

TOMASZ OSZAKO, ANNA ŻÓŁCIAK, MIRELA TULIK, MIŁOSZ TKACZYK,  
MARCIN STOCKI, JUSTYNA A. NOWAKOWSKA

## Wpływ *Bacillus subtilis* i *Trichoderma asperellum* na rozwój sadzonek brzoź zainfekowanych patogenem drobnych korzeni *Phytophthora plurivora*\*

Influence of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* on the development of birch seedlings infected with fine root pathogen *Phytophthora plurivora*

### ABSTRACT

Oszako T., Żółciak A., Tulik M., Tkaczyk M., Stocki M., Nowakowska J. A. 2019. Wpływ *Bacillus subtilis* i *Trichoderma asperellum* na rozwój sadzonek brzoź zainfekowanych patogenem drobnych korzeni *Phytophthora plurivora*. Sylwan 163 (12): 1006-1015. DOI: <https://doi.org/10.26202/sylwan.2019106>.

*Phytophthora* pathogens cannot be controlled with well-known fungicides, because as oomycetes they do not synthesize chitin and ergosterol. Phytopathogenic microorganisms of *Phytophthora* genus offers an alternative to pesticides. The aim of the study was to understand the interactions among the host silver birch (*Betula pendula*), a common forest tree species in Polish lowlands and in lower mountain locations, and its primary pathogen *Phytophthora plurivora* as well as potential Biological Control Agents *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum*. The 2-year-old silver birch seedlings were selected for this experiment. Interactions between *P. plurivora* and *B. subtilis*, producing peptide antibiotics including polymyxin B and subtilin, stimulated growth of birch seedlings. Comparing to the control a stimulation of both height and root collar diameter of plants was observed when *B. subtilis* was added into the soil of pots. It is a saprophyte, decomposing organic compounds of plant origin. However, the application of bacterium into the rhizosphere soil stimulated more shoots growth than roots. The application of *T. asperellum* into the soil stimulated development of roots, and in consequences the above-ground parts of plants. However, in the combination with pathogen, *T. asperellum* protected the roots only partially. The presence of pathogen and its antagonists increases the biomass of birches compared to control plants. Chlorophyll fluorescence studies proved better parameters like total performance index (PI total) after application of *B. subtilis*, in contrast, interaction between *B. subtilis* and *P. plurivora* negatively affected photosynthesis causing weakening of plants. The higher content of carboxylic acids, observed in the variant with *T. asperellum* + *P. plurivora*, indicates the initiation of biochemical defence processes in birch leaves cells.

### KEY WORDS

oomycetes, bacterium, fungus, interactions, *Betula pendula*

### ADDRESSES

Tomasz Oszako <sup>(1)</sup> – e-mail: T.Oszako@ibles.waw.pl  
Anna Żółciak <sup>(1)</sup>, Mirela Tulik <sup>(2)</sup>, Miłosz Tkaczyk <sup>(1)</sup>, Marcin Stocki <sup>(3)</sup>, Justyna A. Nowakowska <sup>(4)</sup>

\*Praca wykonana w ramach projektu „Interakcje pomiędzy uszkodzeniami drobnych korzeni powodowanymi przez gatunki *Phytophthora* a defoliacją brzoź (*Betula* sp.) przez miernikowce (*Geometridae*)”, sfinansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach działalności statutowej (nr 240327).

- (1) Zakład Ochrony Lasu, Instytut Badawczy Leśnictwa; Sękocin Stary, ul. Braci Leśnej 3, 05-090 Raszyn  
(2) Samodzielny Zakład Botaniki Leśnej, SGGW w Warszawie; ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa  
(3) Zamiejscowy Wydział Leśny w Hajnówce, Politechnika Białostocka; ul. Piłsudskiego 1A, 17-200 Hajnówka  
(4) Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego; ul. Wóycickiego 1/3, 01-938 Warszawa

## Wstęp

Interakcje pomiędzy roślinami i organizmami bytującymi w środowisku determinują zdrowotność drzew. Stres środowiskowy zazwyczaj zwiększa podatność roślin na choroby, m.in. znaczna utrata liści wskutek żerowania foliofagów powoduje ogólne osłabienie rośliny, a w konsekwencji sprzyja infekcjom korzeni przez lęgniowce (*Oomyces*), np. *Phytophthora plurivora* (T. Jung & T. I Burgess) [Schoeneweiss 1978]. Mikroorganizm ten jest w Polsce najczęstszym patogenem drobnych korzeni wielu gatunków drzew liściastych, również w ekosystemach leśnych, szkółkach i na plantacjach [Jung, Burgess 2009; Orlikowski i in. 2011]. Rytkönen i in. [2012] donoszą, że w Finlandii *P. plurivora* powoduje fytoftorozę brzozy brodawkowatej (*Betula pendula* Roth.), jednak w Polsce brak jest doniesień o patogeniczności tego gatunku w odniesieniu do brzoź.

