

HANNA STĘPNIEWSKA

Przyczynek do badań nad wpływem *Hebeloma crustuliniforme* na występowanie zakaźnej zgorzeli siewek sosny zwyczajnej

Contribution to studies on the effect of *Hebeloma crustuliniforme* on damping-off of pine seedlings

ABSTRACT

Stępniewska H. 2009. Przyczynek do badań nad wpływem *Hebeloma crustuliniforme* na występowanie zakaźnej zgorzeli siewek sosny zwyczajnej. Sylwan 153 (3): 182-188.

The paper presents the results of the research on the effect of a biopreparate containing vegetative mycelium of *Hebeloma crustuliniforme* on the pathogenicity of *Fusarium oxysporum*, *Pythium* sp. and *Rhizoctonia solani* causing the damping-off of pine seedlings and on the growth of the pathogens under *in vitro* conditions. The obtained results do not clearly indicate the positive impact of *H. crustuliniforme* on seedling health.

KEY WORDS

Scots pine, seedlings, damping-off, biopreparate, pathogenicity, antagonism, *in vitro*

ADDRESSES

Hanna Stępniewska – e-mail: rlstepni@cyf-kr.edu.pl

Katedra Fitopatologii Leśnej; Uniwersytet Rolniczy; Al. 29 Listopada 46; 31-425 Kraków

Wstęp

Zakaźna zgorzel siewek jest jedną z najważniejszych pod względem gospodarczym chorób występujących w szkółkach leśnych. Powodowana przez kompleks patogenów glebowych jest trudna do wyeliminowania, ponieważ sprawcy choroby są związani ze środowiskiem glebowym w sposób trwały. Można jednak, poprzez różne zabiegi, np. nawożenie organiczne czy zmianowanie, wpływać na wielkość populacji samych patogenów. Zabiegiem takim mogłoby być także celowe wprowadzenie do gleby inokulum grzyba ektomikoryzowego w procesie sterowanej mikoryzacji. Poprzez różne oddziaływania biochemiczne, wpływ na kształt zbiorowisk mikroorganizmów ryzosferowych czy samą obecność mufki grzybniowej, grzyby mikoryzowe mogą ograniczać rozwój patogenów w strefie korzeni siewek [Rudawska 2000].

Od kilku lat w szkółkach leśnych w Polsce stosowany jest biopreparat oparty na grzybie *Hebeloma crustuliniforme*. Jego wpływ na przebieg zakaźnej zgorzeli siewek i rozwój sprawców tej choroby nie jest znany. Z tego względu podjęto niniejsze, wstępne badania. Przeprowadzono je w warunkach laboratoryjnych na trzech wybranych szczepach patogenów. Celem pracy było określenie nasilenia choroby na siewkach sosny w obecności biopreparatu oraz zbadanie antagonizmu *H. crustuliniforme* i patogenów w warunkach *in vitro*.

Metodyka

BADANIE NASILENIA ZAKAŻNEJ ZGORZELI SIEWEK. Doświadczenie infekcyjne przeprowadzono na podłożu, którego głównym składnikiem była gleba piaszczysto-gliniasta (pH w H₂O 5,6)

pochodząca ze szkółki leśnej, wysterylizowana w autoklawie. Do gleby tej dodano: biopreparat z *H. crustuliniforme* udostępniony przez prof. dr. hab. Stefana Kowalskiego (Katedra Fitopatologii Leśnej Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie) w dawce 20% (v/v) [Kowalski 2007] oraz inokulum patogenów w dawce 5%, 10% lub 15% (v/v). Do badań wybrano trzy szczepy patogenów wyodrębnione z siewek sosny zwyczajnej z objawami zakaźnej zgorzeli pobranych ze szkółki leśnej: *Fusarium oxysporum*, *Pythium* sp. i *Rhizoctonia solani*. Inokulum przygotowano na podłożu zawierającym wermikulit, ziarno prosa i sok warzywno-owocowy [Jung i in. 2002; Matheron, Mircetich 1985].

Doświadczenie objęło następujące kombinacje: [Ktr 0]-kontrola bezwzględna (gleba); [Ktr H.c.]-kontrola względna (gleba + biopreparat); [P..]-gleba z inokulum patogenu: *F. oxysporum* [P.F.o.], *Pythium* sp. [P.P.], *R. solani* [P.R.s.] w dawce 5%, 10% lub 15%; [P...+H.c.]-gleba z inokulum patogenu w dawce 5%, 10% lub 15% z dodatkiem biopreparatu.

