

URSZULA WACHOWSKA, CEZARY POPIELARCZYK, ADRIAN DUBA, KLAUDIA GORIEWA, KATARZYNA KUCHARSKA

Ocena przydatności drożdży i fungicydów do ograniczenia rozwoju grzybów zasiedlających siewki sosny zwyczajnej

Evaluation of the usefulness of yeast and chemical fungicides to reduce development of fungi colonizing Scots pine seedlings

ABSTRACT

Wachowska U., Popielarczyk C., Duba A., Goriewa K., Kucharska K. 2016. Ocena przydatności drożdży i fungicydów do ograniczenia rozwoju grzybów zasiedlających siewki sosny zwyczajnej. Sylwan 160 (7): 556-563.

In the nurseries, Scots pine seedlings that show symptoms of the damping-off usually die. *Rhizoctonia solani*, a rapidly growing fungus, is one of the pathogens that infect the roots of plants. The aims of this study were: (1) to evaluate the susceptibility of *R. solani* and saprotrophic fungi *Mortierella elongata*, *Trichoderma hamatum* and *T. rossicum* to fungicides, (2) to determine whether yeast isolates can be used as effective inhibitors of the pathogen's growth, and (3) to analyze phylogenetic relationships between filamentous fungi. The Switch 62.5 WG fungicide, containing cyprodinil and fludioxonil, most effectively suppressed the growth of the tested *R. solani* isolates, but also exerted ecotoxic effects on the analyzed saprotrophs. The *R. solani* RS 1 isolate did not respond to the presence of azoxystrobin in PDA. Most of the 13 yeast isolates tested in the study inhibited the growth of pathogen colonies, but only one isolate was characterized by inhibitory activity of 59.03% and exerted a strong antagonistic influence on the pathogen. A phylogenetic analysis revealed that the tested isolates represented three clades: 1) *T. hamatum*, 2) *T. rossicum*, and 3) *R. solani*. The phylogenetic tree of *M. hamatum* and *T. rossicum* showing their divergence due to mutations did not reflect their speciation.

KEY WORDS

Mortierella elongata, *Trichoderma hamatum*, *T. rossicum*, biological control, yeasts

ADDRESSES

Urszula Wachowska ⁽¹⁾ – e-mail: urszula.wachowska@uwm.edu.pl
Cezary Popielarczyk ⁽¹⁾, Adrian Duba ⁽¹⁾, Klaudia Goriewa ⁽²⁾, Katarzyna Kucharska ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra Entomologii, Fitopatologii i Diagnostyki Molekularnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski; ul. Prawocheńskiego 17, 10-720 Olsztyn

⁽²⁾ Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski; Plac Łódzki 3, 10-724 Olsztyn

Wstęp

Najważniejszymi patogenami infekującymi system korzeniowy siewek i sadzonek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) są grzyby rodzajów *Rhizoctonia* [Bełka, Mańka 2014], *Fusarium* [Menkis, Vasaitis 2011], *Cylindrocarpon* [Menkis, Vasaitis 2011], *Alternaria* [Giordano i in. 2009] oraz organizmy grzybobodobne rodzajów *Phytophthora* [Duda i in. 2004] i *Pythium* [Kwaśna, Bateman

2009]. Brak specyficznych objawów oraz możliwość infekcji mieszanych generują trudności w identyfikacji patogenu, szczególnie *R. solani* Kühn, który nie tworzy zarodników konidialnych [Bełka, Mańka 2014]. Szybka molekularna identyfikacja ułatwia dobór odpowiedniej metody zwalczania, jednak stosowanie fungicydów o szerokim spektrum działania wpływa ujemnie na środowisko przyrodnicze, w tym na mikroorganizmy saprotroficzne.

