

LIDIA SZWAJKOWSKA-MICHAŁEK, MACIEJ BUŚKO, PIOTR ŁAKOMY, JULIUSZ PERKOWSKI

## Określanie profili metabolitów lotnych produkowanych przez izolaty *Trametes versicolor* wykazujące antagonistyczne działanie w stosunku do *Armillaria* spp.

Determination of profiles of volatile metabolites produced by *Trametes versicolor* isolates antagonistic towards *Armillaria* spp.

### ABSTRACT

Szwajkowska-Michalek L., Buško M., Łakomy P., Perkowski J. 2018. Określanie profili metabolitów lotnych produkowanych przez izolaty *Trametes versicolor* wykazujące antagonistyczne działanie w stosunku do *Armillaria* spp. Sylwan 162 (6): 499-508.

*Armillaria* root disease is one of the most important diseases causing losses in forestry, horticulture, pomiculture and agriculture. Fungi from *Armillaria* spp. infest roots and stem base in trees and shrubs, causing white wood rot. In Poland the most common species include *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink, found both in coniferous and deciduous stands, and *A. gallica* Marxm. et Romagn. found in deciduous stands. Identification of antagonistic interactions between microorganisms in the soil medium enables to use their activity to protect plants against pathogens. Analyses were conducted on two *Trametes versicolor* isolates TR31 and TR55, collected from oak stumps, and 5 fungal species from the genus *Armillaria*: *A. borealis* Marxm. et Korhonen, *A. cepistipes* Velen., *A. gallica*, *A. mellea* (Vahl) P. Kumm. and *A. ostoyae*. Profiles of volatile compounds produced by *T. versicolor* isolates TR31 and TR55 determined in this study varied in their effect on growth of pathogens *Armillaria borealis*, *A. cepistipes*, *A. gallica*, *A. mellea* and *A. ostoyae*. TR31 more effectively than isolate TR55 inhibited growth of fungi from the genus *Armillaria*. Profiles of volatile compounds biosynthesised in the examined fungal cultures were assessed by headspace microextraction in a gas chromatograph coupled with a mass spectrometer. We detected 179 compounds in the analysed fungal cultures. They belonged to the following groups of chemical compounds: amines, alcohols, terpenes, aldehydes, ketones, hydrocarbons, heterocyclic compounds, esters and aromatic compounds (tab. 2). The most numerous group among the isolated volatile compounds comprised hydrocarbons, alcohols and esters at 32.4%, 16.2% and 14.5%, respectively. The highest concentrations reported in RU (i.e. the peak area of a given substance in relation to the peak area of the internal standard, i.e. tridecane) were recorded for aldehydes, alcohols and hydrocarbons. Among all the identified volatile compounds the highest concentration was observed for 2-methylbutanal. However, it was characteristic only of isolate TR31, which exhibited a greater capacity to inhibit growth of *Armillaria* spp. in comparison to isolate TR55 (fig.).

### KEY WORDS

inhibited growth of *Armillaria*, volatile metabolites of *Trametes versicolor*, solid phase microextraction (SPME), aldehydes, alcohols, 2-methylbutanal

## ADDRESSES

Lidia Sz wajkowska-Michałek <sup>(1)</sup> – e-mail: lidiasz17@wp.pl

Maciej Buško <sup>(1)</sup> – e-mail: mabu@up.poznan.pl

Piotr Łakomy <sup>(2)</sup> – e-mail: plakomy@up.poznan.pl

Juliusz Perkowski <sup>(1)</sup> – e-mail: julperk@up.poznan.pl

<sup>(1)</sup> Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy; ul. Wojska Polskiego 75, 60-637 Poznań

<sup>(2)</sup> Zakład Fitopatologii Leśnej, Uniwersytet Przyrodniczy; ul. Wojska Polskiego 71 C, 60-637 Poznań

## Wstęp

Opieńkowa zgnilizna korzeni jest jedną z najważniejszych chorób wyrządzających szkody w leśnictwie, ogrodnictwie, sadownictwie i rolnictwie [Hood i in. 1991; Kile i in. 1991; Fox 2000]. Grzyby rodzaju *Armillaria* atakują korzenie i podstawę pnia drzew i krzewów, powodując białą, jednolitą zgniliznę drewna. W Polsce najbardziej powszechnym gatunkiem jest *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink (w drzewostanach iglastych i liściastych), a także *A. gallica* Marxm. et Romagn. (w drzewostanach liściastych) [Żółciak 1999; Łakomy, Siwecki 2000]. Dodatkowo opieńki jako patogen wtórny są jednym z czynników powodujących zamieranie drzewostanów liściastych, szczególnie dębowych [Łakomy, Siwecki 2000; Sierota 2001].