Zarówno *P. plurivora*, jak i inni sprawcy fytoftorozy nie są skutecznie zwalczani przy użyciu fungicydów, ponieważ – w odróżnieniu od grzybów – lęgniowce nie syntetyzują chityny i ergosterolu. Istnieje zatem potrzeba poszukiwania innych sposobów ochrony przed patogenami z rodzaju *Phytophthora*. Liczne badania dokumentują możliwość zastosowania do tego celu biologicznych metod z udziałem grzybów z rodzaju *Trichoderma* i bakterii z rodzaju *Bacillus* [Grosch i in. 1999; Costa i in. 2000; Okbasillasie 2005; Voitka, Orlikowski 2005; Becker 2011; Jagtapa i in. 2012; Kumar i in. 2012; Lara-Chávez i in. 2012; Yáñez-Mendizábal i in. 2012; You i in. 2016; Kowalska i in. 2017]. Najsilniejsze działanie hamujące rozwój patogenów z rodzaju *Phytophthora* stwierdza się przy zastosowaniu *T. atroviride* oraz *T. virens*. Metabolity ekstrahowane z tych mikroorganizmów wykazują bowiem silne działania inhibicyjne, które potwierdzono przy użyciu minimalnego stężenia hamującego, dyfuzji dyskowej i testów na antybiotyki [Bae i in. 2016]. Z kolei Caulier i in. [2018] podają, że bakteria *B. subtilis* cechuje się właściwościami antagonistycznymi w stosunku do innych organizmów i jest stosowana w biopreparatach.

Celem badań było poznanie reakcji sadzonek brzozy brodawkowatej *B. pendula* na wprowadzenie do gleby *P. plurivora* i jego naturalnych antagonistów w postaci izolatu grzyba *T. asperellum* oraz bakterii *B. subtilis*. Badano, czy naturalni antagoniści wpływają korzystnie na rozwój roślin i czy ograniczają rozwój patogenu.

## Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły sadzonki brzozy brodawkowatej *B. pendula* pochodzące ze szkółki w Nadleśnictwie Chojnów (52°02'20,3"N 21°05'21,1"E), które wiosną 2016 roku posadzono jako dwuletnie rośliny w wazonach o objętości 250 cm<sup>3</sup>, zawierających mieszaninę gleby ogrodniczej (pH 5,5) i wermikulitu w stosunku 2:1. Glebę zaszczerpiono czystymi kulturami *Trichoderma* sp. IZR D-11 (zidentyfikowanymi w trakcie badań jako *T. asperellum*) i *Bacillus subtilis* IZR B 2-1. Po 14 dniach do gleby wokół roślin wprowadzono inokulum *P. plurivora* (7-dniową czystą kulturę tego mikroorganizmu wraz z pożywką agarowo-ziemniaczaną PDA Becton Dickinson). Inokulum *P. plurivora* przygotowano według metodyki Junga i in. [1996], natomiast inokulum antagonistów uzyskano poprzez hodowlę *T. asperellum* na pożywce maltozowo-agarowej i *B. subtilis* na podłożu bakteryjnym. Zawiesinę BCA (1×10<sup>9</sup> CFU/ml) dodawano do każdej doniczki w ilości 100 ml.

Doświadczenie obejmowało następujące warianty: kontrola (1), *B. subtilis* (2), *T. asperellum* (3), *P. plurivora* (4), *B. subtilis* + *P. plurivora* (5) i *T. asperellum* + *P. plurivora* (6). W każdym wariantcie wykorzystano jako powtórzenia 15 brzoź.

W sezonie wegetacyjnym 2018 roku wykonano za pomocą grubościomierza pomiary średnicy szyjek korzeniowych, a po zakończeniu sezonu wegetacyjnego rośliny zważono i zmierzono ich wysokość. Świeżą masę części nadziemnych i podziemnych zważono bezpośrednio po zbiorze, a suchą biomasę po wysuszeniu w temperaturze 60°C (po 72 h).

Aby ocenić skuteczność ochrony biologicznej przez *T. asperellum* i *B. subtilis* przeciwko *P. plurivora*, korzenie brzoź wyjęto z podłoża i zmierzono ich długość za pomocą skanera wodnego i oprogramowania WinRhizo.

W celu potwierdzenia obecności *P. plurivora* w glebie ryzosferowej i zaszczerpionych tkankach roślin (postulaty Kocha) zastosowano metody pułapkowania, wyszczepiania na pożywki selektywne (obserwacje mikroskopowe morfologii kultur) oraz analizy DNA. Reizolacje *P. plurivora* wykonano z liści dębu (których użyto jako pułapki) oraz z zainfekowanych tkanek brzoź. Inokulum wykładano na pożywki selektywne PARPH z dodatkiem antybiotyków [Jung i in. 1996].

Izolaty DNA z pułapek roślinnych oraz czystych kultur otrzymano za pomocą zestawów NucleoSpin® Plant II Midi kit (Macherey-Nagel, Niemcy). Reakcje PCR przeprowadzono w aparacie RotorGene 6000 (Qiagen, Hilden, Niemcy) dla pary starterów ITS1/ITS4 dla *P. plurivora* [White i in. 1990] i *T. asperellum* [Hermosa i in. 2000]. Produkty PCR oczyszczano za pomocą zestawów Gel-out (A&A Biotechnology, Polska) i sekwencjonowano w aparacie ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) według zaleceń producenta. Otrzymane sekwencje ITS1-5.8S-ITS2 rDNA porównywano z internetową bazą sekwencji w GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) i określano nazwę gatunkową dla 100% nukleotydowego podobieństwa w programie NCBI-BLAST (E value=0).