Od kilku już lat kładziony jest duży nacisk na ograniczenie stosowania chemicznych środków ochrony roślin w gospodarce leśnej oraz zastąpienie ich metodami biologicznymi lub połączenie z nimi. W Polsce pierwsze badania dotyczące potencjału grzybów rodzaju *Trichoderma* w ochronie biologicznej sosny zwyczajnej przed patogenem *R. solani* zostały przeprowadzone już w 1987 roku [Duda, Sierota 1987]. Innym przykładem stosowania metod biologicznych w polskich lasach jest ochrona drewna pniaków sosny przez *Phlebiopsis gigantea* [Sierota 2013]. Na świecie grzyby rodzaju *Trichoderma* [Sarojini Chakravarthy i in. 2011] oraz drożdże [El-Tarabily 2004] są również wykorzystywane jako ochrona biologiczna. Promuje się też introdukcję grzybów ektomykoryzowych do ochrony siewek sosny pnia (*Pinus pinea*) [Machón i in. 2009]. Analizowany jest także potencjał biologicznej ochrony upraw leśnych przed szkodnikami [Malinowski 2010]. Opracowanie biologicznych metod do stosowania w szkółkach przyczyniłoby się do efektywnej ochrony siewek przed patogenami bez ubocznego negatywnego wpływu na mikroorganizmy saprotroficzne.

Celem badań była identyfikacja molekularna *Rhizoctonia solani* Kühn, *Mortierella elongata* Linnemann, *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier i *Trichoderma rossicum* Bissett, Kubicek & Szakacs, a także analiza powiązań filogenetycznych między tymi gatunkami, ocena wrażliwości tych izolatów na wybrane fungicydy oraz możliwości ograniczenia *R. solani* metodą biologiczną z wykorzystaniem izolatów drożdży.

Materiał i metody

Izolaty uzyskano z korzeni zamierających siewek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) wykazujących objawy porażenia z bryły gleby przylegającej do korzeni, ze szkółki leśnej należącej do Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Białymstoku (23°10'E 53°08'N). Fragmenty korzeni wykładano na podłoże glukozowo-ziemniaczane (PDA, ang. Potato Dextrose Agar) na płytce Petriego (o średnicy 9 cm) po uprzednim ich powierzchniowym odkażeniu w roztworze podchlorynu sodu o stężeniu 1,5%. Bryły gleby przylegające do korzeni sosny umieszczono w szklanych pojemnikach o pojemności 1 dm³. Zastosowano zmodyfikowaną metodę pułapkową do izolacji z gleby grzybów wykorzystujących celulozę jako źródło węgla [Paulitz, Schroeder 2005]. W tym celu w glebie umieszczono na głębokości 2 cm po 20 równomiernie rozmieszczonych pionowo zapatek. Płytki z materiałem roślinnym i glebą inkubowano w temperaturze 24°C przez 48 godzin. Najdynamiczniej rosnące strzępki grzybów pasażowano trzykrotnie w celu otrzymania czystych kultur.

Wstępną identyfikację izolatów wykonano przy pomocy mikroskopu (Nikon Eclipse E200, Japonia). Materiałem do izolacji DNA były strzępki izolatów grzybów rosnące w płynnym podłożu (ekstrakt wołowy 0,1% (w/v), pepton sojowy 0,5% (w/v), chlorek sodu 0,5% (w/v), glukoza 1% (w/v), ekstrakt drożdżowy 0,7% (w/v), woda destylowana) w kolbkach o pojemności 50 cm³, które były inkubowane 48 godzin w temperaturze 24°C. Następnie strzępki izolatów grzybów umieszczono w sterylnych probówkach (Eppendorf) i przechowywano w temperaturze -20°C. Izolację DNA przeprowadzono za pomocą zestawu Bead-Beat Micro AX Gravity (A&A Biotechnology, Polska) według procedury zamieszczonej w zestawie. Ilość i jakość wyizolowanego DNA sprawdzono za pomocą pomiaru absorbancji przy długości fali 260 oraz 280 nm (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Polska).

Amplifikację regionu ITS małej podjednostki 18S rDNA zawierającego 5,8S rDNA przeprowadzono za pomocą starterów ITS4 i ITS5 [White i in. 1990]. Do tego celu wykorzystano zestaw FailSafe PCR System (Epicentre, Stany Zjednoczone). Mieszanina reakcyjna zawierała także 20 ng wyizolowanego DNA i dwa startery (markery): ITS 5 forward GTATCGGACGGAGATCCAGC oraz ITS 4 reverse TTGCTCAGTGCAITGTCGG (synteza – Sigma, Polska). Amplifikację przeprowadzono w termocyklerze (Mastercycler Ep Gradient, Eppendorf). Profil termiczny reakcji ustalono według schematu: denaturacja wstępna w 95°C (3 min), następnie 34 cykle: denaturacja 95°C (1 min), hybrydyzacja 58°C (1 min), wydłużanie 74°C (3 min), w ostatnim etapie 74°C przez 10 minut [White i in. 1990]. Elektroforeza produktów PCR o wielkości 630 bp została przeprowadzona w 1-procentowym żelu agarozowym (Prona Basica LE, Hiszpania) w obecności barwnika midori green (Nippon, Japonia) w buforze TBE (Sigma, Polska). Zdjęcia rozdziłu produktów w żelu agarozowym wykonano przy pomocy transiluminatora (MultiDoc-It, UVP, Stany Zjednoczone). Produkty amplifikacji zsekwencionowano w Instytucie Biofizyki i Biochemii PAN (Warszawa). Identyfikacja na podstawie podobieństwa sekwencji została wykonana za pomocą narzędzia BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) w bazie NCBI.