Od szeregu lat poszukuje się grzybów saprotroficznych, które skutecznie potrafiłyby konkurować z opieńkami o niszę ekologiczną. Testowano *Trametes versicolor* (L.) Lloyd, *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm., *H. lateritium* (Schaeff.) P. Kumm. (= *H. sublateritium* (Schaeff.) Quél.), *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., *Kuehneromyces mutabilis* (Schaeff.) Singer et A.H. Sm., *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst., *Rhizochaete filamentosa* (Berk. et M.A. Curtis) Gresl., Nakasone et Rajchenb. (= *Phanerochaete filamentosa* (Berk. et M.A. Curtis) Burds.) i *Phanerochaete velutina* (DC.) P. Karst. [Pearce, Malajczuk 1990; Hagle, Shaw 1991; Pearce i in. 1995; Kodrik 2001; Łakomy 2004]. Niektóre z nich, jak np. *H. lateritium*, *K. mutabilis* czy *P. ostreatus*, mogłyby być sugerowane do wykorzystania w praktyce leśnej [Kodrik 2001; Łakomy 2004].

Grzyby, poza konkurowaniem z patogenem, mogą również działać na drodze antybiozy – ich metabolity hamują wówczas wzrost patogenów. Szczególne znaczenie mają organiczne lotne związki produkowane przez *Basidiomycetes* i *Ascomycetes*. Są to głównie alkohole, terpeny, aldehydy, ketony, seskwiterpeny i związki aromatyczne [Sunesson i in. 1995; Wheatley i in. 1997; Rösecke, König 2000; Abraham 2001; Wheatley 2002; Korpi i in. 2009]. Wheatley i in. [1997] określili pięć lotnych związków organicznych produkowanych przez *Trichoderma* spp., które hamowały rozwój grzybów powodujących białą zgniliznę drewna. Pochodne pyranu (związki lotne, takie jak 6-n-pentyl-2H-piran-2-on oraz jego analog w postaci 6-n-penteny-2H-piran-2-on) wykazywały właściwości fungistatyczne [Claydon i in. 1987; Dickinson i in. 1987; Scarselletti, Faull 1994; de Melo, Full 2000].

Najsukuteczniejszymi sposobami pobierania próbek lotnych metabolitów jest zastosowanie mikroekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej przy użyciu włókna SPME. Powłoki włókna mają różne właściwości adsorpcji związków [Nilsson i in. 1996; Jeleń 2003], a zarówno polidimetylosiloksan (PDMS), jak i włókno poliakrylanowe są używane zazwyczaj do analizy lotnych metabolitów grzybowych [Nilsson i in. 1996; Fäldti i in. 1999; Jeleń 2003; Demyttenaere i in. 2004; Ewen i in. 2004].

Identyfikację metabolitów prowadzi się najczęściej metodami: spektrometrii mas (MS), spektrometrii w podczerwieni (IR), spektrometrii w nadfiolecie (UV), chromatografii gazowej (GC) lub wysokosprawnej chromatografii ciekłowej (HPLC) sprzężonymi ze spektrometrią

masową (GC\MS, HPLC\MS) [Wurst i in. 1992; Claeson i in. 2002]. Identyfikację poszczególnych substancji najczęściej wykonuje się poprzez porównanie ich widm ze standardami z biblioteki widm masowych w opracowanym systemie HP 5997 OCMS/MD Chemstation.

Celem przedstawianej pracy było określenie profilu związków lotnych produkowanych przez izolaty *Trametes versicolor* TR31 i TR55, które w różny sposób wpływały na rozwój grzybni *Armillaria* Marxm. & Korhonen, *A. cepistipes* Velen., *A. gallica* Marxm. & Romagn., *A. mellea* (Vahl) P. Kumm. i *A. ostoyae* (Romagn.) Herink *in vitro*. Cel ten realizowano poprzez analizę produktów biosyntezy z użyciem tych izolatów metodą mikroekstrakcji z fazy nadpowierzchniowej przy użyciu chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas.

## Materiał i metody

Do badań użyto dwóch izolatów *T. versicolor* o numerach TR31 i TR55 pozyskanych z pniaków dębowych oraz 5 gatunków grzybów rodzaju *Armillaria*: *A. borealis* Marxm. et Korhonen, *A. cepistipes* Velen., *A. gallica*, *A. mellea* (Vahl) P. Kumm. i *A. ostoyae* (tab. 1).

Izolaty grzybów *T. versicolor* hodowano w kolbach na płynnej pożywce glukozowo-ziemniaczanej (przefiltrowany wyciąg z ziemniaków – 75 g, glukoza – 20 g, agar – 15 g, woda destylowana do 1 l), w temperaturze 22-25°C. Dla potrzeb hodowli 200 ml sterylnej pożywki szczepiono trzema fragmentami grzybni *T. versicolor* o powierzchni 5 mm<sup>2</sup>. Po 6 tygodniach wyrosła na powierzchni grzybnię usuwano, pożywkę sączono przez bibułę filtracyjną, a następnie przez sterylną membranę filtracyjną o średnicy porów 0,2 µm. Do przesącza dodawano 2 g agaru (Agar-Agar MERCK), sterylizowano w autoklawie i rozlewano do płytek Petriego o średnicy 6 cm. W centrum płytki umieszczano 5 mm<sup>2</sup> inokulum poszczególnych izolatów *Armillaria* spp. Inkubowano je przez 20 dni w temperaturze 22-24°C, po czym grzybnię oddzielano od pożywki, podgrzewając płytki, płukano 3 razy po 1 min w gorącej wodzie destylowanej, suszono przez 48 godz. w temperaturze 45°C i ważono w celu ustalenia suchej masy grzybni izolatów *Armillaria* spp. [Reaves, Crawford 1994]. Wyniki oceniono statystycznie testem t-Studenta.

