

WOJCIECH HENRYK SZEWCZYK, MARLENA KRYSZYNA BARANOWSKA-
-WASILEWSKA, MARTA MOLIŃSKA-GLURA

Wpływ grzybów rodzaju *Trichoderma* Pers. na wzrost *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink

Effect of *Trichoderma* Pers. on the growth of *Armillaria ostoyae* (Romagn.)
Herink

ABSTRACT

Szewczyk W. H., Baranowska-Wasilewska M. K., Molińska-Glura M. 2013. Wpływ grzybów rodzaju *Trichoderma* Pers. na wzrost *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink. Sylwan 157 (5): 395-400.

Armillaria root rot is one of the most important diseases in Polish forests. Study assesses if mycelium mixed with soil and metabolites of antagonistic *Trichoderma* reduce the occurrence of *Armillaria*. No influence of *Trichoderma* on the growth of *Armillaria ostoyae* rhizomorphs and mycelium was found.

KEY WORDS

Armillaria, *Trichoderma*, biosecurity, plant protection

ADDRESSES

Wojciech Henryk Szewczyk ⁽¹⁾ – e-mail: wszew@up.poznan.pl

Marlena Krystyna Baranowska-Wasilewska ⁽¹⁾ – e-mail: marlenab@up.poznan.pl

Marta Molińska-Glura ⁽²⁾ – e-mail: mglura@tlen.pl

⁽¹⁾ Katedra Fitopatologii Leśnej; Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; ul. Wojska Polskiego 71c; 60-625 Poznań

⁽²⁾ Katedra i Zakład Informatyki i Statystyki; Uniwersytet Medyczny w Poznaniu; ul. Dąbrowskiego 79; 60-529 Poznań

Wstęp

Opieńkowa zgnilizna korzeni drzew jest jedną z najgroźniejszych chorób w polskich lasach. Według Raportu... [2010] areał występowania tej choroby przekracza 100 tys. hektarów. Poraża ona wiele gatunków roślin, głównie drzewiastych [Mańka 2011]. Ze względu na szkody, jakie powoduje w drzewostanach świerkowych i sosnowych, jest chorobą o bardzo dużym znaczeniu gospodarczym. Często pojawia się epifitycznie, szczególnie w monokulturach południowej i północno-wschodniej Polski. Do infekcji dochodzi głównie przez rosnące w glebie sznury grzybniowe (ryzomorfy). Grzybnia patogena przerasta korzenie i dolne części pni, powoduje zgniliznę białą jednolitą drewna, doprowadza do zmniejszenia przyrostu, a następnie do śmierci drzew. Wytwarzane przez opieńkę sznury grzybniowe utrudniają prowadzenie zabiegów mających na celu ochronę roślin. Ingerencja w środowisko glebowe na dużą skalę jest niemożliwa [Żółciak 2005], szczególnie dotyczy to metod chemicznych, które obecnie nie znajdują powszechnego zastosowania w Lasach Państwowych. Brak odpowiednich metod i środków ochrony roślin oraz nacisk na ochronę środowiska naturalnego znacznie ogranicza zastosowanie fungicydów oraz zmusza do szerszego wykorzystania metod biologicznych w ochronie drzewostanów przed chorobami infekcyjnymi korzeni.

Od wielu lat prowadzone są badania, których celem jest zwiększenie udziału środków biologicznych w ochronie roślin [Tomalak i in. 2010]. Nadzieję na walkę z opieńkową zgnilizną korzeni dają grzyby rodzaju *Trichoderma*, należące do rzędu *Hypocreales*. Wykazują one właściwości ochronne względem roślin, polegające głównie na produkcji antybiotyków i związków toksycznych, hamujących wzrost patogenów. Wśród tych związków dotychczas zidentyfikowano kwas heptelidowy, kwas harzianowy, gliowirynę, gliotoksynę, glisopreninę, wiridynę, alamectycynę, tricholiny, peptaibol, 6-pentyl- α -pyrol [Vey i in. 2001; Benitez 2004; Howel 2006; Reino i in. 2008]. Zainfekowane przez grzyby patogeniczne rośliny wydzielają specyficzne toksyny (fitoaleksyny, flawonoidy, terpenoidy czy fenole), które nie wpływają na wzrost *Trichoderma* [Harman i in. 2004]. Kolonizacja korzeni przez *Trichoderma* zwiększa odporność korzeni na stres [Chet i in. 1997; Benitez 2004].

Celem pracy było ustalenie, czy grzybnia *Trichoderma* wymieszana z glebą oraz surowe metabolity grzybów tego rodzaju ograniczają wzrost *Armillaria ostoyae* (Romang.).