Ocenę wrażliwości grzybów strzępkowych na fungicydy przeprowadzono na podłożu PDA, na płytkach Petriego o średnicy 9 cm. Podłoże zawierało fungicydy w stężeniach odpowiadających stężeniu preparatu gotowego do użycia podanego przez producenta na etykiecie. Wynosiło ono 1,3% dla fungicydu Switch 62,5 WG (substancje aktywne: cyprodynil i fludioksonil, Syngenta, Polska), 0,67% dla preparatu Gwarant 500 SC (chlorotalonil, Arysta LifeScience, Polska) i 2% dla preparatu Amistar 250 SC (azoksystrobina, Syngenta, Polska). Kontrolę stanowiły płytki wypełnione podłożem PDA bez fungicydów. Na płytki wykładano 5-milimetrowe krążki PDA przerośnięte 48-godzinnymi strzępkami izolatów grzybów strzępkowych wymienionych w tabeli 1. Materiał biologiczny inkubowano 4 doby w temperaturze 24°C.

Wpływ izolatów drożdży na rozwój kolonii izolatów grzybów strzępkowych oceniono metodą pomiaru wielkości i kształtu kolonii tych grzybów. Izolaty drożdży pochodziły z ziarna i liści pszenicy ozimej odmiany Bogatka oraz owoców jabłoni i śliwy. Izolaty drożdży wysiewano na podłoże PDA w odległości 2 cm od wyłożonego krążka PDA przerośniętego 48-godzinną kolonią patogenu. Kolonie kontrolne *R. solani* rosnące bez obecności drożdży miały powierzchnię 63 cm² i kształt koła (współczynnik eliptyczności=1). Kultury inkubowano 4 doby w temperaturze 24°C.

Tabela 1.

Molekularna identyfikacja badanych grzybów strzępkowych
Molecular identification of investigated filamentous fungi

Izolat Isolate	Najbliższa sekwencja w bazie (numer akcesji w GenBank) Closest database match (GenBank accession number)	Pokrycie znalezionej sekwencji / Homologia sekwencji Query cover / Identity
RS 22	<i>Rhizoctonia solani</i> (EU730865.1)	100% / 99%
RS 35	<i>Rhizoctonia solani</i> (FJ492073.2)	100% / 100%
T 9	<i>Trichoderma rossicum</i> (JQ666652.1)	100% / 99%
M 10	<i>Mortierella elongata</i> (KC018241.1)	100% / 99%
T 11	<i>Trichoderma rossicum</i> (HQ342419.1)	100% / 100%
T 14	<i>Trichoderma hamatum</i> (KM491889.1)	99% / 98%
T 36	<i>Trichoderma hamatum</i> (KF856960.1)	100% / 100%
T 37	<i>Trichoderma hamatum</i> (EF596960.1)	100% / 100%
T 38	<i>Trichoderma hamatum</i> (KF922332.1)	100% / 100%

Program MEGA 6 posłużył do porównania sekwencji izolatów własnych oraz referencyjnych w celu ustalenia pokrewieństwa ewolucyjnego. Do konstrukcji kladogramu została wykorzystana metoda Neighbour-Joining (NJ, metoda najbliższego sąsiada). Wiarygodność drzew została oszacowana z użyciem testu samopróbkowania (2000 replikacji, im wyższa wartość testu, tym większe pokrewieństwo). Kolonie grzybów strzępkowych i drożdży sfotografowano (Sony Alpha DSLR-A330), a ich obrazy wprowadzono do pamięci komputera (PC, Integrit, Polska). Obrazy analizowano programem graficznym ImageJ 1.49 w celu pomiaru powierzchni kolonii grzybni. Cecha ta posłużyła do określenia skuteczności fungicydów w ograniczaniu rozwoju grzybów według wzoru:

$$100\% - b/a \cdot 100\%$$

gdzie:

- a* – powierzchnia kolonii próby kontrolnej,
- b* – powierzchnia kolonii rosnącej na podłożu z fungicydem.