Izolaty *T. versicolor* inkubowano na wiórach sosnowych w 22-25°C przez 20 dni. Związki lotne wyodrębniono z kultur grzybowych za pomocą mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME), przy użyciu

Tabela 1.

Izolaty grzybów użyte w doświadczeniu  
Fungi isolates used in the experiment

			Nadleśnictwo Forest district	Miejsce Location
<i>Trametes versicolor</i>	980031	TR31	Podanin	pniak dębowy oak stump
<i>Trametes versicolor</i>	980033	TR55	Smolarz	pniak dębowy oak stump
<i>Armillaria borealis</i>	99072	AB72	–	świerk spruce
<i>Armillaria cepistipes</i>	98068	AC68	Smolarz	dąb oak
<i>Armillaria gallica</i>	98058	AG58	Babki	dąb oak
<i>Armillaria mellea</i>	20051	AM51	Strzelce Krajeńskie	brzoza birch
<i>Armillaria ostoyea</i>	99070	AO70	Podanin	sosna pine

2 cm włókna DVB/CAR/PDMS. Ekstrakcję prowadzono z fazy nadpowierzchniowej (50°C, 30 min), po czym wyekstrahowane związki desorbowano w komorze nastrzykowej chromatografu gazowego. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie RTX-S (9,66 m × 180 μm × 0,2 μm). Dalsza analiza związków prowadzona była za pomocą spektrometru mas z analizatorem czasu przelotu. Uzyskane chromatogramy poddano dekonwolucji za pomocą oprogramowania Chroma TOF.

## Wyniki

Profile związków lotnych badanych kultur grzybowych były zróżnicowane. Na podstawie porównania uzyskanych widm masowych z biblioteką widm masowych oraz w oparciu o indeksy retencji zidentyfikowano w badanych kulturach grzybowych 179 związków należących do następujących grup: aminy – 7 związków, alkohole – 29, ketony – 18, aldehydy – 23, estry – 26, związki aromatyczne – 7, terpeny – 4, węglowodory – 58, związki heterocykliczne – 7.

Metabolitami, które występowały w największym stężeniu, były: 2-metylobutanal (856,8 RU), 2,3-dimetylopentan (256,2 RU), butanol (246,7 RU), 2-metylopentan (71,54 RU), metylocyklopentan (62,5 RU), 2-aminopirydyna (60,74 RU), 2,4-dimetylopirydyna (45,49 RU), 6-metylo-5-hepten-2-on (35,97 RU), 3-penten-2-on (32,4 RU), benzaldehyd (11,34 RU) i mircen (7,34 RU). Metabolity charakterystyczne tylko dla izolatu TR31 to np. 2-metylobutanal, undekanal, 2-aminopirydyna, butanol i 6-metylo-5-hepten-2-on, natomiast 2-metylo-1-nonenon, indan, 2-metylofuran i hexenal występowały tylko u izolatu TR55. Wspólnymi wyodrębnionymi metabolitami charakterystycznymi dla obydwu izolatów były m.in.: benzaldehyd, cykloheksanol, 2,4-dimetylopirydyna, 1-okten-3-on, oktan 2-metylobutyli, limonen, 2-undekanal, chlorobenzen i mircen (tab. 2). Związki aromatyczne występują w większości u wszystkich przebadanych izolatów. Alkohole stanowią 16,2%, aminy 3,9%, ketony 10,1%, aldehydy 12,9%, estry 14,5%, związki aromatyczne 3,9%, terpeny 2,2%, węglowodory 32,4%, a związki heterocykliczne 3,9% wszystkich wyizolowanych związków.

Izolaty *T. versicolor* w znacznym stopniu ograniczały rozwój grzybni *Armillaria* spp. *in vitro*. Izolat TR31 ograniczał najsilniej wzrost *A. borealis* i *A. ostotae* (98 i 97% w stosunku do kontroli), natomiast najslabiej hamował wzrost *A. cepistipes* (85,8% w stosunku do kontroli). Dla pozostałych testowanych gatunków *A. gallica* i *A. mellea* izolat ten ograniczał wzrost odpowiednio o 88,8 i 92,65%. Drugi z przebadanych izolatów *T. versicolor* TR55 ograniczał grzybnię opieniek od 74,7% (*A. mellea*) do 83% (*A. ostotae*) w stosunku do kontroli (ryc.).