Material i metody

Do doświadczenia wybrano dwa izolaty *Armillaria ostoyae*, z których jeden pochodził z Nadleśnictwa Doświadczalnego Zielonka (izolat 6038), a drugi – z Nadleśnictwa Doświadczalnego Siemianice (izolat 6132). Izolaty *Trichoderma harzianum* (Rifai) pochodziły z Nadleśnictwa Doświadczalnego Zielonka (izolaty 703 i 704) oraz ze szkółki Nowy Dwór Nadleśnictwa Lipka (izolaty 110 i 1100). Z tego drugiego terenu pochodził również izolat *Trichoderma viride* (Pers.) (30). Badanie wpływu surowych metabolitów rodzaju *Trichoderma* na wzrost *A. ostoyae* prowadzono na przesączu z płynnej pożywki glukozowo-ziemniaczanej pozostałej z hodowli grzybni. Dla potrzeb doświadczenia, w kolbach zawierających po 200 ml sterylnej pożywki hodowano inokulum pięciu szczepów *Trichoderma*. Grzybnięć inkubowano w temperaturze 22–25°C, w cyklu świetlnym dnia i nocy. Po 6 tygodniach wyrosłą na powierzchni grzybnięć usuwano, pożywkę sączone przez bibułę filtracyjną, a następnie przez sterylną membranę filtracyjną o średnicy porów 0,6 μ m. Przesącz z dodatkiem agaru rozlewano na płytki Petriego o średnicy 9 cm. W centrum płytki umieszczano 5 mm² inokulum *Armillaria* i hodowano przez 7 dni, dokonując pomiaru przyrostu grzybni w temperaturze 23°C w cyklu nocy. Zbadano wpływ surowych metabolitów izolatów *Trichoderma* na oba izolaty *A. ostoyae* w 6 powtórzeniach.

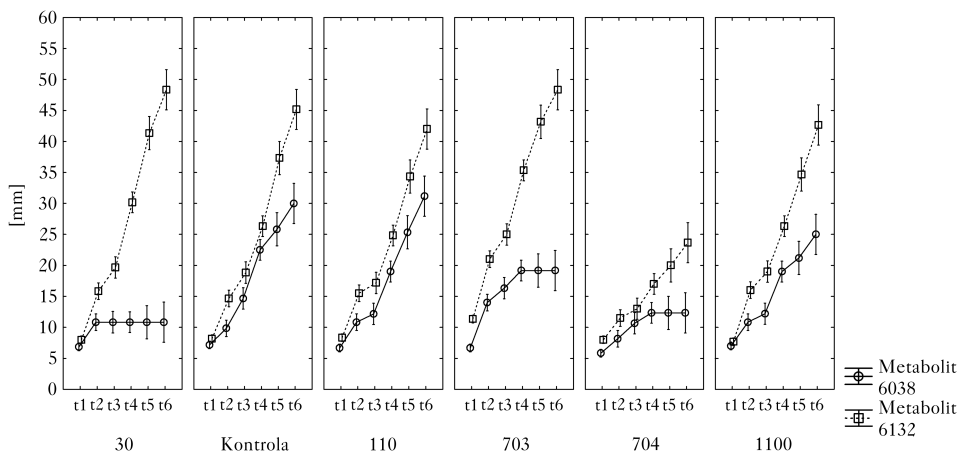
Do określenia zdolności wytwarzania sznurów grzybniowych przez izolaty *A. ostoyae*, fragmenty ryzomorf zostały wyszczepione na 2% pożywkę maltozową na płytkach Petriego, gdzie przez 28 dni były inkubowane w temperaturze 22°C. Następnie na wyrosłą grzybnięć nakładano krążki wycięte z pędów dębowych (po wcześniejszej sterylizacji w autoklawie, po godzinie przez kolejne dwa dni). Krążki miały 2 cm średnicy i 1 cm wysokości. Tak przygotowany materiał poddawano inkubacji przez 28 dni w temperaturze 22°C. Następnie krążki zostały przybite do wysterylizowanych w ten sam sposób pędów dębowych o długości 5 cm i średnicy 2 cm. Kolejnym etapem doświadczenia było umieszczenie tak przygotowanego inokulum w słoikach z niesterylnym wilgotnym piaskiem rzecznym. Weki przykryto folią aluminiową i inkubowano przez 14 tygodni. Po tym okresie pędy dębowe zostały ułożone w donicach plastikowych o pojemności 7,5 litra, wypełnionych glebą z drzewostanu sosnowego wymieszaną z 200 ml grzybni *Trichoderma* wraz z pożywką. Przygotowanie grzybni polegało na 6-tygodniowej inkubacji w kolbach z płynną pożywką w temperaturze 22–25°C, w cyklu świetlnym dnia i nocy. Po 10 tygodniach przechowywania w termostacie w 23°C, pędy były delikatnie wyjmowane, tak aby nie uszkodzić wyrosłych ryzomorf. Następnie zmierzono długość i wagę ryzomorf oraz ustalono ich liczbę wraz z liczbą aktywnych końców [Rykowski 1985]. Do weryfikacji hipotezy o braku istot-

