

Katarzyna Nawrot-Chorabik¹✉, Robert Jankowiak¹

Interakcje pomiędzy kalusem trzech genotypów *Abies alba* a grzybami o różnym statusie ekologicznym

Interactions among three genotypes of *Abies alba* callus and fungi with different ecological status

Abstract. Callus cultures derived from three *Abies alba* genotypes were co-cultivated with several fungi of different ecological status. Growth of *Heterobasidion parviporum*, *Ophiostoma piceae* and *Pesotum* sp. was stimulated, whilst *Heterobasidion abietinum* and *Geosmithia* sp. were unaffected by the presence of callus (statistical analyses for these 2 fungi gave no difference and a marginally-significant different respectively).

Fir callus inhibited the growth of *Pesotum fragrans* and *Rizosphaera macrospora*. Otherwise, there were significant differences between the callus genotypes with respect to the growth of fungi and colonization of fir callus. Fungi *H. abietinum*, *O. piceae*, *R. macrospora* and *Geosmithia* sp. first colonized callus belonging to genotype G6. In contrast, fungal species: *P. fragrans*, *Pesotum* sp., *Geosmithia* sp. and *H. parviporum* quickly colonized callus derived from the genotype G5. Across all genotypes, callus was colonized in the shortest period of time by the fungus *H. parviporum* (causing callus necrosis after 6-9 days), the slowest was *Pesotum* sp. (causing callus necrosis after 60-81 days). The importance of these results regarding pathogenicity and behaviour in vivo of these fungi is discussed.

Key words: pathogenic fungi, tissue culture

1. Wstęp

Wiele czynników abiotycznych, biotycznych i antropogenicznych zagraża jodle pospolitej (*Abies alba* Mill.) w Polsce. Spośród czynników biotycznych szczególnie duże szkody w lasach jodłowych wyrządzają owady oraz grzyby patogeniczne. Większość grzybów związanych z jodłą to saprotrofy, które rozkładają martwe tkanki, lub endofity żyjące wewnątrz zdrowych tkanek drzew (Kowalski, Butin 1989; Sieber 1989; Sieber-Canavesi, Sieber 1993). Jednakże niektóre grzyby, takie jak np. *Heterobasidion abietinum* Niemelä & Korhonen i *H. parviporum* Niemelä & Korhonen mogą także powodować groźne choroby jodeł. Wymienione podstawczaki powodują białą zgniliznę korzeni młodych i starszych drzew (Mańka 2005) i należą do najpoważniejszych patogenów jodły w Polsce (Łakomy 1996; Munda 1996; Łakomy et al. 2000).

Innym potencjalnym zagrożeniem dla jodły mogą być grzyby przenoszone przez korniki, *Cryphalus piceae* (Ratz.) oraz *Pityokteines* spp. Owady te są związane z różnymi grzybami siniznowymi oraz grzybami z rodzaju *Geosmithia* (Jankowiak, Kolařík 2010; Perenek et al. 2008). Wyniki doświadczenia infekcyjnego przeprowadzonego w Polsce wskazują, że grzyby te są saprotrofami lub słabymi patogenami jodły (Jankowiak, Kolařík 2010).

Endofity związane z jodłą pospolitą uważane są najczęściej za nieszkodliwych kolonizatorów żywych tkanek drzew (Sieber 2007). Wiele gatunków z tej grupy grzybów, np. *Rhizosphaera macrospora* Gourb. & M. Morelet należy do tzw. transient fungi. Grzyby z tej grupy początkowo występują jako endofity, a później zasiedlają zamierające tkanki swojego żywiciela (Sieber-Canavesi, Sieber 1993).

¹ Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Katedra Fitopatologii Leśnej, Al. 29 Listopada 46, 31–425 Kraków, Polska;

✉ Fax +48 124119715; e-mail: rlnawrot@cyf-kr.edu.pl

W badaniach nad interakcjami pomiędzy drzewami iglastymi a grzybami patogenicznymi w ostatnim czasie coraz częściej stosuje się hodowle tkankowe (Hřib et Rypáček 1978, 1981, 1983; Diner et al. 1984; Abdul Rahman et al. 1987; Woodward, Pearce 1988; Hřib et al. 1995; Ragazzi et al. 1995; Spanos, Woodward 1997; Kvaalen, Solheim 2000; Vookova et al. 2006). W kilku pracach badano także zachowanie się kalusa w obecności grzybów endofitycznych (Sieber et al. 1990, Hendry et al. 1993, Peters et al. 1998). Metoda kultur tkankowych dostarcza cennych informacji na temat wzrostu grzybni i reakcji kalusa w kulturach tkankowych i pozwala oszacować mechanizmy obronne drzew na poziomie embrionalnym. Relacje roślina – patogen są zazwyczaj opisywane poprzez porównanie wzrostu grzybni w kierunku do kalusa i przeciwnym, zmian cech fenotypowych kalusa oraz wydzielanie przez kalus specyficznych białek.

W badaniach nad drzewami leśnymi, kalus był otrzymywany zazwyczaj z jednego genotypu drzewa. Jedynie w doświadczeniu Kvallena i Solheima (2000) oraz Spanosa i Woodwarda (1997) wzrost grzybów patogenicznych był obserwowany w obecności kalusa uzyskanego z kilku genotypów *Picea abies* (L.) H. Karst. i *Cupressus sempervirens* L. Najczęściej różne genotypy tego samego gatunku stosuje się w odniesieniu do innych gatunków roślin (Gretenkort, Helsing 1993, Dai et al. 2003; Nyange et al. 1995). Przypuszczamy, że różne genotypy jodły użyte w kulturach dualnych mogą różnie wpływać na wzrost grzybów.

W niniejszej pracy badano interakcje pomiędzy grzybami o różnym stopniu patogeniczności a kalusem jodły pospolitej. Dodatkowo oszacowano wpływ genotypu jodły na wzrost grzybów w kulturach dualnych.