Do wypełnionych podłożem plastikowych doniczek wysiano po 20 nasion sosny zwyczajnej wysterylizowanych w nadtlenu wodoru [Neal i in. 1967] i podkiełkowanych. Doświadczenie prowadzono w komorze fitotronowej (fotoperiod 16 h, temperatura dnia/nocy 25°/15°C) przez 6 tygodni. Po tym czasie przeliczono zdrowe siewki i określono wskaźnik ich przeżywalności jako stosunek procentowy liczby zdrowych siewek do liczby wysianych nasion. Wyniki poddano analizie statystycznej w programie Statistica 8.0.

BADANIE ANTAGONIZMU *H. CRUSTULIFORME* ORAZ *F. OXYSPORUM*, *PYTHIUM* SP. I *R. SOLANI* W WARUNKACH *IN VITRO*. Doświadczenie przeprowadzono na zmodyfikowanej pożywce Melina-Norkransa (MMN) w płytkach Petriego [Marx 1969]. Użyto krążków grzybni wyciętych z brzegowej części kultur rosnących na pożywce MMN. Po 14 dniach od wyłożenia krążków *H. crustuliniforme*, w odległości 2 cm od kolonii tego grzyba umieszczono krążki grzybni *F. oxysporum*, *Pythium* sp. lub *R. solani*. Hodowle inkubowano w termostacie w temperaturze +20°C. Po 7 dniach oceniono występowanie strefy inhibicji (zahamowania wzrostu) między koloniami [Marx 1969].

Wyniki

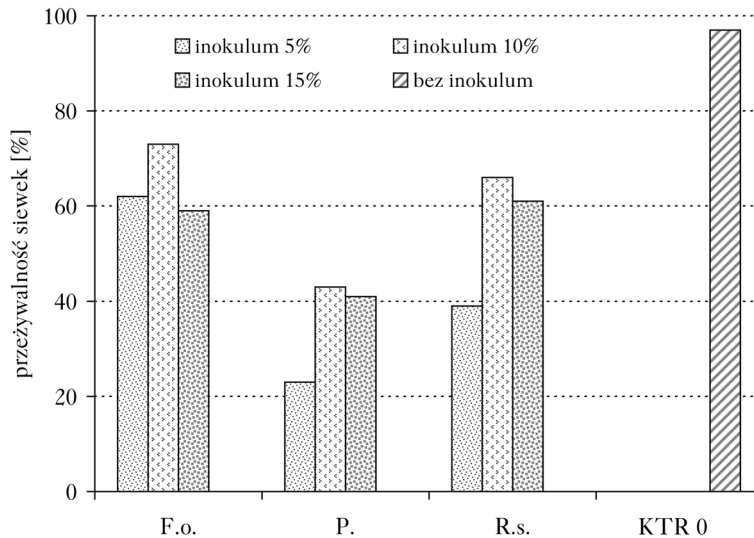
Przeżywalność siewek w kombinacjach doświadczalnych, w których do podłoża wprowadzono inokulum *F. oxysporum*, *R. solani* lub *Pythium* sp. kształtowała się, w zależności od dawki inokulum na poziomie, odpowiednio 59-73%, 39-66% i 23-43% (ryc. 1). Główną przyczyną tak znacznej redukcji liczby siewek była zgorzel przedwzrostowa. *F. oxysporum* i *R. solani* okazały się słabiej wirulentne niż *Pythium* sp.

Obecność w podłożu biopreparatu z *H. crustuliniforme* nie wpłynęła istotnie statystycznie (test różnicy między dwoma wskaźnikami struktury) na przeżywalność siewek. Jednak w kombinacji z *R. solani*, niezależnie od wielkości dawki inokulum tego patogenu, w obecności biopreparatu przeżywalność była wyższa niż przy braku biopreparatu (ryc. 2). W kombinacji z *F. oxysporum* obecność biopreparatu poprawiła przeżywalność siewek tylko przy 5% dawce inokulum patogenu (ryc. 3), zaś w kombinacji z *Pythium* sp. – przy 5% i 15% dawce (ryc. 4).

