasiona przykrywano 3-4 mm warstwą gleby leśnej. W kombinacjach 8 i 9 nasiona wysiewano do kory lub mieszaniny kory i torfu. Po 2, 3 i 4 tygodniach liczone zdrowe siewki.

Wpływ *Trichoderma* spp. na zgorzel siewek powodowaną przez *C. destructans*, *F. oxysporum* i *R. solani*. zbadano w następujących kombinacjach:

- 1. Kontrola – gleba leśna + grzyb zgorzelowy.
- 2. Gleba + sterylne trociny sosnowe w stosunku 1:1 lub 3:1 + grzyb zgorzelowy.
- 3. Gleba + sterylne trociny bukowe w stosunku 1:1 lub 3:1 + grzyb zgorzelowy.
- 4. Gleba + trociny sosnowe przerośnięte *T. viride* w stosunku 1:1 lub 3:1 + grzyb zgorzelowy.
- 5. Gleba + trociny bukowe przerośnięte *T. viride* w stosunku 1:1 lub 3:1 + grzyb zgorzelowy.
- 6. Gleba + trociny sosnowe przerośnięte *T. harzianum* w stosunku 1:1 lub 3:1 + grzyb zgorzelowy.
- 7. Gleba + trociny bukowe przerośnięte *T. harzianum* w stosunku 1:1 lub 3:1 + grzyb zgorzelowy.
- 8. Kora z roztworem preparatu biologicznego + grzyb zgorzelowy.
- 9. Kora + torf w stosunku 3:1 z dodatkiem preparatu biologicznego dodanego w postaci proszku + grzyb zgorzelowy.

Każdorazowo doświadczenie założono w czterech powtórzeniach. Doniczki umieszczono w szklarni w temperaturze 20-25°/15-18°C w ciągu dnia i nocy. Doniczki podlewano codziennie 50 ml wody wodociągowej.

Wyniki

Wyniki podane w tabelach 1-2 sugerują, że grzyby z rodzaju *Trichoderma* stosowane w postaci biopreparatu mogą ograniczać zgorzel siewek sosny powodowaną przez *C. destructans* i *F. oxysporum*. W doświadczeniu z *C. destructans* najsilniejszy efekt ochronny obserwowano po zastosowaniu biopreparatu biologicznego opartego na *T. harzianum*, zastosowanego w postaci zawiesiny wodnej (tab. 1). Nieco mniejszy efekt wystąpił, gdy preparat zastosowano w postaci proszku dodanego do mieszanki kory sosnowej i torfu. Stosunkowo znaczny efekt ochronny uzyskano po zastosowaniu trocin bukowych przerośniętych przez *T. harzianum*. Zastosowanie sterylnych trocin bukowych pozwoliło również uzyskać nieco lepszy efekt od kontroli. Pozostałe kombinacje dały efekt gorszy od kontroli.

TABELA 1

Liczba zdrowych siewek w doświadczeniu z *C. destructans* przy stosunku gleby i trocin 1:1

Kombinacja	Liczba zdrowych siewek		
	po 2 tyg.	po 3 tyg.	po 4 tyg.
1	52	29	9
2	74	39	7
3	42	39	13
4	65	43	6
5	38	31	7
6	30	28	5
7	31	45	16
8	33	42	18
9	45	48	11

TABELA 2

Liczba zdrowych siewek w doświadczeniu z *F. oxysporum* przy stosunku gleby i trocin 1:1

Kombinacja	Liczba zdrowych siewek		
	po 2 tyg.	po 3 tyg.	po 4 tyg.
1	15	10	3
2	63	43	29
3	23	25	25
4	34	28	18
5	30	25	13
6	61	53	37
7	17	18	18
8	18	15	7
9	33	37	25

TABELA 3

Liczba zdrowych siewek w doświadczeniu z *F. oxysporum* przy stosunku gleby i trocin 3:1

Kombinacja	Liczba zdrowych siewek		
	po 2 tyg.	po 3 tyg.	po 4 tyg.
1	3	1	1
2	9	3	1
3	16	9	5
4	17	3	0
5	27	9	7
6	27	4	1
7	6	1	1
8	4	1	1
9	0	0	0