2. Materiały i metody

Materiał rośliny

Do kultur *in vitro* jako eksplantaty pierwotne użyto zarodki zygotyczne izolowane z dojrzałych nasion jodły pospolitej, pozyskane w październiku 2005 r., pochodzące z wyłączonej drzewostanów nasiennych, zlokalizowanych na trzech powierzchniach: Nadleśnictwo Nowy Targ, oddział 21b; Nadleśnictwo Skarżysko-Kamienna, oddział 109a; Nadleśnictwo Janów Lubelski, oddział 72c. Każde pochodzenie reprezentowane było przez 100 eksplantatów (o odrębnych genotypach), spośród których do badań kultur dwuorganizmowych wybrano 3 genotypy kalusa embriogennej jodły pospolitej: G4 – pochodzący z Nowego Targu; G5 – pochodzący ze Skarżyska Kamiennej; G6 – pochodzący z Janowa Lubelskiego.

Izolaty grzybów

W doświadczeniu użyto następujących gatunków izolatów grzybów: *Heterobasidion abietinum* (nr 17076), *Heterobasidion parviporum* (nr 18307a), *Geosmithia* sp. (nr 0373), *Ophiostoma piceae* (Münch) Syd. & P. Syd. (nr 0358), *Pesotum fragrans* (Math.-Käärik) G. Okada & Seifert (nr 01206), *Pesotum* sp. (nr 0705), *Rhizosphaera macrospora* (nr 0390). Kultury zostały uzyskane z kolekcji kultur grzybów Katedry Fitopatologii Leśnej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Grzyby rosły w płytkach Petriego na pożywce agarowo-maltozowej (2% maltoza, 2% agar) przez 7 dni. Później inokulum w postaci krążka było przeszczepiane na pożywkę SH (Schenk et Hildebrandt 1972) celem przystosowania grzybni do pożywki, na której prowadzono dalsze badania w kulturach dualnych.

Kalus jodły

Dojrzałe nasiona jodły pospolitej dezynfekowano w 10% podchlorynie sodu (15 minut), po czym nasiona poddano pęcznieniu (12 godzin), w temp. 4°C. Z nasion, pod lupą binokularną, izolowano dojrzałe zarodki zygotyczne, które wykładano, po 5 sztuk, do szalek Petriego na pożywkę SH uzupełnioną regulatorami wzrostu (BA – 6-benzyl-aminopuryna, KIN – kinetyna, 2,4-D – kwas dichlorofenoksyoctowy), witaminami (tiamina, pirydoksyna, kwas nikotynowy), 2,0 % sacharozą i 0,4% phytozelem (Nawrot-Chorabik 2008, 2009). Hodowlę kalusa prowadzono w inkubatorze, w temperaturze 25°C, w ciemności. Po zainicjowaniu kultur embriogennej, co dwa tygodnie pasażowano kalus na świeżą pożywkę SH z podwojonym stężeniem regulatorów wzrostu w celu jego proliferacji. Kalus barwiono acetokarminem i przy użyciu mikroskopu interferencyjnego sprawdzano stopień jego embriogenności (acetokarmin barwi na czerwono jądra komórek strefy embriogennej prazarodków) (Gupta, Durzan 1987).

Interakcje pomiędzy grzybami a kalusem

Z kultur grzybów hodowanych na pożywce SH, po 10 dniach pobierano inokula o wymiarach 1×1 cm i umieszczono na środku szalki Petriego, w której umieszczano kalus embriogennej jodły pospolitej o średnicy 1 cm (0,5 mg) na brzegu szalki, w odległości 2,5 cm od centrum inokulum grzyba i 5 mm od krawędzi szalki. Tak założona kultura dwuorganizmowa umożliwiała wykonywanie pomiarów grzybni w kierunku kalusa i w kierunku przeciwnym. Te same pomiary wykonywano dla kontrolnych genotypów kalusa i kontrolnych izolatów grzybów. Kultury dwuorganizmowe hodowano w sterylnych warunkach w 15 szalkach Petriego o średnicy

Tabela 1. Średnie tempo wzrostu grzybów w kulturach dualnych z kalusem trzech genotypów i bez kalusa [mm/T]. Wartości oznaczone tą samą literą nie były istotnie różne w odniesieniu do testu HSD, $p=0.005$.

Table 1. Mean growth speed of fungi in dual culture with callus of three genotypes and without callus of *Abies alba* [mm/T]. Mean radial growth values with the same letter were not significantly different according to HSD test ($p=0.05$).

Gatunek grzyba Fungus species	T (h)	Średni wzrost grzyba (mm) w obecności i bez kalusa (kontrola) Mean fungus growth (mm) with and without callus (control)				Wynik analizy statystycznej Statistical analysis result		
		control	Callus genotype			Friedman's ANOVA*	p**	t-Student test
			G6	G5	G4			
<i>Heterobasidion abietinum</i>	24	23,41 ^a	25,55 ^a	21,68 ^b	25,14 ^a	11,846*	0,0079	G5
<i>Heterobasidion parviporum</i>	24	21,82 ^a	26,91 ^b	24,41 ^c	26,41 ^{bc}	22,773*	0,0001	
<i>Geosmithia</i> sp.	24	21,64	24,93	25,79	24,29	7,500	0,0576	
<i>Ophiostoma piceae</i>	48	24,58 ^a	25,64 ^b	26,46 ^c	24,66 ^a	28,658*	0,0000	
<i>Pesotum fragrans</i>	48	26,25 ^a	22,75 ^b	26,82 ^a	19,80 ^c	41,371*	0,0000	G6, G4
<i>Pesotum</i> sp.	48	25,73 ^a	29,13 ^b	29,26 ^b	26,29 ^a	35,822*	0,0000	
<i>Rhizosphaera macrospora</i>	48	25,84 ^a	13,30 ^b	28,93 ^a	29,13 ^a	28,188*	0,0000	G6

* różnice istotne statystycznie na poziomie ufności $\alpha = 0,05$; ** p – prawdopodobieństwo hipotezy testowej; a, b, c – grupy jednorodne (średnie w grupie nie różnią się) (test HSD Tukey'a)

statistically significant differences at the confidence level $\alpha = 0.05$; ** p – probability of test hypothesis; a, b, c – uniform groups (mean values in a group do not differ) (HSD Tukey's test).