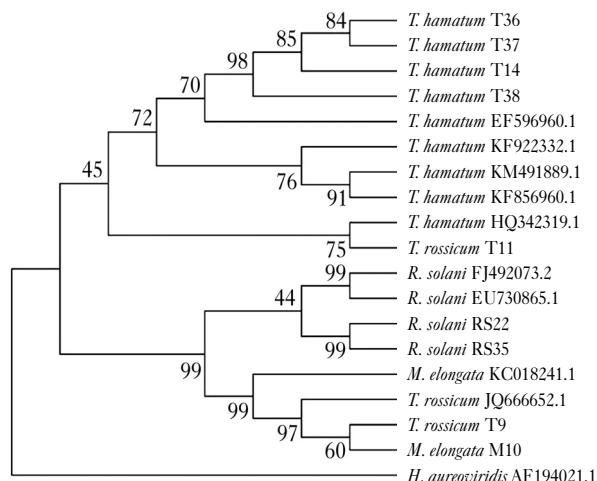
W eksperymencie z przydatnością drożdży do ograniczenia rozwoju patogenu, obok powierzchni kolonii patogenu, dodatkowo zmierzono średnice jego kolonii w dwóch prostopadłych kierunkach. Współczynnik eliptyczności kolonii obliczono, dzieląc krótszą średnicę przez dłuższą. Na potrzeby badań przyjęto, że przy wartości tego współczynnika na poziomie powyżej 0,69 dany izolat drożdży nie miał istotnego antagonistycznego wpływu na rozwój kolonii. Po sprawdzeniu warunku normalności rozkładu wykonano analizę wariancji za pomocą programu Statistica 12 (ANOVA). Istotność różnic między średnimi oszacowano testem Duncana ($p < 0,01$).

Wyniki

Kolonie grzybów *R. solani*, *M. elongata* i *T. hamatum* były typowe dla tych gatunków pod względem morfologii i tempa wzrostu. Mikroskopowa identyfikacja *M. elongata* i *T. hamatum* na podstawie zarodnikowania została potwierdzona molekularnie. Po przeprowadzeniu analizy sekwencji amplikonu o wielkości około 630 bp, reprezentującego regiony ITS 4 i ITS 5 rDNA, zidentyfikowano dwa izolaty gatunku *R. solani*: RS 22 i RS 35 (tab. 1). Sekwencje analizowanych amplikonów izolatów grzybów saprotroficznych pokrywały się w co najmniej 98% z sekwencjami izolatów referencyjnych.

Analiza drzewa filogenetycznego skonstruowanego na podstawie wybranych sekwencji nukleotydowych izolatów grzybów własnych i referencyjnych wykazała, że izolaty własne *T. hamatum* (T 36, T 37, T 14, T 38) i referencyjne (numery akcesyjne: EF596960.1, KF922332.1, KM491889.1, KF856960.1) grupują się blisko siebie (ryc.). Wzorcowy izolat *T. rossicum* (HQ342419.1) grupował się z izolatem własnym tego samego gatunku (T 11). Izolaty *R. solani* (FJ492073.2, EU730814.1, RS 22, RS 35) grupowały się w bliskiej odległości. Kolejną grupę stanowił izolat *M. elongata* (KC018241.1) grupujący się bezpośrednio z izolatem *T. rossicum* (JQ666652.1, T 9) oraz pośrednio z parą izolatów *M. elongata* (M 10) i *T. rossicum* (T 9). Grupę zewnętrzną stanowił gatunek *Hypocrea aureoviridis* (AF194021.1).