TABELA 4

Liczba zdrowych siewek w doświadczeniu z *R. solani* przy stosunku gleby i trocin 3:1

Kombinacja	Liczba zdrowych siewek		
	po 2 tyg.	po 3 tyg.	po 4 tyg.
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	1	1	1
5	1	1	1
6	0	0	0
7	0	0	0
8	2	0	0
9	1	2	3

W doświadczeniu z *F. oxysporum* efekt ochronny był wprost proporcjonalny do ilości wprowadzonych trocin (tab. 2 i 3). Przy stosunku gleby i trocin 1:1 każda kombinacja, zarówno z trocinami sterylnymi jak i przerośniętymi przez *Trichoderma* spp., a zwłaszcza z trocinami przerośniętymi *T. harzianum* dała oczekiwany efekt ochronny, w porównaniu z kontrolą. Przy stosunku gleby i trocin 3:1 efekt ochronny był znacznie gorszy (tab. 3).

Niestety, nie zauważono działania ochronnego w stosunku do *R. solani*. Zarówno w kontroli, jak i w poszczególnych kombinacjach liczba zdrowych siewek była bardzo niewielka (tab. 4). Siewki uległy zgorzeli przedwzchodowej kilka dni po wysianiu.

Dyskusja

Produkcja materiału sadzeniowego w Lasach Państwowych wynosi rocznie kilka milionów sztuk sadzonek kilkudziesięciu gatunków drzew i krzewów. Ponad połowę stanowią sadzonki sosny zwyczajnej. Zgorzele systemu korzeniowego siewek i sadzonek należą do groźnych chorób występujących nie tylko w szkółkach leśnych, ale również w siewach odnowieniowych i samosiewach. Przy zaniedbaniach straty mogą sięgać nawet do 80%. Najczęściej są one powodowane przez grzyby glebowe z rodzaju *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Pythium* i *Rhizoctonia* [3]. Z chorobą walczy się najczęściej metodami chemicznymi. Stosuje się dezynfekcję podłoża, zaprawianie nasion, opryski lub podlewanie siewek i sadzonek.

W dobie ekologizacji produkcji roślinnej podejmuje się próby biologicznej ochrony siewów, co może przyczynić się do ograniczenia stosowania fungicydów w szkółkach. Wyniki przedstawionych badań świadczą o istnieniu możliwości ograniczenia wystąpienia zgorzeli siewek powodowanej przez niektóre patogeny glebowe za pomocą grzybów z rodzaju *Trichoderma*, stosowanych w postaci biopreparatu lub w postaci trocin sosnowych lub bukowych zasiedlonych przez *Trichoderma* spp. W warunkach laboratoryjnych *T. viride* i *T. harzianum*, zastosowane w odpowiedniej proporcji, okazały się skuteczne w ograniczaniu porażenia wywołanego przez *C. destructans* i *F. oxysporum* i zupełnie nieskuteczne w walce z *R. solani*. Wynik ten jest efektem określonej specjalizacji pokarmowej *R. solani*. Grzyb chętnie zasiedla fragmenty organiczne, zwłaszcza fragmenty drewna i wydaje się, że wzbogacenie podłoża trocinami lub korą z torfem będzie sprzyjało namnożeniu patogena i może wywołać wzrost zagrożenia z jego strony. Efekt ochronny uzyskano też w przypadku zastosowania sterylnych, nieprzerośniętych przez *Trichoderma* spp. trocin sosnowych i bukowych. Pozytywny wpływ trocin na strukturę gleby, jej właściwości chemiczne i mikrobiologiczne był obserwowany wielokrotnie w przeszłości [4, 5]. Sterylne trociny zostają szybko zasiedlone przez obecne powszechnie w glebie leśnej gatunki *Trichoderma* i dochodzi do znacznego wzrostu populacji grzyba w podłożu. W doświadczeniu użyto niesterylnej gleby leśnej pochodzącej z drzewostanu sosnowego, która z reguły jest wolna od patogenów glebowych i jest silnie zasiedlona przez *Trichoderma* spp. Nawet długotrwała sterylizacja gleby nie zlikwidowałaby prawdopodobnie całej populacji grzybów z rodzaju *Trichoderma*, które są niezwykle odporne na wysoką temperaturę i zdolne do szybkiej reprodukcji w odpowiednim środowisku. Efekt ochronny wywołany wzrostem populacji *Trichoderma* po jej namnożeniu się w podłożu lub wprowadzeniu do podłoża nie jest jednak długotrwały. Badania [4, 5] wskazują, że populacja *Trichoderma* spp. w glebie po wzbogaceniu jej trocinami sosnowymi ulega zredukowaniu już po 2 latach. Większość gatunków *Trichoderma* produkuje enzymy umożliwiające rozkład celulozy, hemicelulozy i białka [1]. Dzięki nim grzyby te aktywnie uczestniczą w procesie rozkładu fragmentów drewna i są w podłożu obecne tak długo jak długo znajduje się w nim atrakcyjna dla nich baza pokarmowa w postaci trocin, kory i torfu. Po jej wyczerpaniu obserwuje się spadek populacji *Trichoderma* spp. Dwa lata są jednak wystarczającym okresem do zabezpieczenia siewek, które są najbardziej wrażliwe w ciągu kilku pierwszych miesięcy wzrostu.