10 cm, w inkubatorze, w temperaturze 25°C, w ciemności, na pożywce SH. Obserwacje makroskopowe, tzn. pomiar wzrostu grzybni w stosunku do kalusa, zmiany fenotypowe kalusa i grzybni, prowadzono od dołu szalki Petriego co 24 godziny (w przypadku grzybów szybko rosnących) lub co 48 godzin (w przypadku grzybów wolniej rosnących) (tab. 1). Makro- i mikroskopowo oceniano zmiany w wyglądzie kalusa, które zostały uznane za wyznacznik jego reakcji obronnych.

Analiza statystyczna

W celu wykrycia inhibicji bądź stymulacji wzrostu izolatów grzybni porównano tempo wzrostu badanej grzybni w kulturze dwuorganizmowej (w kierunku kalusa i przeciwnie do niego) z tempem wzrostu grzybni kontrolnej, stosując test *t*-Studenta dla zmiennych zależnych. Różnice statystycznie istotne (przy prawdopodobieństwie $p = 0,05$) zostały wyszczególnione w rozdziale „Wyniki”.

Dla porównania wielkości promienia grzybni w kolejnych dniach obserwacji w przypadku wielu średnich (kontrola – G6, kontrola – G5, kontrola – G4) zastosowano nieparametryczną analizę wariancji ANOVA Friedmana. Metoda ta jest najlepszym odpowiednikiem jednoczynnikowej analizy wariancji dla pomiarów powtarzalnych.

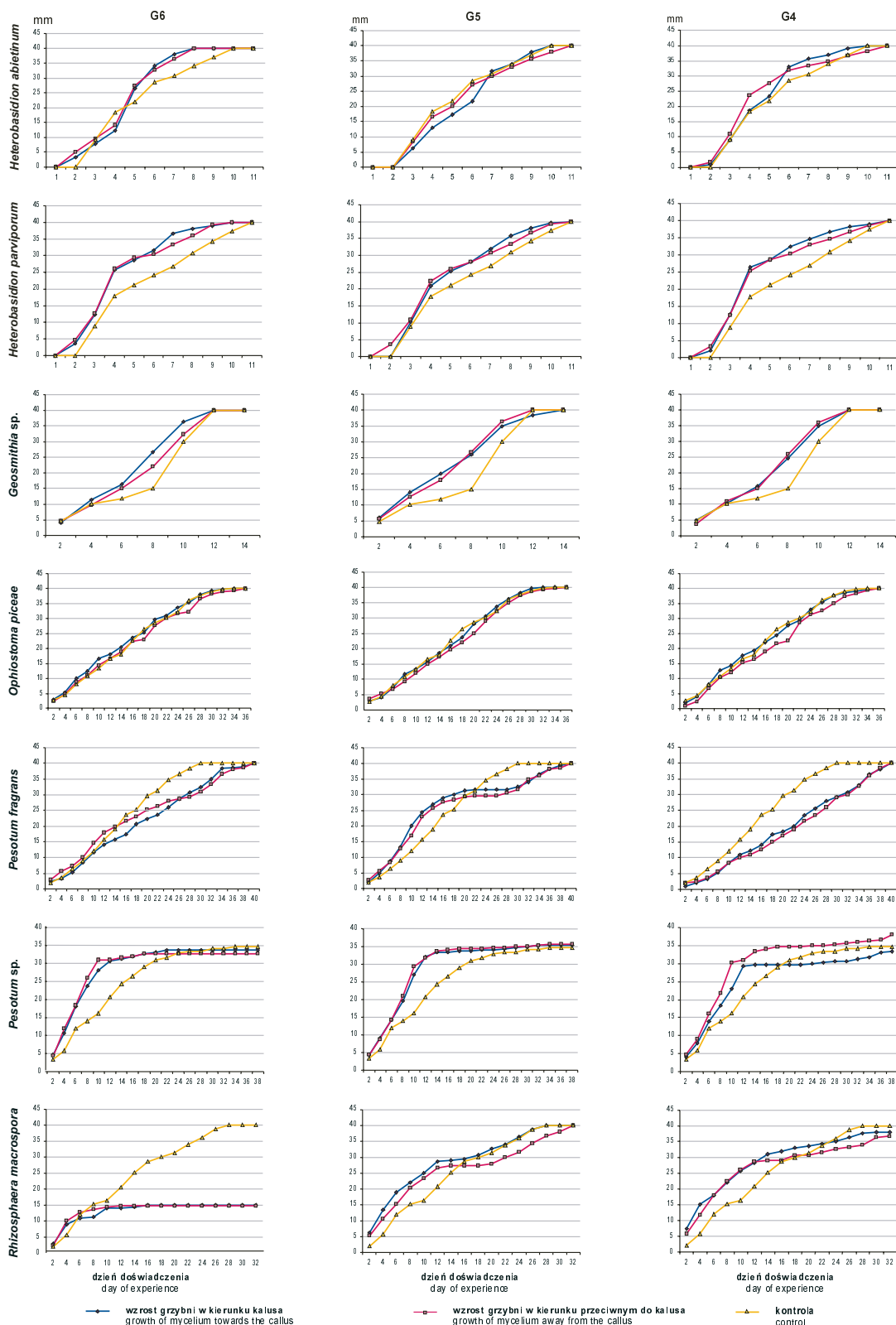
Ponadto wykonano test HSD Tukey'a, który wykazał, które genotypy różnią się, lub nie różnią, w stosunku do grzybni kontrolnej (tab. 1 – symbole a, b, c). W celu stwierdzenia, które genotypy kalusa hamowały wzrost grzybni, przeprowadzono test *t*-Studenta dla zmiennych połączonych (tab. 1).