nych różnic we wzroście grzybni opieńek w zależności od zastosowanych izolatów materiał poddano ANOVA z powtarzanymi pomiarami, po ówczesnym sprawdzeniu prawdziwości założeń. Zgodność z rozkładem normalnym analizowano testem Shapiro-Wilka, a jednorodność wariancji oceniono testem Bartletta.

Wyniki

Stwierdzono istotne statystycznie różnice między badanymi izolatami opieńki 6038 i 6132, co wskazuje na wpływ surowych metabolitów *Trichoderma* na wzrost grzybni. Metabolit z *T. viride* wyraźnie zahamował wzrost grzybni izolatu 6038 już po dwóch dniach, natomiast nie powstrzymał wzrostu izolatu 6132. Wydaje się raczej, że wręcz pobudził ją do wzrostu w odniesieniu do kontroli (ryc.). Metabolit 110 nie wpłynął na wzrost grzybni obu testowanych izolatów opieńek. Izolat 703 wyraźnie ograniczył wzrost izolatu 6038 dopiero w trzeciej dobie, natomiast nie wpłynął na izolat 6132. Wzrost opieńki najbardziej ograniczał izolat 704. Izolat 6132 uzyskał średnicę 25 mm, czyli 20 mm mniej w porównaniu z kontrolą. Izolat 6038 po czterech dobach uzyskał średnicę 12,5 mm i wtedy doszło do zahamowania jego dalszego przyrostu. Również izolaty 110 i 1100 wpływały na wzrost grzybni opieńek. Najwolniej przyrastała grzybnia izolatu 6038, którego wzrost był najbardziej ograniczony przez izolat 30.

Stwierdzono istotne statystycznie różnice między ryzomorfami badanych izolatów opieńki. Izolat 6038 wykazywał większe wartości ocenianych parametrów niż izolat 6132 zarówno w kontroli, jak i pod wpływem grzybni *Trichoderma* (tab.). Wszystkie testowane izolaty *Trichoderma* nie ograniczały istotnie wytwarzania ryzomorf, sumarycznej długości sznurów grzybniowych, sumarycznej wagi ryzomorf oraz liczby aktywnych końcówek ryzomorf izolatu 6132. Obserwując oddziaływanie grzybni *Trichoderma* na wzrost sznurów grzybniowych opieńki, można zauważyć brak istotnego wpływu na liczbę wytworzonych ryzomorf. Średnia wytworzonych sznurów grzybniowych jest wyraźnie większa niż w przypadku kontroli z izolatem 6038. Najbardziej liczba ryzomorf wzrosła pod wpływem izolatu 704. Nie zanotowano wyraźnego oddziaływania *Trichoderma* na izolat 6132. Liczba sznurów grzybniowych zbliżona do wyniku kontrolnego.



Ryc.

Wzrost grzybni opieńek na pożywkach zawierających surowe metabolity testowanych izolatów *Trichoderma* w czasie

Armillaria mycelium growth on media containing metabolites of *Trichoderma* isolates in time

Tabela.

Wpływ testowanych izolatów *Trichoderma* na liczbę, długość, wagę i liczbę aktywnych końców ryzomorf opieńki

Effect of tested *Trichoderma* isolates on number, length, weight and number of active tips of *Armillaria* rhizomorphs

	Liczba		Długość [mm]		Waga [g]		Aktywne końce	
	6038	6132	6038	6132	6038	6132	6038	6132
Kontrola	11,8	5,3	910	209	207	35,4	23	12
30	23,0	5,6	1968	410	142	87,5	64	18
110	21,2	7,5	4860	727	454	120	77	26
703	19,0	5,6	5290	500	411	43	76	30
704	26,6	6,0	4137	365	392	38,5	86	18
1100	16,5	4,5	2920	660	307	98	59	26
p	0,7047		0,1136		0,4046		0,7003	