Detekcję substancji lotnych w świeżych liściach brzoź wykonano przed zakończeniem eksperymentu w 2018 roku. W tym celu świeże liście (1 g) umieszczono w zamkniętym naczyniu o pojemności 60 ml i ogrzewano w temperaturze 50°C przez 60 minut. Następnie do naczynia wprowadzono włókno SPME (ang. solid phase microextraction) pokryte fazą stacjonarną CAR/PDMS (ang. carboxen/polydimethylsiloxane). Adsorpcję substancji lotnych emitowanych przez liście brzozy prowadzono z fazy gazowej w temperaturze 50°C przez 30 min. Natomiast termicznej desorpcji analitów z włókna SPME dokonano w dozowniku chromatografu w czasie 10 min w temperaturze 250°C. Analizę składu chemicznego wykonano przy użyciu chromatografu gazowego Agilent 7890A wyposażonego w spektrometr mas Agilent 5975C (GC-MS – ang. gas chromatography-mass spectrometry). Rozdział przeprowadzono na kolumnie kapilarnej HP-5MS o wymiarach 0,25 mm × 30 m × 0,25 µm. Początkowa temperatura pieca wynosiła 35°C, przyrost temperatury 5°C/min, a temperatura końcowa 250°C. Temperatura źródła jonów oraz kwadrupolu wynosiła odpowiednio 230 i 150°C, zaś szybkość przepływu helu przez kolumnę chromatograficzną była równa 1 mL/min. Dozownik pracował w trybie bez podziału próbek.

Identyfikacji związków chemicznych dokonano na podstawie widm mas poszczególnych substancji otrzymanych podczas analizy GC-MS, które porównywano z widmami z biblioteki NIST Mass Spectral Database. Przy identyfikacji wykorzystano również eksperymentalne wartości indeksów retencji, które porównano z indeksami dostępnymi w literaturze [Stocki i in. 2018]. Zawartość procentową poszczególnych substancji obliczono na podstawie pola powierzchni odpowiadających im pików na chromatogramie, przyjmując jako 100% sumę pól powierzchni wszystkich oznaczanych związków.

Przed zakończeniem eksperymentu wykonano latem przy użyciu fluorymetru Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd.) pomiary bezpośredniej fluorescencji chlorofilu na środkowej części dojrzałej blaszki liściowej (na próbkach o powierzchni 4 mm<sup>2</sup>) za pomocą specjalnych klipsów. Dla każdej kombinacji doświadczalnej przeprowadzono po 10 pomiarów. Przed rozpoczęciem pomiaru brzozy przetrzymywano przez 45-60 min w ciemności w temperaturze pokojowej. Pomiaru dokonano według standardowego protokołu zalecanego przez producenta aparatu, przy natężeniu impulsu światła 3500 μmol/m<sup>2</sup>/s i czasie jego trwania równym 1 s. Otrzymane wartości wskaźników fluorescencji [Kalaji 2011] przedstawiono w postaci wykresu radarowego.

Do analiz zastosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa, a w przypadku wskazania istotnych statystycznie różnic między wariantami przeprowadzono dodatkowo porównanie średnich rang w celu wyłonienia wariantów, które istotnie różniły się od pozostałych. Analizy wykonano przy użyciu oprogramowania Statistica 13.1.

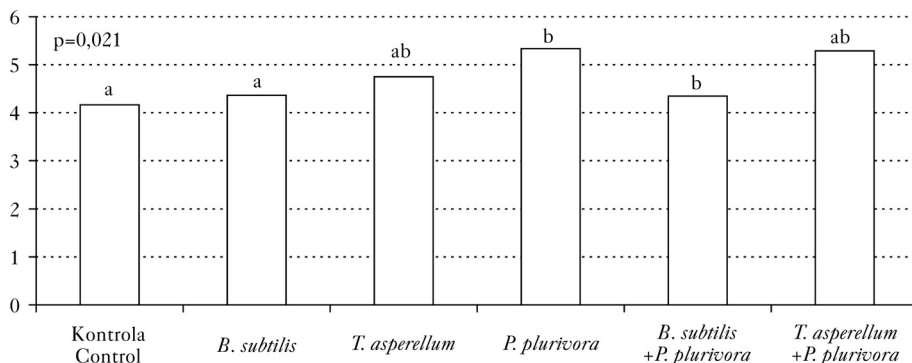
## Wyniki i dyskusja

W badanych próbach gleby ryzosferowej potwierdzono obecność DNA *P. plurivora* (100% podobieństwa z izolatem nr KX618504) oraz obecność DNA *T. asperellum* (100% podobieństwa z izolatem nr AF278789, GenBank).

ANALIZY CECH BIOMETRYCZNYCH. Wysokość brzoź wahała się w granicach od 45 do 60 cm, przy czym największy pozytywny wpływ na wzrost elongacyjny roślin zaobserwowano w wariancie 2 z *B. subtilis*, jak i w interakcji bakterii z *P. plurivora* (wariant 5). Odnotowane różnice w wysokości brzoź w wariantach z mikroorganizmami w porównaniu z kontrolą nie były istotne statystycznie.

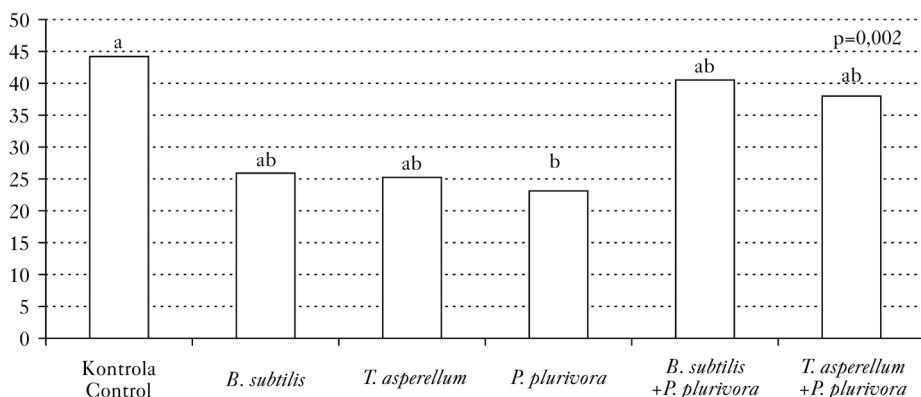
Prawdopodobnie uruchomienie reakcji obronnych roślin wpłynęło na zwiększenie grubości ich szyi korzeniowych, której wartość oscylowała pomiędzy 4 a 5,5 mm w obecności jedynie patogenu lub w kombinacji z antagonistą (ryc. 1). Najwyższy przyrost grubości szyi korzeniowej zaobserwowano po miesiącu w przypadku interakcji patogen – bakteria i różnice te były istotne statystycznie.