Wszystkie analizy wykonano za pomocą programu komputerowego STATISTICA wersja 8.0.

3. Wyniki

W kulturach dwuorganizmowych badane grzyby miały różny wzrost w kierunku kalusa *A. alba* (ryc. 1). Kalus uzyskany z trzech genotypów jodły stymulował wzrost grzybni *H. parviporum*, *O. piceae* i *Pesotum* sp. Wśród nich tylko wzrost *H. parviporum* był istotnie stymulowany przez wszystkie genotypy jodły (tab. 1). Najbardziej na wzrost tego grzyba wpływały genotypy G4 i G6, zwłaszcza pomiędzy czwartym i ósmym dniem hodowli (ryc. 1). Dla *O. piceae* i *Pesotum* sp. wyraźny efekt stymulujący wywierały genotypy G6 i G5 (tab. 1). Genotypy te najsilniej stymulowały wzrost tych grzybów w piątym dniu po inokulacji (ryc. 1). Kalus otrzymany z genotypów G6 i G4 wykazał wyraźny negatywny wpływ na wzrost grzybni *P. fragrans*. Inhibicja wzrostu tego grzyba była najbardziej widoczna w 28 dniu po inokulacji (ryc. 1). Wzrost grzybni *H. abietinum* był istotnie ograniczany przez genotyp G5, natomiast inne genotypy nie miały żadnego wpływu na wzrost grzybni tego gatunku. Podobne wyniki uzyskano w przypadku grzyba *R. macrospora*, z tą tylko różnicą, że jego wzrost był inhibitowany przez genotyp G6. W przypadku *Geosmithia* sp. nie stwierdzono żadnego wpływu kalusa na wzrost grzybni (tab. 1).

Po 81 dniach hodowli kultur dwuorganizmowych z kalusem *A. alba* grzyby miały także różny wzrost w kierunku przeciwnym do kalusa. Wzrost grzybów w kierunku przeciwnym do kalusa na ogół był bardzo



Rycina 1. Wzrost grzybów w kierunku i przeciwnie do kalusa trzech genotypów *Abies alba* (w kombinacji kontrolnej badano wzrost grzybni bez obecności kalusa)

Figure 1. Growth of fungi towards and away from the callus of the three *Abies alba* genotypes (the control is fungus inoculated in dishes without callus)

Tabela 2. Czas zamarcia kalusa *Abies alba* w kulturach dwuorganizmowych oraz cechy fenotypowe takich kultur
 Table 2. Time of *Abies alba* callus dieback in dual cultures and phenotype features of such structures

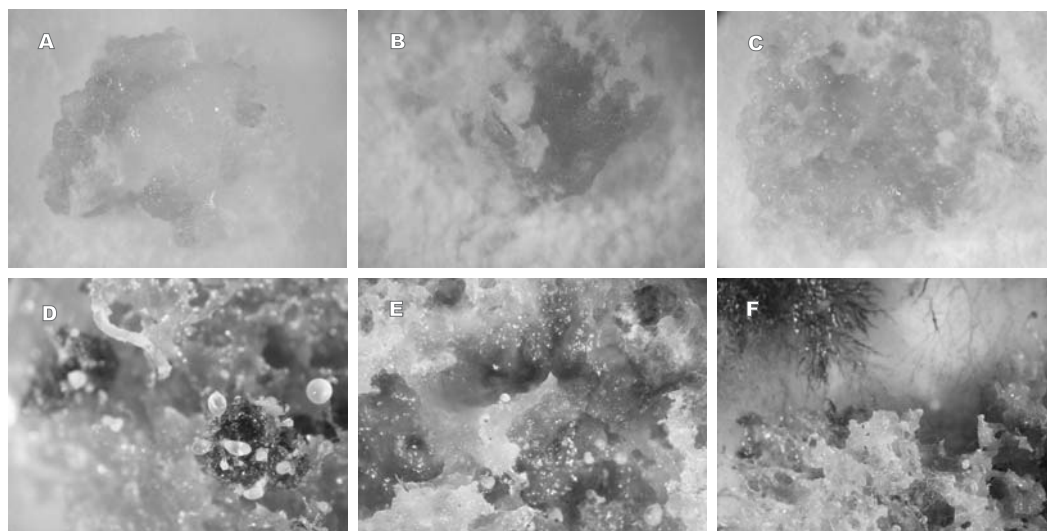
Gatunek grzyba Fungus species	Genotyp kalusa Callus genotype	Obumieranie kalusa (dni) Callus dying (days)	Cechy fenotypowe kultur dwuorganizmowych Phenotype features of biorganism structures
<i>Heterobasidion abietinum</i>	G6	16	Grzybnia szybko porasta kalus (wyjątek stanowi G5). Kalus długo utrzymuje dobrą żywotność i charakterystyczne białe zabarwienie. The mycelium quickly overgrows the callus (with the exception of G5). The callus keeps its good vitality and characteristic white colour for a long time.
	G5	27	
	G4	56	
<i>Heterobasidion parviporum</i>	G6	9	Kalus silnie ciemnieje i szybko obumiera, pomimo że strzępki grzyba porastają go w niewielkim stopniu. The callus becomes intensely dark and dies soon despite the fact that hyphae overgrow the callus only to a small degree.
	G5	6	
	G4	6	
<i>Geosmithia</i> sp.	G6	17	Grzybnia szybko rozrasta się, szybko kolonizuje kalus. Kalus ciemnieje (wyjątek stanowi G4). The mycelium expands quickly and soon colonizes the callus. The callus becomes dark (with the exception of G4).
	G5	17	
	G4	31	
<i>Ophiostoma piceae</i>	G6	33	Grzybnia ciemniejsza po stronie kalusa, wyraźnie zagęszczona. Tylko kalus G4 długo utrzymuje charakterystyczny biały kolor. The mycelium is darker on the side of the callus, and it is clearly thicker. Only the G4 callus genotype preserves its characteristic white colour for a long time.
	G5	35	
	G4	38	
<i>Pesotum fragrans</i>	G6	40	Grzybnia ciemniejsza od strony kalusa, gdzie strzępki grzybni zagęszczają się. Tylko kalus G4 utrzymuje charakterystyczne białe zabarwienie. The mycelium is darker on the side of the callus, where the hyphae become thicker. Only the G4 callus preserves its characteristic white colour.
	G5	36	
	G4	42	
<i>Pesotum</i> sp.	G6	68	Strzępki grzyba zbite. Od strony kalusa grzybnia hamuje wzrost i tworzy charakterystyczną łukowatą strefę inhibicyjną. Kalus ciemnieje od strony grzyba. The hyphae are compact. On the side of the callus the mycelium ceases to grow and forms a characteristic curved inhibitory zone. The callus becomes dark on the side of the fungus.
	G5	60	
	G4	81	
<i>Rhizosphaera macrospora</i>	G6	27	Zahamowany wzrost grzybni w odległości 10 mm od kalusa. Kalus ciemnieje. Strzępki grzyba nie porastają kalusa (G6). Grzybnia i kalus silnie uwodnione. Ceased growth of the mycelium at the distance of 10 mm from the callus. The callus becomes dark. The hyphae do not overgrow the callus (G6). The mycelium and the callus are intensely hydrated.
	G5	33	
	G4	35	