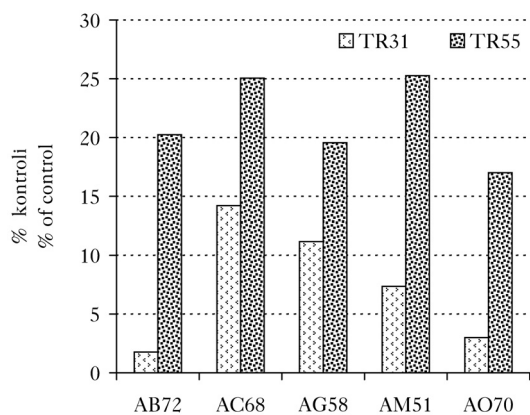
**Tabela 2.**

Ilość [RU] substancji lotnych uzyskanych z hodowli grzybów *T. versicolor* TR31 i TR55 przy użyciu mikroekstrakcji w fazie stałej (SPME)  
Amount [RU] of volatiles obtained from mycelial cultures of *T. versicolor* TR31 and TR55 using solid-phase microextraction (SPME)

	TR31	TR55		TR31	TR55
aldehydy			heksenal		
aldehydes			heksenal	–	6,98
2-metylobutanal			pentanal		
2-methylbutanal	856,8	–	pentanal	1,57	1,8
benzaldehyd			dekanal		
benzaldehyde	11,34	1,7	dekanal	–	1,45
butanal			undekanal		
butanal	3,21	1,29	undekanal	3,11	–
heptanal					
heptanal	2,1	1,07			

Tabela 2. ciąg dalszy

	TR31	TR55		TR31	TR55
ketony ketones					
6-metylo-5-hepten-2-on 6-methyl-5-hepten-2-one	35,97	–	butanol		
2-metylo-1-nonenon 2-methyl-1-nonenone	–	3,89	butanol	246,7	–
1-okten-3-on 1-octen-3-one	4,78	3,56	(E)-3-dodeken-1-ol (E)-3-dodecen-1-ol	1,34	1,21
butan-2-on butan-2-one	6,78	5,9	heksan-1-ol hexan-1-ol	2,67	1,7
oktan-2-on octan-2-one	3,5	4,69	2-heksenol 2-hexenol	1,09	–
oktan-3-on octan-3-one	2,54	1,78	undekan-4-ol undecan-4-ol	3,49	2,92
3-penten-2-on 3-penten-2-one	–	32,4	estry esters		
terpeny terpenes			butanian etylu butanoic acid ethyl ester	4,01	8,04
mircen myrcene	7,34	4,8	salicylan metylu methyl salicylate	–	1,43
δ-3-karen δ-3-carene	2,65	–	oktan 2-metylobutylu 2-methylbutyl octane	1,98	3,78
limonen limonene	1,78	1,34	aminy amines		
związki aromatyczne aromatic compounds			2-aminopirydyna 2-aminopyridine	60,74	–
benzaldehyd benzaldehyde	11,34	4,78	2,4-dimetylopirydyna 2,4-dimethylpyridine	32,56	45,49
chlorobenzen chlorobenzene	8,9	4,56	węglowodory hydrocarbons		
indan indane	–	1,23	1-heksen 1-hexene	–	11,3
związki heterocykliczne heterocyclic compounds			2-metylopentan 2-methylpentan	71,54	–
2-metylofuran 2-methylfuran	–	2,67	3-metylopentan 3-methylpentan	1,65	–
alkohole alcohols			2,3-dimetylopentan 2,3-dimethylpentan	256,2	–
cykloheksanol cyklohexanol	6,3	8,4	cykloheksan cyclohexane	4,32	–
1-okten-3-ol 1-octen-3-ol	7,89	9,1	metylocyklopentan methylcyclopentane	62,5	–
3-oktanol 3-octanol	5,74	3,63	2,2 dimetylooktan 2,2 dimethyloctane	1,98	1,37
2-metylobutan-1-ol 2-methylbutan-1-ol	4,89	–	2- undekan 2- undecane	7,89	4,78
			2 metylohept-4-en 2 metylohept-4-ene	1,78	1,34



### Ryc.

Wpływ izolatów *T. versicolor* na wzrost grzybni *Armillaria* spp. *in vitro*  
Effect of *T. versicolor* isolates on the *in vitro* growth of *Armillaria* spp.

## Dyskusja

Grzyby produkują metabolity wtórne mające charakter bioaktywnych składników. Powstają one tylko w określonym momencie życia grzyba. Jedną z najważniejszych grup metabolitów wtórnych są lotne związki organiczne (VOC). Ich spektrum jest charakterystyczne dla każdego gatunku [Larsen, Frisvad 1995], a proporcje poszczególnych składników zmieniają się w zależności od warunków odżywiania i wieku kultury [Bruce i in. 1996; Wheatley i in. 1997; Bruce i in. 2000] lub w trakcie antagonistycznych interakcji z innymi grzybami [Hynes i in. 2007].