Stymulację rozwoju drobnych korzeni brzoź odnotowano w interakcji antagonistów (bakterii i grzyba) z patogenem (warianty 5 i 6). W odniesieniu do wariantów z obecnością w glebie wyłącznie patogenu bądź też jedynie jego antagonistów (warianty 2, 3, 4) stwierdzono zmniejszenie długości korzeni drobnych w porównaniu z kontrolą i różnice te były istotne statystycznie (ryc. 2). Świeża masa pędów i korzeni oscylowała pomiędzy 2 a 6 g (ryc. 3). Zdecydowanie największą



Ryc. 1.

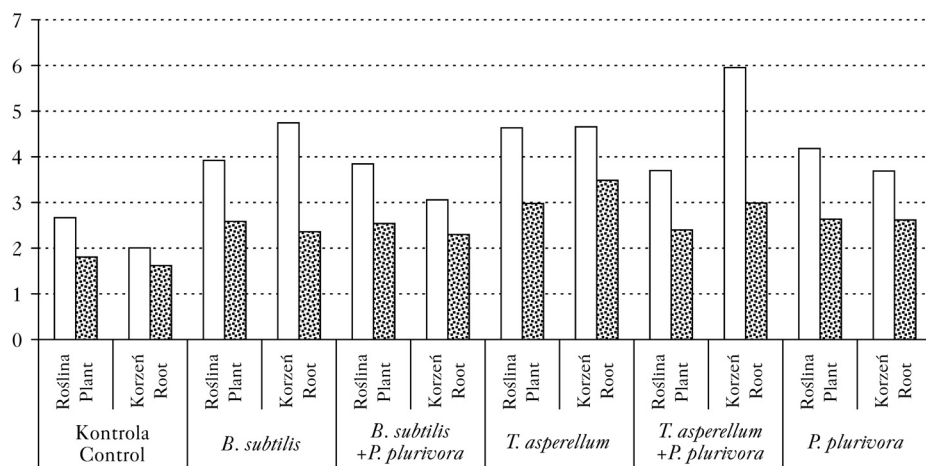
Średnica szyi korzeniowej [mm] sadzonek brzozy po 3 latach trwania doświadczenia  
Root collar diameter [mm] of birch seedlings after 3 years of the experiment



Ryc. 2.

Stosunek długości korzeni drobnych do długości korzeni matecznych (x100)

Fine roots length to mother roots ration (x100)



Ryc. 3.

Świeża (biały) i sucha (szary) biomasa [g] sadzonek brzozy po 3 latach trwania doświadczenia

Fresh (white) and dry (grey) biomass [g] of birch seedlings after 3 years of the experiment

część nadziemną umownie zaznaczono jako roślinę; aboveground part of the seedling is marked as plant

świeżą masą charakteryzowały się korzenie brzoź w wariancie 6 (*T. asperellum* + *P. plurivora*), jednak ich sucha masa była o połowę mniejsza i zawierała się w przedziale między 1,8 a 3,5 g. Zaobserwowano, że największy pozytywny wpływ na suchą masę korzeni, która była o ponad połowę większa niż w kontroli, miał mikroorganizm *T. asperellum*.

W wariantach 1 (kontrola), 2 (*B. subtilis*) i 5 (*B. subtilis* + *P. plurivora*) sucha masa pędów była większa niż korzeni, odwrotnie niż w wariancie z *T. asperellum* (nawet w interakcji z patogenem). W wariancie z *P. plurivora* świeża i sucha masa pędów była porównywalna ze świeżą i suchą masą korzeni, a parametry te charakteryzowały się większymi wartościami w porównaniu z kontrolą.