podobny do wzrostu grzybów w kierunku kalusa. Zależność ta nie odnosiła się jedynie do grzybni *Pesotum* sp. (genotyp G6) i *R. macrospora* (genotyp G5 i G6). W tych przypadkach wynik wielkości wzrostu przeciwny do kalusa odbiegał od wyniku wielkości wzrostu grzybni w kierunku kalusa (ryc. 1).

W prezentowanych badaniach, wszystkie gatunki grzybów skolonizowały kalus jodły i spowodowały jego zamieranie. Najszybciej kalus był kolonizowany przez grzyb *H. parviporum*, najwolniej zaś przez *Pesotum* sp. *Heterobasidion parviporum* spowodował zamarcie kalusa już po 6–9 dniach, a *Pesotum* sp. po 60–81 dniach od początku kolonizacji. W przypadku tych, jak i pozostałych gatunków grzybów tempo kolonizacji kalusa było różne w zależności od genotypu jodły. Grzyby *H. abietinum*, *O. piceae*, *R. macrospora* i *Geosmithia* sp. najszybciej kolonizowały kalus należący do genotypu G6. Grzyby te spowodowały zamarcie kalusa odpowied-

nio po 16, 33, 27 i 17 dniach. Grzyb rodzaju *Geosmithia* w podobnym tempie zasiedlał także kalus należący do genotypu G5. W przeciwieństwie do nich, gatunki *P. fragrans*, *Pesotum*, *Geosmithia* sp. i *H. parviporum* najszybciej kolonizowały kalus uzyskany z genotypu G5. Kalus poddany działaniu tych grzybów zamierał odpowiednio przez 36, 60 i 17 dni. *Heterobasidion parviporum* w podobnym tempie zasiedlał także kalus należący do genotypu G4 (tab. 2).

Wśród badanych grzybów jedynie *H. abietinum* nie spowodował zmian w wyglądzie kalusa trzech genotypów jodły (tab. 2, ryc. 2B). Podobne reakcje obserwowano także dla *O. piceae* i *P. fragrans* hodowanych w obecności kalusa uzyskanego z genotypu G4. Kalus inokulowany grzybem *H. parviporum* i *Geosmithia* sp. charakteryzował się bardzo szybkim brązowieniem, a w kulturach z grzybem *O. piceae* odnotowano jego punktowe zamieranie (tab. 2, ryc. 2A, C, D). Po 16 dniach od



Rycina 2. Reakcje obronne kalusa jodły w kulturach dwuorganizmowych, 25 dni po inkubacji. A) *Heterobasidion parviporum*, brązowy i zamarty kalus; B) *Heterobasidion abietinum*, “zdrowo” wyglądający kalus; C) *Geosmithia* sp., kalus bez zmian w wyglądzie; D) *Ophiostoma piceae*, widoczne punktowe przebarwienia i masowe wytwarzanie koremiów w obrębie nekrotycznych przebarwień; E) *Pesotum* sp., widoczne silne uwodnienie kalusa prowadzące do maceracji tkanek i brązowienia w miejscach tworzenia się koremiów; F) *Rhizosphaera macrospora*, widoczna inhibicja grzybni w pobliżu kalusa.

Figure 2. Defence reactions of developing silver fir embryos in dual cultures 25 days after incubation. A) *Heterobasidion parviporum*, brown and dead callus; B) *Heterobasidion abietinum*, healthy-look callus; C) *Geosmithia* sp., appearance of the callus without change; D) *Ophiostoma piceae*, visible spot discoloration and mass formation of synnemata within the range of necrotic changes of the callus; E) *Pesotum* sp., visible high hydration of the callus leading to tissue maceration and clear browning of the callus around the synnemata formed; F) *Rhizosphaera macrospora*, visible inhibition of mycelium growth near callus.

rozpoczęcia doświadczenia w pobliżu kalusa jodły grzybnia *Pesotum* sp. i *R. macrospora* tworzyła ciemne strefy inhibicyjne. Później grzyby te powodowały także silne uwodnienie i macerację tkanek kalusa (tab. 2, ryc. 2E, F).