Analizowane izolaty grzyba *T. versicolor* charakteryzowały się odmiennymi profilami metabolicznymi. Izolat TR31 pod względem jakościowym zawierał najwięcej węglowodorów i estrów. Pod względem ilościowym związkiem o największym stężeniu okazał się 2-metylobutanol. Podobne rezultaty uzyskali Ewen i in. [2004], którzy stwierdzili, że związek ten był emitowany w największym stężeniu przez *Serpula lacrymans* (Wulfen) J. Schröt. Z drugiej strony stwierdzono, że związek ten jest charakterystyczny także dla profilu metabolicznego trufli [Splivallo i in. 2011]. Odmiennie wyniki uzyskali Thakeow i in. [2006], którzy stwierdzili, że związkiem o największym stężeniu syntetyzowanym przez *T. versicolor* był  $\beta$ -barbaten. Według tych autorów, którzy przeprowadzili eksperyment na drewnie bukowym, związki lotne emitowane przez *T. versicolor* to związki zawierające C5-C8 i terpeny. Pierwsze z nich to 1-okten-3-ol, 3-oktanon i 3-oktanol, które jednak oznacza się podczas większości analiz lotnych metabolitów grzybowych, co również potwierdzono dla testowanych przez nas izolatów. Natomiast w prezentowanym badaniu, w przeciwieństwie do Thakeowa i in. [2006], nie oznaczono terpenów:  $\alpha$ - i  $\beta$ -barbatenów. Te obserwacje potwierdzają wcześniejsze spostrzeżenia, że profil metabolitów lotnych jest uzależniony od badanego izolatu. W przeprowadzonych badaniach izolat TR31 zawierał we frakcji lotnej 3 terpeny: mircen,  $\delta$ -3-karen i limonen, natomiast drugi – mircen i limonen. Terpeny te znane są z hamującego wpływu na wzrost *Heterobasidion* spp. i *Leptographium* spp. Mogą także hamować rozwój patogenów *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. i *Botrytis cinerea* Pers. [Hamilton-Kemp i in. 1992; Zamponi i in. 2006]. W badaniach *in vitro* limonen wykazywał hamujące działanie na wzrost grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus* [Madavi i in. 2011] oraz *Trichophyton rubrum* (Castell.) Sabour. Interesujące badania przeprowadzili Zamponi i in. [2006], wykazując, że mircen (monoterpen obecny u testowanych izolatów) charakteryzował się silnym działaniem hamującym wzrost patogenu korzeni *Heterobasidion* spp. Metabolit ten był produkowany również podczas antagonistycznych interakcji pomiędzy *Stereum gausapatum* (Fr.) Fr. i *T. versicolor* w badaniach *in vitro* [Evans i in. 2008].

Badania nad lotnymi metabolitami grzyba z rodzaju *Trametes* prowadzili także Rösecke i in. [2000]. Określili oni profil lotnych związków dla *Trametes suaveolens* (Fr.: Fr.) Fr. wywołującego białą zgniliznę drewna. Wyniki dotyczące rodzaju *Trametes* były zbliżone do uzyskanych w niniejszych badaniach. Autorzy potwierdzili obecność benzaldehydu, n-heptanal, 3-oktanonu i 1-okten-3-olu, a także (podobnie jak Thakeow i in. [2006]) oznaczono  $\delta$ -barbaten. Natomiast Schalchi i in. [2011], badając profil związków lotnych *T. versicolor*, oznaczyli między innymi metylowe pochodne butanolu: 3-metylo-1-butanol i 2-metylo-1-butanol. Larsen i Frisvad [1995] oraz Matysik i in. [2009] stwierdzili, że wymienione alkohole oraz butanol są produkowane przez większość gatunków grzybów i były one obecne wśród lotnych związków produkowanych przez testowane przez nich izolaty. Związki te były zaproponowane przez Börjessona i in. [1992] jako wskaźniki wzrostu grzybów w ziarnie zbóż. Schnürer i in. [1999] oznaczyli także te związki u grzybów rodzaju *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. W prezentowanych badaniach butanol był metabolitem charakterystycznym dla grzyba testowanego TR31 i występował w największej ilości wśród alkoholi. Nie stwierdzono natomiast jego obecności dla izolatu TR55. Strobel i in. [2001] stwierdzili, że butanol i 2-metylo-1-butanol produkowane przez *Muscodor albus* Worapong, Strobel et W.M. Hess stanowiły najskuteczniejszą klasę związków lotnych hamujących wzrost takich mikroorganizmów jak *Aspergillus fumigatus* Fresen., *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout i *Globisporangium ultimum* (Trow) Uzuhashi, Tojo et Kakish. oraz Gram-ujemne i Gram-dodatnie bakterie (np. *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* w warunkach *in vitro*). We frakcji lotnej emitowanej przez grzyby testowane oznaczono także wyższe alkohole, np. (E)-3-dodeken-1-ol i undekan-4-ol. Związki te produkowane były również jako lotne metabolity przez bakterie *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [Weise i in. 2012].