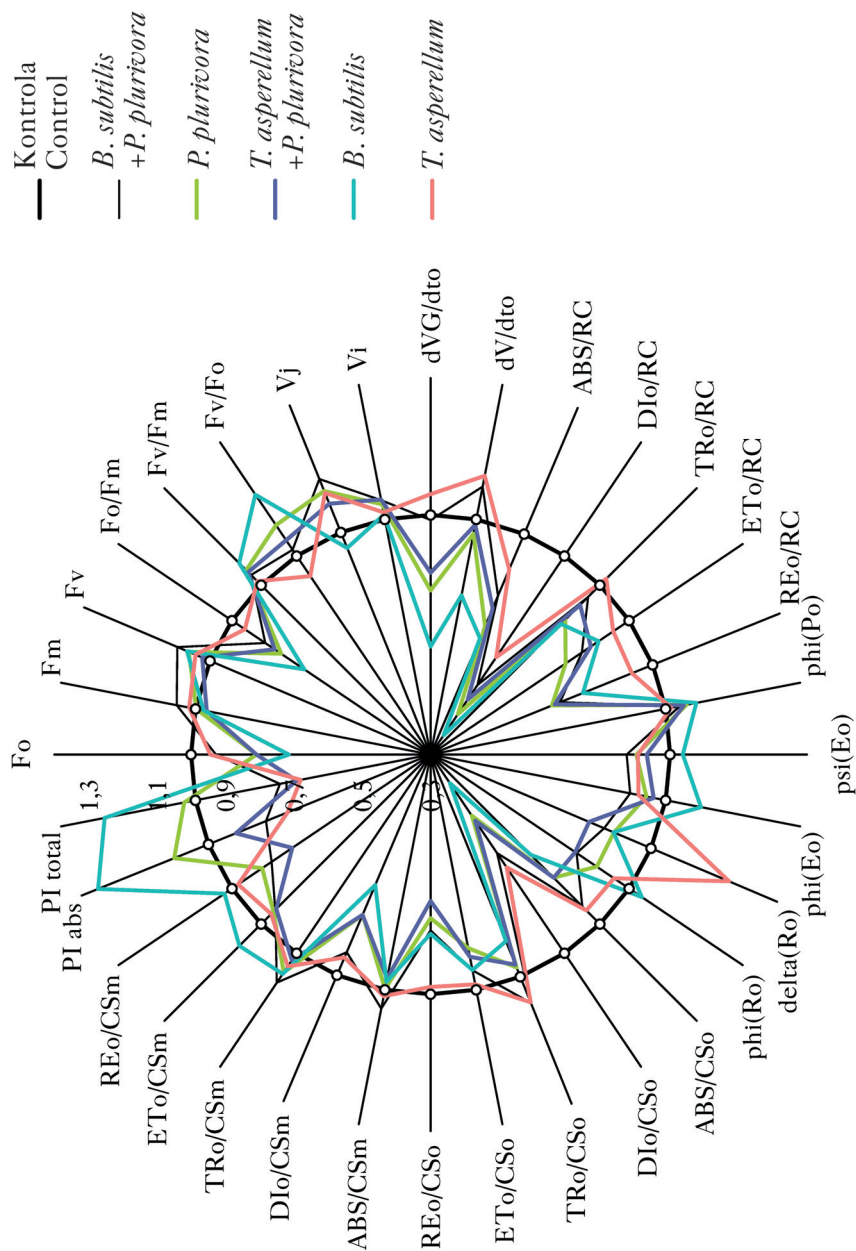
Uzyskane wyniki analiz biometrycznych cech będące efektem interakcji między *P. plurivora* i antagonistami oraz wynikające z tego reakcje brzoź na oddziaływanie mikroorganizmów znajdują potwierdzenie w danych literaturowych. Liczne prace, wprawdzie w większości dotyczące roślin

zielnych, wskazują na stymulujący wpływ gatunków z rodzaju *Trichoderma* na wzrost i rozwój roślin poprzez hamowanie aktywności patogenów roślinnych bytujących w glebie oraz bardzo silne działanie antagonistyczne i mikropasożytnicze [Hermosa i in. 2012]. Antagonistyczne działanie gatunków z rodzaju *Trichoderma* wynika z różnych cech tych mikroorganizmów, takich jak tolerancja na zmiany warunków środowiskowych [Munnecke i in. 1981], zdolność do degradacji różnych substancji organicznych w glebie czy wytwarzanie toksycznych związków, antybiotyków i enzymów [Ishikawa i in. 1976; Papavizas 1985; Vandriesche, Bellows 1996; Howell 2003; Harman i in. 2004]. Nowsze badania wykazały ponadto, że izolaty z rodzaju *Trichoderma* mogą oddziaływać bezpośrednio na komórki korzeni, przyczyniając się do stymulacji wzrostu rośliny i zwiększania jej tolerancji na stresy abiotyczne. Ban i in. [2018] wskazują na wzrost długości pędów, korzeni, jak i świeżej masy u roślin inokulowanych *T. harzianum*. Z kolei Hohmann i Stewart [2011] donoszą, że *T. hamatum* znacząco przyczynia się do zmniejszenia śmiertelności młodych drzewek *Pinus radiata*, jak i stymuluje wzrost pędów i korzeni. Wykazany w niniejszych badaniach istotny wzrost suchej masy korzeni brzoź w wariancie z *T. asperellum* oraz ich świeżej masy w wariancie *T. asperellum* w kombinacji z *P. plurivora* niewątpliwie potwierdza stymulujące i antagonistyczne działanie *T. asperellum*. Podobny stymulujący wpływ na wzrost wydłużeniowy (ale tylko w odniesieniu do pędów) zaobserwowano w przypadku wykorzystania *B. subtilis*, który reprezentuje grupę ryzobakterii i określane jest mianem mikroorganizmu stymulującego wzrost roślin (ang. Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) [Hashem, Abd Allah 2019]. Peptydowe antybiotyki syntetyzowane przez *B. subtilis*, np. polimyksyna B i subtilina, posiadają właściwości amfifilowe (tzn. hydrofobowe i hydrofilowe), które przyczyniają się do degradacji ściany komórkowej patogenów, co stanowi obiecującą strategię w walce z infekcjami drobnoustrojowymi roślin. Można przypuszczać, że *B. subtilis* w interakcji z *P. plurivora* stymuluje wzrost sadzonek młodych brzoź, prawdopodobnie dzięki produkcji peptydowych antybiotyków [Hussain i in. 2017]. Wydaje się zatem, że mikroorganizmy wykorzystane w niniejszych badaniach mogą być użyteczne w ochronie młodych brzoź przed *P. plurivora*.