Fungicyd zawierający cyprodynil i fludioksonil (Switch 62,5 WG) najskuteczniej ograniczał wzrost wszystkich testowanych izolatów patogenu *R. solani*, a skuteczność preparatu z chlorotalonilem (Gwarant 500SC) oszacowano na poziomie od 88,95 do 93,63% (tab. 2). Najmniej efektywny w redukcji rozwoju kolonii *R. solani* był fungicyd z azoksystrobiną (Amistar 250 SC). Dodatkowo izolat *R. solani* RS 1 okazał się niewrażliwy na jego obecność w podłożu. Wszystkie testowane fungicydy znacząco ograniczyły wzrost grzybów saprotroficznych (tab. 2). Takie ekotoksyczne

**Ryc.**

Określone metodą łączenia sąsiedzkiego (NJ) pokrewieństwo filogenetyczne pomiędzy gatunkami grzybów zidentyfikowanymi przy pomocy markerów ITS 4 i ITS 5

Neighbor-joining based phylogenetic affinity between fungi species identified with ITS 4 and ITS 5 markers

Istotność oceniona testem samopróbkowania (2000 replikacji) przy odsetku poparcia bootstrap >70%
Significance assessed with bootstrap test (2000 replicates) and the bootstrap support >70%

Tabela 2.

Wrażliwość [%] wybranych izolatów na obecność fungicydów w podłożu
Sensitivity [%] of selected isolates on the presence of fungicides in the medium

Izolat Isolate	Switch 62,5 WG	Gwarant 500 SC	Amistar 250 SC
<i>R. solani</i> RS 22	100,0	89,42	88,73
<i>R. solani</i> RS 35	94,6	88,95	97,88
<i>R. solani</i> R S 1	98,1	93,63	0,00
<i>T. rossicum</i> T 9	100,0	68,57	72,17
<i>M. elongata</i> M 10	100,0	88,46	72,86
<i>T. rossicum</i> T 11	100,0	98,10	86,57
<i>T. hamatum</i> T 14	100,0	95,21	83,02
<i>T. hamatum</i> T 36	79,4	91,87	68,32
<i>T. hamatum</i> T 37	66,8	96,71	0,00
Średnia Average	93,2	90,10	63,28

działanie było szczególnie wyraźne na płytkach, na których testowano fungicyd zawierający cyprodynil i fludioksonil, całkowicie hamujący rozwój *T. rossicum* T 9, T 14, *M. elongata* M 10 oraz *T. hamatum* T 14. Azoksystrobina okazała się najmniej ekotoksyczna wobec saprotrofów.

Siedem testowanych izolatów drożdży (*Cryptococcus* sp. 410, *A. pullulans* 415, 709, 745, 754, CC, *Sporobolomyces* sp. SEN1) rosnących w sąsiedztwie kolonii izolatu *R. solani* RS 22 istotnie ograniczyło ich rozwój w porównaniu z kolonią kontrolną (tab. 3). Z kolei izolaty *A. pullulans* 415, 709, 745, i CC, *Cryptococcus* sp. 410 oraz *Sporobolomyces* sp. JEp2 ograniczały rozwój kolonii izolatu RS 35. Kolonie izolatu *R. solani* RS 1 na ogół przerastały kolonie drożdży wysiane na podłożu PDA. Wyjątek stanowiły płytki, na których wprowadzono izolat *A. pullulans* 754. Izolat ten znacząco modyfikował kształt kolonii trzech izolatów *R. solani*. Właściwość taką posiadały też izolaty *A. pullulans* 415, 709, 745 i CC, lecz wobec tylko jednego lub dwóch izolatów fitopatogenu.

Tabela 3.

Ograniczanie wzrostu kolonii patogenu *Rhizoctonia solani* przez izolaty drożdży
Inhibition of the growth of the pathogen *Rhizoctonia solani* colonies by yeast isolates