Obok alkoholi liczną grupę związków lotnych stanowią aldehydy. Dominującym związkiem we frakcji lotnej u *T. versicolor* (TR31) był 2-metylobutanal, który nie występował u drugiego z przebadanych izolatów TR55. Jego właściwości fungistatyczne jako lotnej substancji są znane, a Whitfield i in. [1981] wykazali jego hamujące działanie na wzrost *Phytophthora cinnamomi* Rands.

Kolejnymi związkami emitowanymi przez testowane grzyby były heptanal i butanal. Przypisuje się im działanie fungistatyczne. Humphris i in. [2001] stwierdzili, że te aldehydy były bardzo skuteczne w hamowaniu wzrostu *Neolentinus lepideus* (Fr.) Redhead & Ginns, *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill i *Rhodonina placenta* (Fr.) Niemelä, K.H. Larss. et Schigel.

W przeprowadzonych badaniach u izolatów grzybów we frakcji lotnej oznaczono także ketony. Głównymi związkami z tej grupy były: 3-penten-2-on, butan-2-on, 1-okten-3-on, oktan-2-on, 6-metylo-5-hepten-2-on i oktan-3-on. Ta grupa związków skupia uwagę jako markery świadczące o porażeniu różnych produktów przez grzyby powodujące zjawisko pleśnienia materiałów organicznych i nieorganicznych. Wśród ketonów metabolitem lotnym charakterystycznym jedynie dla izolatu TR55 i występującym dla niego w największym stężeniu okazał się 3-penten-2-on. Według Fiedlera i in. [2001] keton ten (obok heptan-2-onu) wydzielany jest często przez grzyby porastające drewno. Powstaje przez  $\beta$ -oksydację wolnych kwasów tłuszczowych występujących w drewnie. Dla izolatu TR31 6-metylo-5-hepten-2-on jest metabolitem charakterystycznym i występującym w największej ilości wśród ketonów.

Badania izolatów grzyba *T. versicolor* wykazały, że profile należące do dwóch różnych izolatów różnią się między sobą. Więcej metabolitów produkował izolat TR55, a wyższe stężenia metabolitów obserwowano dla TR31. Potwierdzają to wcześniejsze obserwacje, że profil związków lotnych jest uzależniony od stosowanego izolatu [Jeleń i in. 1995; De Lucca i in. 2012]. Dodatkowo izolat TR31 miał silne cechy inhibicyjne proporcjonalne do stężenia metabolitów lotnych wskazujących na ten wpływ. Stwierdzono, że oba izolaty *T. versicolor* w znacznym stop-

niu ograniczały rozwój grzybni *Armillaria* spp. *in vitro*. Jednakże izolat TR31 silniej ograniczał wzrost grzybów rodzaju *Armillaria* niż izolat TR55. Łakomy [2004] wykazał, że w warunkach bezpośredniej konkurencji o niszę ekologiczną w drewnie izolat *T. versicolor* TR31 przerósł próbki drewna i uniemożliwił jego kolonizację przez wszystkie testowane gatunki opieńki. Natomiast izolat TR55 zasiedlił drewno częściowo, co pozwoliło na rozwój płatów grzybnio wych i ryzomor f. Izolat TR31 silnie ograniczał wzrost *Armillaria* zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. W wyznaczonym profilu obejmującym frakcje lotne emitowane przez testowane grzyby znaczną ilość stanowią związki wykazujące działanie fungistatyczne. Warto podkreślić, że ilość i jakość wytwarzanych związków była specyficzna dla poszczególnych izolatów *T. versicolor*. W związku z powyższym nie wszystkie izolaty tego samego gatunku grzyba saprotroficznego będą stanowiły jednolitą barierę i element oporu środowiska naturalnego wobec *Armillaria* spp. Wyznaczona obecność tych metabolitów pozwala lepiej zrozumieć zależności występujące w środowisku naturalnym w warunkach konkurencji między *T. versicolor* a *Armillaria* spp. zasiedlającymi pniaki i pozostałości drewna w drzewostanach liściastych.