Dyskusja

W 1932 roku odkryto antagonistyczne oddziaływanie grzybów rodzaju *Trichoderma*, a pierwsze doniesienia na temat ich wykorzystania w ochronie biologicznej przeciwko *Armillaria* opublikowano w 1951 roku [Asef i in. 2008; Baumgartner i in. 2011]. Sokołow [1964], badając zdolność różnych gatunków grzybów w ograniczaniu infekcji przez *Armillaria*, rekomendował użycie *Trichoderma*. Dalsze badania potwierdzają, że *Trichoderma* ogranicza rozwój ryzomorf *Armillaria ostoyae*, izolowanych na sztuczne pożywki [Reaves i in. 1990]. Eksperyment *in vitro* dotyczący interakcji *Armillaria* i występujących w glebie grzybów antagonistycznych, wykazał, że wzrost opieńki najbardziej ograniczała *Trichoderma* oraz *Penicillium* spp. [Keča 2009]. *Trichoderma* zwiększa odporność drzew na działanie stresów środowiskowych [Munnecke i in. 1981]. Właśnie tę właściwość rodzaju *Trichoderma* oraz silny antagonizm tych grzybów wykorzystuje się w ochronie biologicznej roślin przeciwko patogenom [Behnke-Borowczyk i in. 2010].

Najtrudniej osiągnąć odpowiednie nagromadzenie grzybów antagonistycznych, które skutecznie hamowałyby wzrost patogenów rodzaju *Armillaria* [Shaw i in. 1978]. Onsando i Waundo [1994] wykazali znaczne ograniczenie wzrostu *Armillaria* przez strzępki i metabolity badanych izolatów *T. koningii* (Oudem.), *T. longibrachiatum* (Rifai) i *T. harzianum* spośród 11 testowanych. Również Raziqi i Fox [1999] zaobserwowali ograniczający wpływ *T. harzianum*, *T. viride* i *T. hamatum* (Bonord) na rozwój grzybni opieńki na sztucznej pożywce, jednak nie uzyskali tego efektu w badaniach szklarniowych, co sugeruje, że działania *in vitro* i *in vivo* nie muszą być skorelowane. Być może testowane opieńki wykazywały się względną odpornością na wykorzystanie surowych metabolitów *Trichoderma* albo w ogóle nie mają one wpływu na wzrost grzybni opieniek. Więcej danych mamy na temat możliwości zahamowania wzrostu ryzomorf. W badaniach Otieno i in. [2003] ograniczanie przez *Trichoderma* wzrostu opieńki w niesterylnej glebie nie było tak wydajne, jak w glebie sterylnej. Prawdopodobną przyczyną takiej sytuacji jest obecności innych mikroorganizmów. Zbyt niska gęstość inokulum antagonistycznych szczepów *Trichoderma* w glebie może wpłynąć na niską skuteczność w zwalczaniu *Armillaria*. O możliwościach przeżycia ryzomorf decyduje drewno znajdujące się w glebie [Munnecke i in. 1981]. W badaniach opisujących wpływ *Trichoderma viride* na *Armillaria mellea* (Vahl) wykazano, że przeżycie patogena zależało od gęstości zasiedlenia antagonisty w glebie otaczającej źródło inokulum grzyba w drewnie [Garrett 1958]. Kwaśna i Łakomy [1998] oraz Kwaśna i Dux [1999] donoszą, że populacja *Trichoderma* spp. w glebie, po wzbogaceniu jej trocinami sosnowymi, ulega zredukowaniu już po 2 latach.

Po wyczerpaniu bazy pokarmowej obserwuje się spadek liczebności populacji *Trichoderma*. W obserwacjach oddziaływania *Trichoderma hamatum* i *Trichoderma viride* na wytwarzanie ryzomorf przez *Armillaria ostoyae* nie dostrzeżono ograniczania ich rozwoju [Kwaśna i in. 2004].

Podsumowanie

Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują, że grzybnia *Trichoderma* wymieszana z glebą oraz surowe metabolity tego rodzaju nie ograniczają wzrostu opieńki ciemnej w warunkach zbliżonych do opisanego doświadczenia. Wskazane są dalsze prace nad biologicznymi metodami w ochronie drzew przed opieńkami. Być może należy wziąć pod uwagę inne szczepy rodzaju *Trichoderma* lub poszukiwać innych organizmów w celu ograniczania tego groźnego patogena.