ANALIZY BIOCHEMICZNE. Fluorescencja chlorofilu, będąca miernikiem stanu fizjologicznego roślin [Samborska i in. 2018], wynika z emisji zwrotnej części energii świetlnej, która powoduje wzbudzenie cząsteczek chlorofilu. Do pomiaru fluorescencji chlorofilu użyto nieinwazyjnej metody, którą opisują liczne wskaźniki, jednak najważniejszym z nich jest PI total (ang. total performance index), czyli wskaźnik funkcjonowania fotosystemu I i II w odniesieniu do poziomu fluorescencji w próbie kontrolnej [Kalaji 2011]. Według Cetner i in. [2016] istnieje odwrotna zależność między intensywnością fluorescencji chlorofilu a intensywnością aparatu fotosyntetycznego, jednak wykres radarowy przedstawia wyniki wyrażone w procencie kontroli, dlatego wyższe wartości oznaczają większą efektywność procesu fotosyntezy.

Najwyższe wartości PI total odnotowano u brzoź z wariantu z udziałem *B. subtilis*, wynosiły one bowiem 1,3 i były o 30% większe w porównaniu z kontrolą (ryc. 4). Nie zaobserwowano istotnej zmiany wielkości parametru opisującego fluorescencję chlorofilu w wariancie z udziałem *P. plurivora* w porównaniu z kontrolą, natomiast w pozostałych wariantach wartość PI total była o około 30% mniejsza (ryc. 4).

Dane literaturowe wskazują, że infekcje roślin dokonane przez gatunki z rodzaju *Phytophthora* często prowadzą do obniżenia przewodnictwa szparkowego i fotosyntezy [Crombie, Tippett 1990; Maurel i in. 2004; Fleischmann i in. 2005]. Badania nad wpływem *P. ramorum* na *Rhododendron macrophyllum* wykazały, że aktywność patogenu prowadzi do wystąpienia nekroz na pędach, utraty przewodnictwa wody, a w konsekwencji powstały stres wodny staje się przyczyną zamknięcia



Ryc. 4.

Fluorescencja chlorofilu liści brzoź w wariantach doświadczenia  
Fluorescence of chlorophyll birch leaves in variants of the experiment

aparatury szparkowych i obniżenia wydajności fotosyntetycznej [Manter i in. 2007]. W prezentowanych badaniach nie zaobserwowano negatywnego wpływu *P. plurivora* na fotosyntezę.

Analiza substancji lotnych dotyczyła związków fenolowych, terpenów i steroli. W wariaciecie *T. asperellum* + *P. plurivora* w liściach brzoź stwierdzono prawie dwukrotnie większą zawartość kwasów karboksylowych w porównaniu z pozostałymi wariantami, natomiast ponad trzykrotnie zwiększoną zawartość aromatycznych estrów odnotowano w wariantach z udziałem *P. plurivora* i antagonistów (tab.).

Tabela.

Jakościowy i półilościowy skład [%] lotnych związków metabolitów wtórnych emitowanych przez liście brzozy w wariantach eksperymentu

Qualitative and semi-quantitative composition [%] of volatile organic compounds emitted by leaves of birch in the experiment variants

	Kontrola Control	<i>B. subtilis</i>	<i>T. asperellum</i>	<i>P. plurivora</i>	<i>B. subtilis</i> + <i>P. plurivora</i>	<i>T. asperellum</i> + <i>P. plurivora</i>
Związki fenolowe Phenolic compounds	4,41	2,96	4,11	3,75	4,62	3,50
Monoterpeny Monoterpens	0,67	1,15	1,04	–	0,64	–
Monoterpenoidy Monoterpenoids	9,56	11,78	10,87	11,8	11,04	11,09
Seskwiterpeny Sesquiterpens	1,49	0,83	1,75	1,13	0,84	0,52
Kwasy karboksylowe Carboxylic acids	2,13	2,69	–	0,41	1,51	4,34
Estry alifatyczne Aliphatic esters	4,91	3,83	6,36	4,17	4,62	3,58
Estry aromatyczne Aromatic esters	0,40	0,33	0,77	0,74	1,33	1,30
Alifatyczne związki karbonylowe Aliphatic carbonylic compounds	48,47	49,11	46,43	49,19	45,18	47,35
Aromatyczne związki karbonylowe Aromatic carbonylic compounds	2,28	1,15	2,24	2,06	2,47	1,01
Alkohole alifatyczne Aliphatic alcohols	7,12	9,96	8,57	11,26	8,98	9,18
Alkohole aromatyczne Aromatic alcohols	5,90	6,64	6,79	9,24	9,97	10,22
Alkany Alkane	5,43	4,20	3,28	1,70	2,58	2,58
Alkeny Alkenes	1,12	0,26	1,45	–	0,24	0,26
Inne Other	2,78	2,90	5,00	4,08	5,47	4,77
Niezidentyfikowane Unidentified	3,34	2,23	1,33	0,48	0,52	0,30

Kwasy karboksylowe to substraty (produkty) reakcji biochemicznych, w tym pochodne kwasu szikimowego, które prowadzą do powstania polifenoli – substancji uczestniczących w biochemicznej obronie roślin. Należą do nich głównie kwas jasmonowy (biorący udział w tzw. indukowanej odporności systemicznej, ISR) i kwas salicylowy (w nabytej odporności systemicznej, SAR), których zawartość u roślin gwałtownie wzrasta w warunkach stresu [Mazid i in. 2011; Kulbat 2016; Sánchez-Sánchez, Morquecho-Conteras 2017]. Można zatem przypuszczać, że istotny wzrost zawartości kwasów karboksylowych (a tym samym i polifenoli) u brzozy w wariantach z udziałem *P. plurivora* świadczy o uruchomieniu biochemicznych procesów obronnych.