## Literatura

- Abraham W. R. 2001. Bioactive sesquiterpenes produced by fungi: are they useful for humans as well? *Current Medicinal Chemistry* 8: 583-606.
- Börjesson T., Stö l l m a n U., Schnürer J. 1992. Volatile metabolites produced by six fungal species compared with other indicators of fungal growth on cereal grains. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2599-2605.
- Bruce A., Kundzewicz A., Wheatley R. E. 1996. Influence of culture age on the volatile organic compounds produced by *Trichoderma aureoviride* and associated inhibitory effects on selected wood decay fungi. *Mat. Org.* 30: 79-94.
- Bruce A., Wheatley R. E., Humphris S. N., Hackett C. A., Florence M. E. J. 2000. Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. *Holzfor schung* 54: 481-486.
- Claeson A.-S., Levin J.-L., Blomquist G., Sunesson A.-L. 2002. Volatile metabolites from microorganisms grown on humid building materials and synthetic media. *JEM J. Environ. Monit.* 4 (5): 667-672.
- Claydon N., Allan M., Hanson J. R., Avent A. G. 1987. Antifungal alkyl pyrones of *Trichoderma harzianum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 88: 503-513.
- De Lucca A. J., Bouse S. M., Carter-Wientjes C., Bhatnagar D. 2012. Volatile profiles and aflatoxin production by toxigenic and non-toxicogenic isolates of *Aspergillus flavus* grown on sterile and non-sterile cracked corn. *Ann Agric. Environ. Med.* 19 (1): 91-98.
- Demyttenaere J. C. R., Morina R. M., de Kimpe N., Sandra P. 2004. Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *Fusarium* species. *Journal of Chromatography A* 1027: 147-154.
- Dickinson J. M., Hanson J. R., Hitchcock P. B., Claydon N. 1987. Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. *J. Chem. Soc. Perkin Transact.* 1: 1885-1887.
- Evans J. A., Eyre C. A., Rogers H. J., Boddy L., Muller C. T. 2008. Changes in volatile production during interspecific interactions between four wood rotting fungi growing in artificial media. *Fungal Ecology* 1: 57-68.
- Ewen R. J., Jones P. R. H., Ratcliffe N. M., Spencer-Phillips P. T. N. 2004. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of the volatile organic compounds emitted from the woodrotting fungi *Serpula lacrymans* and *Coniophora puteana*, and from *Pinus sylvestris* timber. *Mycological Research* 108: 806-814.
- Fä l d t i J., Jonsell M., Nordlander G., Borg-Karlson A. K. 1999. Volatiles of bracket fungi *Fomitopsis pinicola* and *Fomes fomentarius* and their function as insect attractants. *Journal of Chemical Ecology* 25: 567-590.
- Fiedler K., Schütz E., Geh S. 2001. Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204: 111-121.
- Fox R. T. V. 2000. The extent of losses aims for managing *Armillaria*. W: Fox R. T. V. [red.]. *Armillaria* root rot: biology and control of honey fungus. Intercept, Andover. 139-149.
- Hagle S. K., Shaw C. G. 1991. Avoiding and Reducing Losses from *Armillaria* Root Disease W: Shaw III C. G., Kile G. A. [red.]. *Armillaria* root diseases Red. Forest Service Agricultural Handbook 691. Washington D.C., USDA.
- Hamilton-Kemp T. R., McCracken C. T. Jr., Loughrin J. H., Andersen R. A., Hildebrand D. F. 1992. Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *J. Chem. Ecol.* 18: 1083-1091.
- Hood I. A., Redfern D. B., Kile G. A. 1991. *Armillaria* in planted hosts. W: *Armillaria* root diseases. W: Shaw III C. G., Kile G. A. [red.]. Forest Service Agricultural Handbook 691. Washington D.C., USDA. 122-149.