4. Dyskusja

Do tej pory jedynie kilka prac poświęconych jest interakcjom pomiędzy grzybami i kalusem uzyskanym z drzew iglastych (Hřib, Rypáček 1978; Woodward, Pearce 1988; Ragaz 1995; Kvaalen, Solheim 2000; Kvaalen et al. 2001; Vookova et al. 2006). Wyniki uzyskane w tych badaniach są rozbieżne. Hřib i Rypáček (1978) oraz Kvaalen i Solheim (2000) wykazali wyraźny wpływ kalusa świerkowego na wzrost grzybni *H. annosum* (Fr.) Bref., szczególnie w początkowych fazach wzrostu grzybni. Podobne reakcje zostały zaobserwowane dla *Ceratocystis polonica* (Siemaszko) C. Moreau (Kvaalen et al. 2000) i *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat. (Vookova et al. 2006). Badania te pokazały, że silnie wirulentne patogeny lub grzyby, uznawane za pierwszych kolonizatorów bielu drzew, są w kulturach dwuorganizmowych stymulowane przez kalus, natomiast grzyby saprotroficzne lub grzyby, które są późniejszymi

kolonizatorami są inhibowane przez kalus (Hendry et al. 1993). Jednakże, w przeciwieństwie do tych badań, Sirrenberg i in. (1995) oraz Woodward i Pearce (1988) nie wykazali żadnego wpływu kalusa świerka na wzrost grzybni *H. annosum*.

W prezentowanych badaniach stwierdzono istotne różnice we wzroście siedmiu gatunków grzybów w obecności kalusa jodły pospolitej. Stymulacja wzrostu *H. parviporum* przez kalus oraz słaba inhibicja lub brak wpływu kalusa na wzrost *H. abietinum* dobrze koresponduje z ich funkcjonowaniem w warunkach naturalnych. *Heterobasidion parviporum* powoduje duże szkody w drzewostanach świerkowych na całym świecie, a *H. abietinum*, który występuje w środkowej Europie, Pirenejach i północno-wschodniej Turcji jest uważany za saprotrofa lub pasożyta słabości, żyjącego głównie na pniakach i martwych kłodach jodłowych (Munda 1994; Łakomy 1996; Dogmus-Lehtijarvi et al. 2007).

Niniejsze badania pokazały także, że w stosunku do jodły pospolitej *H. parviporum* może być bardziej wirulentny niż *H. abietinum*, pomimo że *A. alba* jest główną rośliną gospodarzem tego ostatniego gatunku grzyba. Jednakże obecne doświadczenia należy traktować jako pierwszy etap w badaniach nad patogennością grzybów *Heterobasidion* s. lato w stosunku do jodły pospolitej. Wydaje się, że jedynie badania *in vivo*

mogą w pełni określić stopień patogeniczności tych grzybów stosunku do jodły pospolitej.

W przeprowadzonym doświadczeniu, oprócz *H. parviporum*, także wzrost *Pesotum* sp. i *O. piceae* był stymulowany przez kalus jodłowy. Jednakże, w przeciwieństwie do *H. parviporum*, *Pesotum* sp. powodował o wiele wolniejsze zamieranie kalusa. Dodatkowo, obecność kalusa wywołała wyraźną reakcję grzybni tego gatunku grzyba, gdyż w kulturach dualnych pojawiała się wyraźna strefa inhibicyjna. Uzyskane rezultaty mogą wskazywać, że *Pesotum* sp. jest raczej patogenem słabości w odniesieniu do jodły. Podobne wyniki otrzymali Jankowiak i Kolařík (2010), którzy w doświadczeniu infekcyjnym użyli te same izolaty grzyba. W przypadku *O. piceae* stymulujący efekt kalusa na wzrost grzybni także znalazł odzwierciedlenie w doświadczeniach *in vivo*. *Ophiostoma piceae* jest uznawany za saprotrofa lub patogena słabości drzew rodzaju *Picea* i *Pinus* (Kirisits 2004).

W przypadku grzyba rodzaju *Geosmithia* jego wzrost – podobny w obecności i w braku kalusa – może sugerować bardzo mały wpływ kalusa na wzrost grzyba. Wyniki te są dobrze skorelowane z doświadczeniem infekcyjnym przeprowadzonym przez Jankowiaka i Kolaříka (2010). W eksperymencie tym nekrozy generowane na 2-letnich sadzonkach jodły przez ten sam izolat grzyba w niewielkim stopniu różniły się od nekroz powstałych na sadzonkach kontrolnych. W związku z tym autorzy ci uważają, że grzyb ten jest saprotrofem, który nie jest zdolny wywołać żadnych objawów chorobowych na jodle. Jednakże ostatnie badania nad grzybami rodzaju *Geosmithia* sugerują potencjalną patogeniczność tych grzybów na drzewach liściastych. Čížková i in. (2005) donoszą, że *Geosmithia langdonii* M. Kolařík, Kubátová i Pažoutová i *G. pallida* (G. Sm.) M. Kolařík, Kubátová i Pažoutová wyizolowane z żerowisk *Scolytus intricatus* (Ratz.) ograniczają wzrost korzeni *Lepidium sativum* L. var. *capitatum*. Z kolei Scala i in. (2005, 2007) udokumentowali, że niektóre szczepy grzybów z rodzaju *Geosmithia* uzyskane z zamierających wiązków we Włoszech mogą wytwarzać cerato-ulminy, które są odpowiedzialne za holenderską chorobę wiązków. Ostatnio wykryto także, że za groźną chorobę *Juglans nigra* L. w Ameryce Północnej może być odpowiedzialny nieopisany gatunek rodzaju *Geosmithia* przenoszony przez *Pityophthorus juglandis* Blackman (Tisserat et al. 2009).