## Wnioski

- ✦ Badania potwierdzają pozytywny wpływ BCA na wzrost i biomasę sadzonek brzozy – dzięki ograniczeniu uszkodzeń korzeni drobnych powodowanych przez *P. plurivora*.
- ✦ Szczególnie *B. subtilis* w interakcji z *P. plurivora* stymuluje wzrost sadzonek młodych brzóz, prawdopodobnie dzięki produkcji peptydowych antybiotyków (tj. polimyksyny B i subtiliny).
- ✦ Uszkodzenia korzeni drobnych przez *P. plurivora* nie wpływają na zmniejszenie aktywności fotosyntezy w liściach brzóz.
- ✦ Większa zawartość kwasów karboksylowych, zaobserwowana w wariancie z udziałem *T. asperellum* + *P. plurivora*, świadczy o zainicjowaniu biochemicznych procesów obronnych w komórkach liści brzóz.

## Podziękowania

Autrzy dziękują dr. Dmitriemu Voitse z Białoruskiego Instytutu Ochrony Roślin w Mińsku za kultury *Trichoderma* sp. IZR D-11 i *Bacillus subtilis* IZR B 2-1, prof. Tadeuszowi Malewskiemu z Muzeum i Instytutu Zoologii PAN za identyfikację gatunku *T. asperellum*, inż. Jérémie Loulier z HAFL (Zollikofen, Szwajcaria) za wykonanie pomiarów fluorescencji chlorofilu oraz Darii Berzowskiej z Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie za pomoc w przygotowaniu elementów graficznych manuskryptu.

## Literatura

- Bae S.-J., Mohanta T. K., Chung J. Y., Ryu M., Park G., Shim S., Hong S. B., Hong S. B., Seo H., Bae D. W., Bae I. 2016. *Trichoderma* metabolites as biological control agents against *Phytophthora* pathogens. Biol. Control 92: 128-138.
- Ban G., Akanda S., Maino M. 2018. The effect of *Trichoderma* on the growth and development of tomato and bean under greenhouse and field conditions. Ann. Trop. Res. 40: 35-45.
- Becker E. M. 2011. *Trichoderma* spp.: antagonistic effects to *Phytophthora ramorum* growth and spore germination *in vitro*. Plant Canada Conference Proceedings. July 17-21, 2011. Halifax, Nova Scotia. 173-174.
- Caulier S., Gillis A., Colau G., Licciardi F., Liépin M., Desoignies N., Bragard C. 2018. Versatile Antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens. Front. Microbiol 9: 143.
- Cetner M. D., Dąbrowski P., Samborska I. A., Łukasik I., Swoczyna T., Pietkiewicz S., Baba W., Kajali H. M. 2016. Zastosowanie pomiarów fluorescencji chlorofilu w badaniach środowiskowych. Kosmos 65: 197-205.
- Costa J. L. S., Menge J. A., Casale W. L. 2000. Biological control of *Phytophthora* root rot of avocado with microorganisms grown in organic mulches. Braz. J. Microbiol. 31 (4): 239-246.
- Crombie S. D., Tippett J. T. 1990. A comparison of water relations, visual symptoms, and changes in stem girth for evaluating impact of *Phytophthora cinnamomi* dieback on *Eucalyptus marginata*. Can. J. For. Res. 20: 233-240.
- Fleischmann F., Koehl J., Portz R., Bletrame A. B., Obwald W. 2005. Physiological changes of *Fagus sylvatica* L. seedlings infected with *Phytophthora citricola* and the contribution of its elicitor 'citricolin' to pathogenesis. Plant Biol. 32: 375-390.
- Grosch R., Junge H., Krebs B., Bochow H. 1999. Use of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture. J. Plant Dis. Protect. 106 (6): 568-580.
- Harman G., Howell Ch. R., Viterbo A. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. Nat. Rev. Microbiol. 21: 43-56.
- Hashem A., Abd Allah E. F. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant – growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi J. Biol. Sci. 26: 1291-1297.
- Hermosa M. R., Grondona I., Iturriaga E. A., Diaz-Minguez J. M., Castro C., Monte E., Garcia-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl. Environ. Microbiol. 66 (5): 1890-1898.
- Hermosa R., Viterbo A., Chet I., Monte E. 2012. Plant – beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology 158: 17-25.
- Hohmann P., Stewart A. 2011. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere promotion for commercially grown seedlings. Fungal Biol. 115: 759-767.
- Howell C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87: 4-10.