- Humphris S. N., Wheatley R. E., Bruce A. 2001. The effects of specific volatile organic compounds produced by *Trichoderma* spp. on the growth of wood decay basidiomycetes. *Holzforschung* 55: 233-237.
- Hynes J., Müller C. T., Jones T. H., Boddy L. 2007. Changes in volatile production during the course of fungal mycelial interactions between *Hypholoma fasciculare* and *Resinicium bicoölör*. *Journal of Chemical Ecology* 33: 43-57.
- Jeleń H. H. 2003. Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites. *Letters in Applied Microbiology* 36: 263-267.
- Jeleń H. H., Mirocha C. J., Wąsowicz E., Kamiński E. 1995. Production of volatile sesquiterpenes by *Fusarium sambucinum* strains with different abilities to synthesize trichothecenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3815-3820.
- Kile G. A., McDonald G. I., Byler J. W. 1991. Ecology and disease in natural forests. W: *Armillaria* root diseases. W: Shaw III C. G., Kile G. A. [red.]. Forest Service Agricultural Handbook 691. Washington D.C., USDA. 102-121.
- Kodrik M. 2001. Results of beech stump inoculation with antagonistic fungi. *J. For. Sci.* 47 (11): 505-512.
- Korpi A., Järnberg J., Pasanen A. L. 2009. Microbial volatile organic compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 39: 139-193.
- Larsen T. O., Frisvad J. C. 1995. Chemosystematics of *Penicillium* Based on Profiles of Volatile Metabolites. *Mycol. Res.* 99: 1167-1174.
- Łakomy P. 2004. Środowiskowe uwarunkowania zasiedlenia pniaków drzew liściastych przez wybrane gatunki grzybów saprotroficzných oraz grzybów rodzaju *Armillaria*. *Rocz. AR Pozn. Rozpr. Nauk* 355: 1-164.
- Łakomy P., Siwecki R. 2000. Grzyby z rodzaju *Armillaria* występujące w Nadleśnictwie Smolarz. *Sylwan* 144 (4): 115-121.
- Madavi O. S., Mohammad A. M., Seyed M., Bagher N. A., Seyed J. M., Seyed A. M. G. M. S., Seyede M. J. S., Esmail K., Mehdi S. 2011. The Effects of Limonene and Orange Peel Extracts on Some Spoilage Fungi. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* 1: 82-86.
- Matsysik S., Herbarth O., Mueller A. 2009. Determination of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by passive sam-pling onto charcoal sorbents. *Chemosphere* 76: 114-119.
- de Melo I. S., Faull J. L. 2000. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *Sci. Agric.* 57: 1.
- Nilsson T., Larsen T. O., Montanarella L., Madsen J. O. 1996. Application of head-space solid-phase microextraction for the analysis of volatile metabolites emitted by *Penicillium* species. *Journal of Microbiological Methods* 25: 245-255.
- Pearce M. H., Malajczuk N. 1990. Inoculation of karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) thinning stumps with wood decay fungi for control of *Armillaria luteobubalina*. *Mycol. Res.* 94: 753-761.
- Pearce M. H., Nelson E. E., Malajczuk N. 1995. Effect of the cord-forming saprotrophs *Hypholoma australe* and *Phanerochaete filamentosa* and ammonium sulphamate on establishment of *Armillaria luteobubalina* on stumps of *Eucalyptus diversicolor*. *Mycol. Res.* 99 (8): 951-956.
- Reaves J. L., Crawford R. H. 1994. In vitro antagonism by *Ulocladium botrytis* of *Phellinus weirii*, *Heterobasidium annosum*, and *Armillaria ostoyae*. *European Journal Of Forest Pathology* 24 (6-7): 364-375.
- Rösecke J., König W. A. 2000. Odorous compounds from the fungus *Gloeophyllum odoratum*. *Flavour Fragr.* 15: 315-319.
- Rösecke J., Pietsch M., König W. A. 2000. Volatile constituents of wood-rotting basidiomycetes. *Phytochemistry* 54: 747-750.
- Scarselletti R., Faull J. L. 1994. In vitro activity of 6-pentyl-4-pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Mycol. Res.* 98: 1207-1209.
- Schalchi H., Hormazabal E., Becerra J., Birkett M., Alvear M., Vidal J., Quiroz A. 2011. Antifungal activity of volatile metabolites emitted by mycelial cultures of saprophytic fungi. *Chemistry and Ecology* 27 (6): 503-513.
- Schnürer J., Olsson J., Börjesson T. 1999. Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Genet. Biol.* 27: 209-217.
- Sierota Z. 2001. Choroby lasu. CILP, Warszawa.
- Splivallo R., Ottonello S., Gobel C., Mello A., Karlovsky P. 2011. Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist* 189: 688-699.
- Strobel G. A., Dirkse E., Sears J., Markworth C. 2001. Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology – SGM* 147: 2943-2950.
- Sunesson A., Vaes W. H. J., Nilsson C. A., Blomquist G., Andersson B., Carlson R. 1995. Identification of volatile metabolites from five fungal species cultivated on two media. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2911-2918.
- Thakeow P., Weißbecker B., Schütz S. 2006. Volatile organic compounds emitted from fungalrotting beech (*Fagus sylvatica*). *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 15: 157-160.
- Weise T., Kai M., Gummesson A., Troeger A., von Reuß S., Piepenborn S., Kosterka F., Sklorz M., Zimmermann R., Wittko F., Piechulla B. 2012. Volatile organic compounds produced by the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Beilstein J. Org. Chem.* 8: 579-596.
- Wheatley R. E. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek* 81: 357-364.
- Wheatley R., Hackett C., Bruce A., Kundzewicz A. 1997. Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. Inhibitory to wood decay fungi. *Int. Biodeter. Biodegr.* 39: 199-205.

- Whitfield F. B., Shea S. R., Gillen K. J., Shaw K. J. 1981. Volatile components from the roots of *Acacia pulchella* R.Br. and their effect on *Phytophthora cinnamomi* Rands. Australian Journal of Botany 29 (2): 195-208.
- Wurst M., Kysilka R., Koza T. 1992. Analysis and isolation of indole alkaloids of fungi by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 593: 201-208.
- Zamponi L., Michelozzi M., Capretti P. 2006. Effects of four monoterpenes on the growth in vitro of some *Heterobasidion* spp. and two *Leptographium* species. Journal of Plant Diseases and Protection 113: 164-167.
- Żółciak A. 1999. Występowanie grzybów z rodzaju *Armillaria* (Fr.: Fr.) Staude w kompleksach leśnych w Polsce. Prace Inst. Bad. Leśn. A 890: 29-40.