Izolat Isolate	Współczynnik eliptyczności Coefficient of ellipticity			Powierzchnia kolonii [cm ²] Area of colony		
	RS 1	RS 22	RS 35	RS 1	RS 22	RS 35
<i>Aureobasidium pullulans</i> 228	1,00	1,00	1,00	63,00a	63,00a	63,00a
<i>Cryptococcus</i> sp. 405	0,98	1,00	0,99	63,00a	63,00a	63,00a
<i>Cryptococcus</i> sp. 410	1,00	0,70	0,70	63,00a	26,84h	42,08defg
<i>A. pullulans</i> 415	0,76	0,60	0,63	57,71ab	29,02gf	27,25gh
<i>Sporobolomyces</i> sp 418	1,00	0,92	0,89	63,00a	58,56ab	52,98ab
<i>A. pullulans</i> 454	0,98	0,73	0,90	63,00a	23,33h	52,55abc
<i>Rhodotorula glutinis</i> 458	1,00	0,91	0,81	63,00a	52,98abc	55,73abc
<i>A. pullulans</i> 709	1,00	0,68	0,66	63,00a	32,21fgh	33,64fgh
<i>A. pullulans</i> 745a	1,00	0,66	0,65	63,00a	30,15fgh	32,28fgh
<i>A. pullulans</i> 754	0,61	0,56	0,69	28,91gh	25,25gh	52,55abc
<i>A. pullulans</i> CC	0,70	0,63	0,60	58,03ab	30,02gh	30,36gh
<i>Sporobolomyces</i> sp. JEn1	0,98	0,88	0,89	63,00a	48,77abcd	55,18abc
<i>Sporobolomyces</i> sp JEp2	0,96	0,85	0,85	63,00a	51,13abc	45,80defg
<i>Sporobolomyces</i> sp SE n1	0,98	0,86	0,86	63,00a	48,17bcde	50,85abc
Średnia Average	0,93	0,79	0,80	60,23a	42,13b	47,22b

te same litery oznaczają wartości nie różniące się istotnie według testu Duncana ($p < 0,01$)
the same letter indicates lack of significant difference according to the Duncan test ($p < 0,01$)

Dyskusja

W niniejszej pracy poszczególne gatunki grzybów strzępkowych zostały zidentyfikowane za pomocą tradycyjnej metody mikroskopowej oraz metodą molekularną. W przypadku *M. elongata* oraz *T. hamatum* technika molekularna potwierdziła identyfikację mikroskopową. Problematyczny w identyfikacji mikroskopowej okazał się grzyb *R. solani*, który nie tworzy zarodników konidialnych, co potwierdzało wcześniejsze doniesienia [Mikołajska, Wachowska 1996; Lenc, Sadowski 2010]. Grzyb *T. rossicum* Bissett Kubicek & Szakacs jest gatunkiem należącym do rodzaju *Trichoderma*, który po raz pierwszy został zidentyfikowany w glebie Syberii na początku XXI wieku [Bissett i in. 2003]. Jak dotąd *T. rossicum* nie został stwierdzony i opisany w Polsce, dlatego jest to najprawdopodobniej pierwsza identyfikacja tego gatunku w glebie w środowisku leśnym w tym rejonie. O występowaniu tego gatunku w lasach Austrii donosili Friedl i Druzhinina [2012].

Analiza drzewa filogenetycznego wykazała grupowanie w niedalekiej odległości izolatów *T. hamatum* i *T. rossicum*, co sugerowało możliwe bliskie pokrewieństwo tych gatunków. Jest to zgodne z danymi literaturowymi klasyfikującymi oba gatunki do sekcji *Pachybasium* [Bissett i in. 2003]. Analiza filogenetyczna wykazała, że badane izolaty grupowały się w trzech głównych kładach: 1) *T. hamatum*, 2) *T. rossicum* i 3) *R. solani*. Cztery kład zgrupował izolaty dwóch gatunków – *M. elongata* oraz *T. rossicum*. Przy konstruowaniu drzewa filogenetycznego gatunek *H. aureoviridis* reprezentował grupę zewnętrzną umożliwiającą umieszczenie korzenia drzewa. Lokalizacja w drzewie filogenetycznym izolatów *R. solani*, *Trichoderma* spp., a także *M. elongata* w odrębnych kładach potwierdza odległość ewolucyjną tych gatunków [Sayers i in. 2009]. Bliskie grupowanie izolatów *M. elongata* z dwoma izolatami *T. rossicum* jest rezultatem dyskusyjnym ze względu na różnice taksonomiczne tych gatunków [Sayers i in. 2009]. Pomimo wysokiej wartości

testu samopróbkowania wydaje się, że jest to mylne dopasowanie. Wygenerowany kladogram odzwierciedla jedynie różnice genetyczne między badanymi gatunkami powstałe na skutek zmian ewolucyjnych. Dodatkowe trudności w skonstruowaniu rzeczywistego drzewa filogenetycznego mogą pojawiać się także w przypadku niewystarczającej długości i zróżnicowania sekwencji bądź też pojawienia się sekwencji pochodzącej z horyzontalnego transferu genów [Koonin i in. 2002].