- Hussain M. Y., Ali-Nizam A. A., Abou-Isba S. M. 2017. Antibacterial activities (Bacitracin A and Polymyxin B) of lyophilized extracts from indigenous *Bacillus subtilis* against *Staphylococcus aureus*. J. J. Biol. Sci. 10: 205-212.
- Ishikawa H., Oki T., Kiriya H. 1976. The toxic function of antifungal compounds prepared by some *Hypocrea* species to wood-rooting fungi. Rep. Tottori Mycol. Inst. 14: 105-110.
- Jagtap G. P., Dhavale M. C., Deya U. 2012. Evaluation of natural plant extracts, antagonists and fungicides in controlling root rot, collar rot, fruit (brown) rot and gummosis of citrus caused by *Phytophthora* spp. *in vitro*. Scientific J. Microbiol. 1 (2): 27-47.
- Jung T., Blaschke H., Neumann P. 1996. Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. Eur. J. For. Pathol. 26: 253-272.
- Jung T., Burgess T. I. 2009. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species, *Phytophthora plurivora* sp. nov. Persoonia 22: 95-110.
- Kalaji H. M. 2011. Oddziaływanie abiotycznych czynników stresowych na fluorescencję chlorofilu w roślinach wybranych odmian jęczmienia *Hordeum vulgare* L. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Kowalska J., Drożdżyński D., Kaczmarek D. 2017. The use of *Bacillus subtilis* for the protection of potato against *Phytophthora infestans* in organic farming. J. Res. Appl. Agric. Engin. 62 (3): 186-189.
- Kulbat K. 2016. The role of phenolic compounds in plant resistance. Biotechnol. Food Sci. 80: 97-108.
- Kumar K. V. K., Yellareddygar S. K., Reddy M. S., Kloepper J. W., Lawrence K. S., Zhou X. G., Sudini H., Groth D. E., Raju S. K., Miller M. E. 2012. Efficacy of *Bacillus subtilis* MBI 600 against sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* and on growth and yield of rice. Rice Sci. 19 (1): 55-63.
- Lara-Chávez M. B. N., Ávila-Val T. C., Guerrero-Tejeda J. A., Barriga-González F. S., Venegas-González E., Aguirre-Paleo S., Vargas-Sandoval M., Andrade H. G., Rodríguez-López S. 2012. Biological and chemical control in root rot in avocado by *Phytophthora cinnamomi* Rands. J. Agric. Sci. Technol. A 2: 882-887.
- Manter D. K., Kelsey R. G., Karchesy J. J. 2007. Photosynthetic declines in *Phytophthora ramorum* infected plants develop prior to water stress and in response to exogenous application of elicitors. Phytopathol. 97: 850-856.
- Maurel M., Robin C., Simmoneau T., Loustau D., Dreyer E., Desprez-Loustau M. L. 2004. Stomatal conductance and root-to-shoot signaling in chestnut saplings exposed to *Phytophthora cinnamomi* or partial soil drying. Funct. Plant Biol. 31: 41-51.
- Mazid M., Khan T. A., Mohamad F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms in plants. Biol. Med. 3: 232-249.
- Munnecke D. E., Kolbezen M. J., Wilbur W. D., Ohr H. D. 1981. Interactions involved in controlling *Armillaria mellea* [Citrus, antagonistic *Trichoderma* fungi]. Plant Diseases.
- Okbasillias A. A. 2005. Biological control of *Phytophthora* root rot of citrus seedlings and cuttings: Thesis for the degree of Master of Science in the discipline of Plant Pathology, School of Biochemistry, Genetics, Microbiology and Plant Pathology. Univers. of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg.
- Orlikowski L. B., Ptaszek M., Rodziewicz A., Nechwatal J., Thinggaard K., Jung T. 2011. *Phytophthora* root and collar rot of mature *Fraxinus excelsior* in forest stands in Poland and Denmark. Forest Pathology 41 (6): 510-519.
- Papavizas G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology, and potential for biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol. 23: 23-54.
- Rytkönen A., Lilja A., Vercauteren A., Sirkiä S., Parikka P., Soukainen M., Hantula J. 2012. Identity and potential pathogenicity of *Phytophthora* species found on symptomatic *Rhododendron* plants in a Finnish nursery. Can. J. Plant Pathol. 34 (2): 255-267. DOI: 10.1080/07060661.2012.686455.
- Samborska I. A., Kalaja H. M., Siczko L., Borucki W., Mazur R., Kouzmanova M., Goltsev V. 2018. Can just one-second measurement of chlorophyll a fluorescence be used to predict sulphur deficiency in radish (*Raphanus sativus* L. *sativus*) plants? Curr. Plant Biol. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2018.12.002>.
- Sánchez-Sánchez H., Morquecho-Conteras A. 2017. Chemical plant defence against herbivores. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/6734>.
- Schoeneweiss D. F. 1978. Water stress as predisposing factor in plant disease. W: Kozłowski T. T. [red.]. Water deficits and plant growth. Academic Press, New York. 61-99.
- Stocki M., Zapora E., Rój E., Bakier S. 2018. Pozyskiwanie substancji biologicznie aktywnych z odpadów zrębowych brzozy (*Betula* spp.) z zastosowaniem ditlenku węgla w stanie nadkrytycznym. Przem. Chem. 97 (5): 774-778.
- Vandriesche R. G., Bellows T. S. 1996. Biological control. Chapman and Hall, New York.
- Voitka D. V., Orlikowski L. B. 2005. Izuczenie antagonizma mikromicetow *Trichoderma* spp. po odnoszeniu k wozbuditelam bolezniej sp. *Phytophthora* Third Moscow Intern. Congress 'Biotechnology: state and prospects of development'. Lescow, 14-18 March 2005. Congress Materials 1: 237-238.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. The PCR Protocols: A guide to methods and applications. W: Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. [red.]. Academic Press, Inc., New York. 315-322.
- Yáñez-Mendizábal V., Zeriuoh H., Viñas I., Torres R., Usall J., Vicente A. D., Pérez-García A., Teixidó N. 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. Eur. J. Plant Pathol. 132: 609-619.
- You C., Zhang C., Kong F., Feng C., Wang J. 2016. Comparison of the effects of biocontrol agent *Bacillus subtilis* and fungicide metalaxyl-mancozeb on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil. Ecol. Eng. 91: 119-125.