Kalus jodły pospolitej był obojętny lub inhibował wzrost *R. macrospora*. Dodatkowo w kulturach dwuorganizmowych z tym gatunkiem zaobserwowano także bardzo silne ograniczenie wzrostu grzybni w pobliżu kalusa.

Badania nad wzrostem endofitów w obecności kalusa-gopodarza były podejmowane przez kilku badaczy

(Sieber et al. 1990; Hendry et al. 1993; Peters et al. 1998). Wyniki tych badań były dość rozbieżne. Peters i in. (1998) wskazują, że niektóre endofity, takie np. jak *Coniothyrium palmarum* Corda, *Geniculosporium* sp. i *Phomopsis* sp. były stymulowane przez kalus żywiciela, podczas gdy Hendry i in. (1993) zaobserwowali, że *Hypoxylon fragiforme* (Pers.) J. Kickx f. i *H. purpureum* Nitschke były ograniczane przez kalus. Doświadczenia Hendry'ego i in. potwierdzają specyficzne cechy biologiczne grzyba *R. macrospora* występujące w naturze. Gatunek ten w tkankach jodły występuje początkowo jako endofit, później zaś zasiedla tkanki zamierające (Sieber-Canavesi et Sieber 1993). Uzyskane *in vitro* wyniki znalazły potwierdzenie także w badaniach nad patogenicznością tego grzyba *in vivo* (Jankowiak, niepublikowane), w których ten sam izolat grzyba spowodował nekrozy na sadzonkach jodły podobne jak w przypadku kombinacji kontrolnej.

Podobnie jak *R. macrospora*, także wzrost grzybni *P. fragrans* był ograniczany przez kalus jodły, co może sugerować, że jest to gatunek saprotroficzny. Jednakże do tej pory nie wykonano żadnego doświadczenia infekcyjnego *in vivo* z użyciem tego grzyba.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono istotne różnice między wzrostem grzybów w kulturach z użyciem kalusa jodły różnych genotypów. Podobne wyniki uzyskali Kroon i in. (1991), Nyange i in. (1995), Spanos i Woodward (1997), Kvaalen i Solheim (2000), którzy wykorzystali w swych badaniach różne genotypy i klony drzew iglastych oraz innych roślin. Dzięki tej metodzie możliwe staje się identyfikowanie genotypów drzew odpornych i podatnych na grzyby patogeniczne.

5. Wnioski

1. Badane genotypy kalusa wpływają na zróżnicowanie wzrostu badanych gatunków grzybów.
2. Badania wzrostu grzybów w kierunku przeciwnym do kalusa *A. alba* wykazały, że wzrost ten był bardzo podobny do wzrostu grzybów w kierunku kalusa, z wyjątkiem grzybów *Pesotum* sp. i *R. macrospora*.
3. Kalus uzyskany z trzech genotypów jodły pospolitej stymulował wzrost grzybni silnie patogenicznego *H. parviporum* oraz mniej wirulentnych *O. piceae* i *Pesotum* sp.
4. Wszystkie gatunki grzybów skolonizowały i spowodowały zamieranie kalusa jodły. Spośród badanych grzybów jedynie *H. abietinum* nie spowodował zmian w wyglądzie kalusa trzech badanych genotypów jodły.
5. Dzięki metodzie badań patogeniczności na poziomie embrionalnym w kulturach dualnych *in vitro* staje się możliwe identyfikowanie genotypów drzew odpornych i podatnych na patogeny grzybowe.

Podziękowania

Autorzy pracy dziękują Panu Prof. dr hab. Tadeuszowi Kowalskiemu za udostępnienie szczepów grzybów z rodzaju *Heterobasidion* oraz wykonanie zdjęć mikroskopowych kalusa embriogennego jodły pospolitej i wszelką pomoc naukową przy realizacji niniejszych badań.