Z praktycznego punktu widzenia istotna jest szybka identyfikacja patogenu oraz zastosowanie fungicydów ograniczających jego rozwój bez negatywnego wpływu na gatunki pożyteczne rodzaju *Trichoderma*. W badaniach własnych wykazano jednak, że rozwój kolonii rodzaju *Trichoderma* był w podobnym stopniu ograniczany przez fungicydy, jak patogenu *R. solani*. Należy uznać, że takie działanie fungicydów jest niekorzystne. W badaniach Sarojini Chakravarthy i in. [2011] izolat *T. aureoviride* pochodzący z gleby środowiska leśnego ograniczał o 77% rozwój kolonii patogenu *R. solani*. Cytowani autorzy wykazali także, że fungicydy triazolowe (heksakonazol, tricyklazol) i benzimidazolowy (karbendazym) testowane w warunkach *in vitro* całkowicie ograniczyły rozwój kolonii kilku gatunków rodzaju *Trichoderma*. W niniejszych badaniach najbardziej toksyczny dla badanych saprotrofów był fungicyd z grupy anilinopirimidyn (cyprodynil) i fenylopiroli (fludioksonil).

W prezentowanych badaniach na ogół wszystkie testowane fungicydy wykazywały bardzo dobrą skuteczność w ograniczeniu rozwoju patogenu *R. solani*. Wyjątkowo azoksystrobiną nie ograniczała rozwoju izolatu *R. solani* RS 1. W badaniach przeprowadzonych przez Olaya i in. [2013] wykazano po zsekwencjonowaniu genu cytochromu b obecność izolatów *R. solani* posiadających substytucję fenyloalaniny na leucynę w kodonie 129 genu cytochromu b (mutacja F129L), która warunkuje odporność grzybów na fungicydy strobilurynowe. Częstotliwość występowania izolatów odpornych *R. solani* infekujących ryż na plantacjach w Luizjanie była zróżnicowana w zależności od lokalizacji pola i wynosiła od 7 do 100%. Należy jednak podkreślić, że z uwagi na biologię grzyba *R. solani* prawdopodobieństwo wyselekcjonowania izolatów odpornych w środowisku leśnym jest niskie ze względu na małą presję selekcyjną fungicydów strobilurynowych.

W niniejszych badaniach tylko jeden (*A. pullulans* 754) z 13 testowanych izolatów drożdży silnie ograniczał wzrost kolonii patogenu (konkurencja o przestrzeń i pokarm) i jednocześnie wydzieliał do podłoża substancje toksyczne silnie zmieniające kształt kolonii patogenu poprzez tworzenie stref inhibicji (antybioza). Możliwościom wykorzystania drożdży do ochrony roślin przed sprawcami zgorzeli siewek poświęcono jak dotychczas mało uwagi. W pracy El-Tarabily [2004] opisano pozytywne oddziaływanie drożdży *Candida valida*, *Rhodotorula glutinis* i *Trichosporon asahii* na zdrowotność siewek buraków inokulowanych patogenem *R. solani*.

Wnioski

- ✦ Fungicydy zawierające cyprodynil i fludioksonil, chlorotalonil oraz azoksystrobinę skutecznie ograniczają rozwój kolonii patogenu *R. solani*.
- ✦ Testowane fungicydy posiadają silne inhibicyjne działanie wobec gatunków rodzaju *Trichoderma*.
- ✦ Drożdże mogą stać się potencjalnie przydatne do ograniczenia patogenu *R. solani* w glebowym środowisku leśnym, ponieważ ich nieliczne wyselekcjonowane izolaty ograniczają jego rozwój.
- ✦ Analizy molekularne są niezbędne do identyfikacji patogenów roślin trudnych do oznaczenia innymi technikami, umożliwiając także analizę pokrewieństwa między gatunkami.

Literatura

- Bełka M., Mańka M. 2014. Characteristics and diversity of *Rhizoctonia* spp. population in soil of selected forest bare-root nurseries in Poland. *Acta Mycologica* 49 (2): 279-290.