W hodowlach dwuorganizmowych nie obserwowano strefy inhibicji (zahamowania wzrostu) między koloniami *H. crustuliniforme* oraz *F. oxysporum*, *Pythium* sp. lub *R. solani* (ryc. 5). Wskazuje to na brak zdolności badanego szczepu *H. crustuliniforme* do wytwarzania substancji o działaniu antybiotycznym wobec testowanych patogenów.

Dyskusja

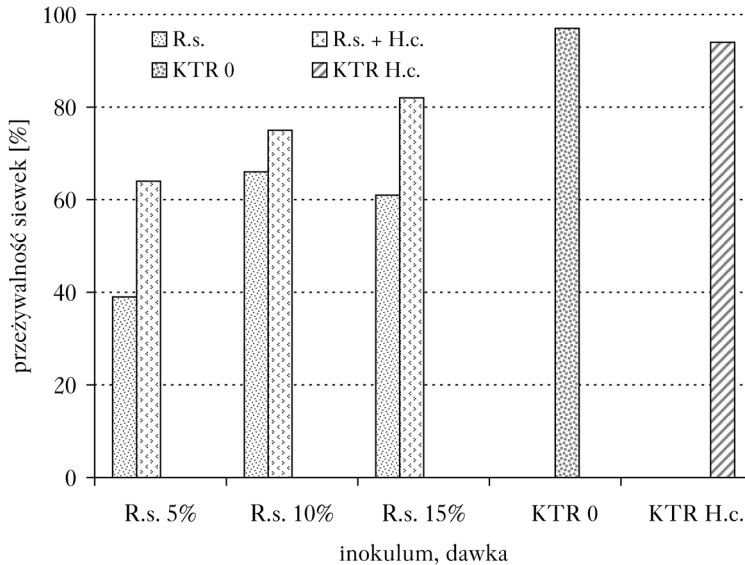
Wyniki badań opisanych w niniejszej pracy nie dają podstaw do jednoznacznego stwierdzenia o korzystnym wpływie *H. crustuliniforme* na stan zdrowotny siewek sosny. Podobne wnioski sfor-



Ryc. 1.

Przeżywalność siewek w kombinacjach doświadczalnych, w których do podłoża dodano inokulum *F.oxysporum* [F.o.], *Pythium* sp. [P.] lub *R.solani* [R.s.] oraz w kombinacji kontrolnej [KTR 0, kontrola bezwzględna, bez inokulum]

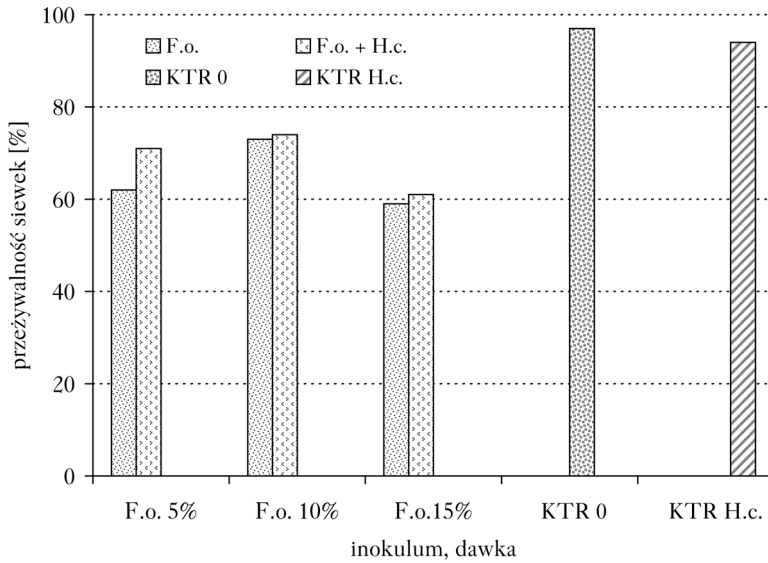
Survival of seedlings in the experimental combinations in which *F. oxysporum* [F.o.], *Pythium* sp. [P.] or *R. solani* [R.s.] inoculum was applied to the substrate and in the control combination [KTR 0, positive control, without inoculum]



Ryc. 2.