Literatura

- Asef M. R., Goltapeh E. M., Danesh Y. R. 2008. Antagonistic effect of *Trichoderma* in biocontrol of *Armillaria mellea* in fruit trees in Iran. *Journal of Plant Protection Research* 48 (2): 213-222.
- Baumgartner K., Coetzee Martin P. A., Hoffmeister D. 2011. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*. *Molecular Plant Pathology* 12 (6): 515-534.
- Behnke-Borowczyk J., Kwaśna H. 2010. Grzyby glebowe i ich znaczenie. *Sylwan* 154 (12): 846-850.
- Benítez T., Rincón A. M., Limón M. C., Codón A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260.
- Chet I., Inbar J., Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. W: Wicklow D. T., Söderström B. [red.]. *The Mycota IV: Environmental and microbial relationships*. Springer-Verlag, Berlin. 165-184.
- Garrett S. D. 1958. Inoculum potential as a factor limiting action of *Trichoderma viride* Fr. on *Armillaria mellea* (Fr.) Qu. el. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 41: 157-164.
- Harman G., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma* spp. opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature Microbiol. Rev.* 2: 43-56.
- Howell C. R., 2006. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases. *Phytopathol.* 96: 178-180.
- Keča N. 2009. *In vitro* interactions between *Armillaria* species and potential biocontrol fungi. *Bulletin of the Faculty of Forestry* 100: 129-142.
- Kwaśna H., Dux J. 1999. Możliwości ograniczania zgorzeli siewek sosny zwyczajnej przez *Trichoderma* spp. *Sylwan* 143 (2): 83-88.
- Kwaśna H., Łakomy P. 1998. Stimulation of *Armillaria ostoyae* vegetative growth by tryptophol and rhizomorph formation by *Zygorhynchus moelleri*. *European Journal of Forest Pathology* 28: 53-61.
- Kwaśna H., Łakomy P., Mallett K. 2004. Reaction of *Armillaria ostoyae* to forest soil microfungi. *For. Path.* 34: 147-162.
- Mańka M. 2011. Choroby drzew leśnych. PWRiL. Warszawa.
- Munneke D. E., Kolbezen M. J., Wilbur W. D. Ohr H. D. 1981. Interactions involved in controlling *Armillaria mellea*. *Plant Dis.* 65: 384-389.
- Onsando J., Waudo S. 1994. Interaction between *Trichoderma* species and *Armillaria* root rot fungi of tea in Kenya. *International Journal of Pest Management* 40: 69-74.
- Otieno W., Jeger M., Termorshuizen A. 2003. Effect of infesting soil with *Trichoderma harzianum* and amendment with coffee pulp on survival of *Armillaria*. *Biological Control* 26: 293-301.
- Raport o stanie lasów w Polsce. 2010. CILP, Warszawa.
- Raziq F., Fox R. T. V. 1999. Biological control of *Armillaria* root rot. *Acta Hort. (ISHS)* 496: 115-126.
- Reaves J. L., Shaw C. G., Mayfield J. E. 1990. The effects of *Trichoderma* spp. isolated from burned and non-burned forest soils on the growth and development of *Armillaria ostoyae* in culture. *Northwest Sci.* 64: 39-44.
- Reino J. L., Guerrero R. F., Hernández-Galán R., Collado I. G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem. Rev.* 7: 89-123.
- Rykowski K. 1985. Niektóre troficzne uwarunkowania patogeniczności *Armillaria mellea* (Vahl) Quel. w uprawach sosnowych. *Prace IBL* 640: 1-138.
- Shaw C. G., Roth L. F. 1978. Control of *Armillaria* root rot in managed coniferous forests. *Eur. J. Forest. Patholog.* 8: 163-174.
- Sokolov D. V. 1964. Kornevaya gnil' ot openki i bor'ba s nei. Izadale'stvo 'lesnaya promyshlennost'. Moscow.
- Tomalak M., Sosnowska D., Lipa J. 2010. Tendencje rozwoju metod biologicznych w ochronie roślin. *Progres in Plant Protection* 50 (4): 1650-1660.
- Vey A., Hoagland R. E., Butt T. M. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. W: Butt T. M., Jackson C., Magan N. [red.]. *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CAB International, Bristol. 311-346.
- Zóćciak A. 2005. Opieńki. CILP, Warszawa.

SUMMARYEffect of *Trichoderma* Pers. on the growth of *Armillaria ostoyae* (Romagn.)
Herink

Armillaria root rot is one of the most important diseases in Polish forests. Rhizomorpha play an important role in infection. Lack of effective methods of plant protection against *Armillaria* root rot forces the improvement of biological methods. The aim of this study was to determine whether the mixture of soil, and *Trichoderma mycelium* and metabolites limits the formation of rhizomorpha of *A. ostoyae*. The experiment was carried out with two isolates of *A. ostoyae* and five isolates of two species of *Trichoderma*. The forest soil mixed with *Trichoderma mycelium* and metabolites showed no effect on growth of *A. ostoyae* mycelium and rhizomorpha.