Autorzy nie badali wpływu użytych biopreparatów na grzyby z rodzaju *Pythium*, które powszechnie występują w glebach i podłożach szkółkarskich [3]. Wydaje się jednak, że efekt ochronny może być zbliżony do tego uzyskanego z innymi grzybami zgorzelowymi.

Oba gatunki *Trichoderma* były z powodzeniem używane do eliminowania grzybów z rodzaju *Pythium* w przeszłości [2].

Wydaje się, że efekt ochronny uzyskany w doświadczeniu jest mniejszy od efektu, który uzyskano by po zastosowaniu środków chemicznych. Należy jednak zwrócić uwagę, że potencjał infekcyjny patogena w doświadczeniu, przy zastosowaniu zawiesiny zarodnikowo-strzępkowej lub pożywki przerośniętej grzybnią, był znacznie większy od tego który występuje w większości gleb i podłoży szkółkarskich.

Autorzy bardzo dziękują
Panu Prof. dr R. Siweckiemu za podarowanie preparatu biologicznego.

Literatura

1. **Baath E., Söderström B.:** Degradation of macromolecules by microfungi isolated from different podzolic soil horizons. *Canadian Journal of Botany* 58: 422-425. 1980.
2. **Domsch K. H., Gams W., Anderson T.H.:** Compendium of soil fungi. Acad. Press. 1980.
3. **Kwaśna H., Łakomy P.:** Grzyby powodujące zgorzele korzeni sadzonek drzew leśnych oraz ich występowanie w podłożach szkółkarskich. [W:] Profilaktyka i terapia w szkółkach leśnych zagrożonych przez choroby infekcyjne. Materiały konferencji naukowo-technicznej, 25-25.03.1998. Warszawa – Sękocin. IBL Warszawa 1998: 14-26.
4. **Kwaśna H., Sierota Z.:** Structure of fungal communities in barren post agricultural soil 1 and 2 years after pine sawdust application. *Phytopathologia Polonica* 1999.
5. **Sierota Z., Kwaśna H.:** Effect of pine sawdust on structure of soil fungi communities in the soil of post agricultural land. *Acta Mycologica* 33:77-90. 1998.

Summary

The possibility of control the Scots pine seedlings damping-off with *Trichoderma* spp.

In the laboratory experiment the effectiveness of *Trichoderma harzianum* and *T. viride* in the control of damping-off of pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings caused by *Cylindrocarpon destructans*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* was investigated. *Trichoderma* spp. were used in pine or beech sawdust substrate or in the form of *T. harzianum* powder. There were also sterile pine and beech sawdust used. There were 9 different combinations of the experiment. The test was carried out in the glasshouse, at 20-25°/15-18°C during day and night for 4 weeks. *Trichoderma harzianum* used in the form of water suspension or of powder, as well as in the beech sawdust reduced the damping-off caused by *C. destructans*. The sterile beech sawdust was also effective against *C. destructans*. In the experiment with *F. oxysporum* the protective effect depended on the amount of sawdust used. The reduction of damping-off was possible only when bigger amount of sawdust was used. None reduction of damping-off caused by *R. solani* could be inducted by *Trichoderma* spp. used in sawdust or in the form of powder.