Literatura

- Abdul Rahman N.N., Diner A.M., Skilling D.D., Karnosky D.F. 1987. In vitro responses of conifer adventitious shoots and calli inoculated with *Gremmeniella abietina*. *Forest Science*, 33: 1047–1053.
- Čížková D., Šrůtka P., Kolařík M., Kubátová A., Pažoutová S. 2005. Assessing the pathogenic effect of *Fusarium*, *Geosmithia* and *Ophiostoma* fungi from broad-leaved trees. *Folia Microbiologica*, 50: 59–62.
- Dai Y., Vainio E., Hantula J., Niemelä T., Korhonen K. 2003. Investigations of *Heterobasidion annosum* s. lat. in central and eastern Asia with the aid of mating tests and DNA fingerprinting. *Forest Pathology*, 33: 269–286.
- Diner A.M., Mott R.L., Amerson H.V. 1984. Cultured cells of white pine show genetic resistance to axenic blister rust hyphae. *Science*, 224: 407–408.
- Dogmus-Lehtijarvi H.T., Lehtijarvi A., Korhonen K. 2007. *Heterobasidion* on *Abies nordmanniana* in north-eastern Turkey. *Forest Pathology*, 37(6): 387–390.
- Gretenkort M., Helsen J. 1993. Disease assessment of pea lines with resistance to foot rot pathogens: protocols for *in vitro* selection. *Plant Pathology*, 42: 676–685.
- Gupta P.K., Durzan D.J. 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology*, 5: 147–151.
- Hendry S., Boddy L., Lonsdale D. 1993. Interactions between callus cultures of European beech, indigenous ascomycetes and derived fungal extracts. *New Phytologist*, 123: 421–428.
- Hřib J., Rypáček V. 1978. The growth response of wood-destroying fungi to the presence of spruce callus. *Mycology*, 32: 55–60.
- Hřib J., Rypáček V. 1981. A simple callus test to determine the aggressiveness of wood-destroying fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 11: 270–274.
- Hřib J., Rypáček V. 1983. In vitro testing for the resistance of conifers to the fungus *Phaeolus schweinitzii* (Fr.) Pat. on callus cultures. *European Journal of Forest Pathology*, 13: 86–91.
- Hřib J., Vookova B., Salajová T., Bolvanský M., Flak P. 1995. Testing of embryogenic and non-embryogenic calli of European black pine (*Pinus nigra* Arn.) for defence reactions to the fungus *Phaeolus schweinitzii*. *Biologia*, Bratislava, 50/4: 403–410.
- Jankowiak R., Kolařík M. 2010. Fungi associated with the fir bark beetle *Cryphalus piceae* in Poland. *Forest Pathology*, 40: 133–144.
- Kirisits T. 2004. Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the ophiostomatoid fungi. w: Bark and wood boring insects in living trees in Europe. A Synthesis. (Eds Lieutier F., Day K.R., Battisti A., Grégoire J.C., Evans H.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 185–223.
- Kowalski T., Butin H. 1989. Die natürliche Astreinigung und ihre biologischen Voraussetzungen. IV. Die Pilzflora der Tanne (*Abies alba* Mill.). *Zeitschrift für Mykologie*, 55: 189–193.
- Kvaalen H., Christiansen E., Johnsen Ø., Solheim H. 2001. Is there a negative genetic correlation between initiation of embryogenic tissue and fungus susceptibility in Norway spruce? *Canadian Journal of Forest Research*, 31: 824–831.
- Kroon B.A.M., Scheffer R.J., Elgersma D.M. 1991. Interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and callus of susceptible and resistant tomato lines: fungal growth and phytoalexin accumulation. *Journal of Phytopathology*, 132: 57–64.
- Kvaalen H., Solheim H. 2000. Co-inoculation of *Ceratocystis polonica* and *Heterobasidion annosum* with callus of two Norway spruce clones with different *in vivo* susceptibility. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60: 221–228.
- Łakomy P., Kowalski T., Werner A. 2000. Preliminary report on distribution of *Heterobasidion annosum* intersterility group in Poland. *Acta Mycologica*, 35 (2): 303–309.
- Łakomy P. 1996. F group of *Heterobasidion annosum* found in Poland. *European Journal of Forest Pathology*, 26, 217–222.
- Mańka K. 2005. Fitopatologia Leśna, Warszawa, PWRiL.
- Munda A. 1994. Preliminary report on the distribution of *Heterobasidion annosum* intersterility groups in Slovenia. Proceed. Eighth IUFRO Conf. Root and Butt Rots (eds M. Johansson, J. Stenlid). Sweden/Finland, August 1993. Swedish Univ. Agric. Sci., Uppsala: 272–273.
- Nawrot-Chorabik K. 2008. Embryogenic callus induction and differentiation in silver fir (*Abies alba* Mill.) tissue culture. *Dendrobiology*, 59: 31–40.
- Nawrot-Chorabik K. 2009. Somaclonal variation in embryogenic cultures of silver fir (*Abies alba* Mill.). *Plant Biosystems*, 143: 377–385.
- Nyange N.E., Williamson B., McNicol R.J., Hackett C.A. 1995. In vitro screening of coffee genotypes for resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*). *Annals of Applied Biology*, 127: 251–261.
- Peters S., Draeger S., Aust H.J., Schulz B. 1998. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. *Mycologia*, 90: 360–367.
- Ragazzi A., Moricca S., Dellavalle I. 1995. Growth of axenic cultures of *Cronartium flaccidum* on callus tissue from *Pinus nigra* var. *laricio* and *Pinus sylvestris*. *European Journal of Forest Pathology*, 25: 31–37.
- Scala A., Comparini C., Carresi L., Tegli S. 2005. The gene encoding cerato-ulmin, an *Ophiostoma*-produced protein involved in the Dutch elm disease, has been introgressed or horizontally transferred in an unrelated species of the genus *Geosmithia*. *Journal of Plant Pathology*, 87: 305–306.

- Scala A., Comparini C., Tegli S., Scala F. 2007. A non-*Ophiostoma* fungus expresses the gene encoding the hydrophobin cerato-ulmin. *Journal of Plant Pathology*, 89: 233–240.
- Schenk R.U., Hildebrandt A.C. 1972. Medium and techniques for induction, and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50: 227–229.
- Sieber T. 1989. Endophytic fungi in twigs of healthy and diseased Norway spruce and white fir. *Mycological Research*, 92: 322–326.
- Sieber-Canavesi F., Sieber T.N. 1993. Successional patterns of fungal communities in needles of European silver fir (*Abies alba* Mill.). *New Phytologist*, 125: 149–161.
- Sieber T.N., Sieber-Canavesi F., Dorworth C.E. 1990. Simultaneous stimulation of endophytic *Cryptodiaporthe hystrix* and inhibition of *Acer macrophyllum* callus in dual culture. *Mycologia*, 82: 569–575.
- Sieber T.N. 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews*, 21: 75–89.
- Sirrenberg A., Salzer P., Hager A. 1995. Induction of mycorrhiza-like structures and defence reactions in dual cultures of spruce callus and ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 130: 149–156.
- Spanos K.A., Woodward S. 1997. Responses of *Cupressus* and *Chamaecyparis* callus tissues to inoculations with *Seridium cardinale*. *Forest Pathology*, 27:13–21.
- Tisserat N., Cranshaw W., Leatherman D., Utley C., Alexander K. 2009. Black walnut mortality in Colorado caused by the walnut twig beetle and thousand cankers disease. Online. Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2009-0811-01-RS.
- Vookova B., Hřib J., Kormutak A., Adamec V. 2006. Defence reactions of developing somatic embryos of Algerian fir (*Abies numidica*). *Forest Pathology*, 36: 215–224.
- Woodward S., Pearce B. 1988. Responses of Sitka spruce callus to challenge with wood decay fungi. *European Journal of Forest Pathology*, 18: 217–22.