- Bissett J., Szakaacs G., Nolan C. A., Druzhinina I., Gradinger C., Kubicek C. P. 2003. New species of *Trichoderma* from Asia. Canadian Journal of Botany 81 (6): 570-586.
- Duda B., Orlikowski L. B., Szkuta G. 2004. Zasiadanie siewek sosny zwyczajnej przez *Phytophthora cinnamomi* Rands w szkółkach leśnych. Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin 44 (1): 59-63.
- Duda B., Sierota H. 1987. Survival of Scots pine seedlings after biological and chemical of damping-off in in plastic greenhouses. European Journal of Plant Pathology 17: 110-117.
- El-Tarabily K. A. 2004. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. Journal of Applied Microbiology 96: 69-75.
- Friedl M. A., Druzhinina I. S. 2012. Taxon-specific metagenomics of *Trichoderma reveals* a narrow community of opportunistic species that regulate each other's development. Microbiology 158: 69-83.
- Giordano L., Gonthier P., Varese G. C., Miserere L., Nicolotti G. 2009. Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees in the Alps. Fungal Diversity 38: 69-83.
- Koonin E. V., Wolf Y. I., Karev G. P. 2002. The structure of the protein universe and genome. Nature 420: 218-223.
- Kwaśna H., Bateman G. L. 2009. Microbial communities in roots of *Pinus sylvestris* seedlings with damping-off symptoms in two forest nurseries as determined by ITS1/2 rDNA sequencing. Forest Pathology 39: 239-248.
- Lenc L., Sadowski C. 2010. Identyfikacja techniką PCR grup anastomozowych izolatów *Rhizoctonia solani* Kühn z bulw i kielków ziemniaka pochodzących z różnych regionów Polski. Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin 50 (2): 669-672.
- Machón P., Pajares J. A., Diez J. J., Alves-Santos F. M. 2009. Influence of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* on pre-emergence, postemergence and late damping-off by *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* on Stone pine seedlings. Symbiosis 49: 101-109.
- Malinowski H. 2010. Możliwości ochrony lasu przed owadami uszkadzającymi systemy korzeniowe metodą biologiczną z wykorzystaniem grzybów entomopatogennych. II. Skuteczność bioinsektycydów grzybowych w ograniczaniu liczebności pędraków chrabąszczy (*Melolontha* spp.) i innych szkodników korzeni. Sylwan 154 (1): 15-23.
- Menkis A., Vasaitis R. 2011. Fungi in roots of nursery grown *Pinus sylvestris*: ectomycorrhizal colonisation, genetic diversity and spatial distribution. Microbial Ecology 61 (1): 52-63.
- Mikołajaska J., Wachowska U. 1996. Characterization of binucleate isolates of *Rhizoctonia cerealis* with respect to cereals. W: Kowalik M., Kowalski S. [red.]. Eastern Poland Symposium on New Directions in Plant Pathology, Sep 11-13. Kraków, Poland. 303-306.
- Olaya G., Sarmiento L., Edlebeck K., Buitrago C., Sierotzki H., Zaunbrecher J., Tally A. 2013. Azoxystrobin (QoI) resistance monitoring of *Rhizoctonia solani* isolates causing rice sheath blight in Louisiana (Abstr.) Phytopathology 103 (2): S2.106. <http://dx.doi.org/10.1094/>
- Paulitz T. C., Schroeder K. L. 2005. A new method for the quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* from soil. Plant Diseases 89: 767-772.
- Sarojini Chakravarthy K., Nagamani A., Rahel Ratnakumari Y., Bramarambha S. 2011. Antagonistic ability against *Rhizoctonia solani* and pesticide tolerance of *Trichoderma strains* 2631. Advances in Environmental Biology 5 (9): 2632-2638.
- Sayers E. W., Barrett T., Benson D. A., Bryant S. H., Canese K., Chetvernin V., Church D. M., DiCuccio M., Edgar R., Federhen S., Feolo M., Geer L. Y., Helmberg W., Kapustin Y., Landsman D., Lipman D. J., Madden T. L., Maglott D. R., Miller V., Mizrachi I., Ostell J., Pruitt K. D., Schuler G. D., Sequeira E., Sherry S. T., Shumway M., Sirotkin K., Souvorov A., Starchenko G., Tatusova T. A., Wagner L., Yaschenko E., Ye J. 2009. Database resources of the national center for biotechnology information. Nucleic Acids Research 37: D5-15.
- Sierota Z. 2013. Heterobasidion root rot in forests on former agricultural lands in Poland: Scale of threat and prevention. Academic Journals 8 (47): 2298-2305.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. W: Innis M., Sninsky G. J., White T. [red.]. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press. 315-322.