Przeżywalność siewek w kombinacjach doświadczalnych, w których do podłoża wprowadzono inokulum *R.solani* [R.s.] w dawce 5%, 10% lub 15% i biopreparat z *Hebeloma crustuliniforme* [H.c.] lub bez biopreparatu oraz w kombinacjach kontrolnych, kontrola bezwzględna [KTR 0], kontrola względna [KTR H.c.]

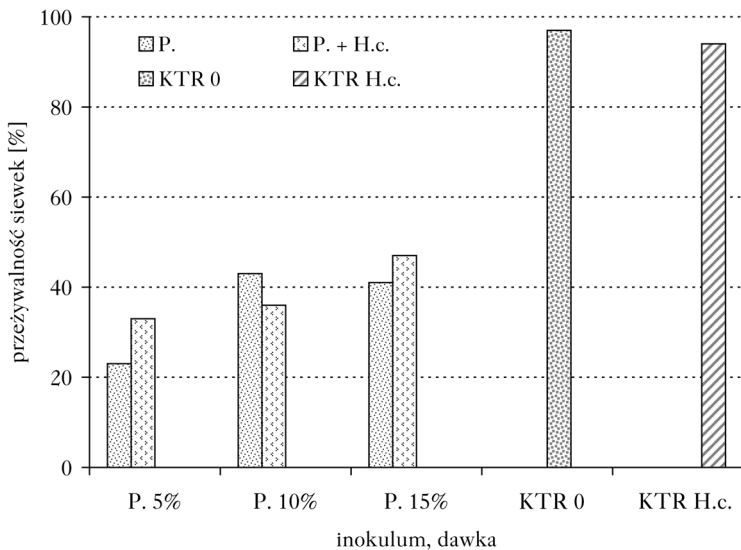
Survival of seedlings in the experimental combinations in which *R. solani* [R.s.] inoculum at a rate 5%, 10% or 15% with *Hebeloma crustuliniforme* biopreparate [H.c.] or without the biopreparate was applied to the substrate, as well as in control combinations, positive control [KTR 0], negative control [KTR H.c.]



Ryc. 3.

Przeżywalność siewek w kombinacjach doświadczalnych, w których do podłoża wprowadzono inokulum *Foxysporum* [F.o.] w dawce 5%, 10% lub 15% i biopreparat z *Hebeloma crustuliniforme* [H.c.] lub bez biopreparatu oraz w kombinacjach kontrolnych, kontrola bezwzględna [KTR 0], kontrola względna [KTR H.c.]

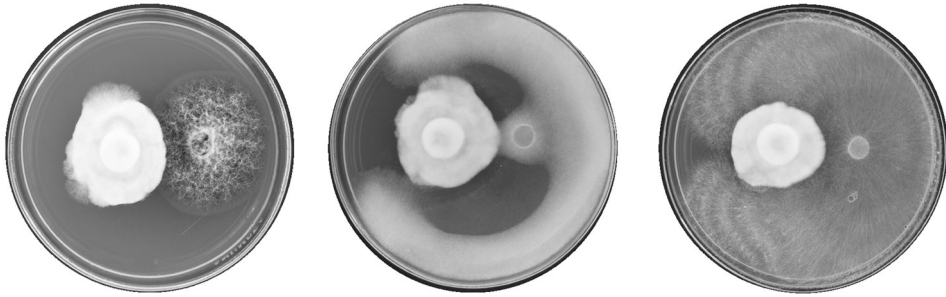
Survival of seedlings in the experimental combinations in which *Foxysporum* [F.o.] inoculum at a rate 5%, 10% or 15% with *Hebeloma crustuliniforme* biopreparate [H.c.] or without the biopreparate was applied to the substrate, as well as in control combinations, positive control [KTR 0], negative control [KTR H.c.]



Ryc. 4.

Przeżywalność siewek w kombinacjach doświadczalnych, w których do podłoża wprowadzono inokulum *Pythium* sp. [P.] w dawce 5%, 10% lub 15% i biopreparat z *Hebeloma crustuliniforme* [H.c.] lub bez biopreparatu oraz w kombinacjach kontrolnych, kontrola bezwzględna [KTR 0], kontrola względna [KTR H.c.]

Survival of seedlings in the experimental combinations in which *Pythium* sp. [P.] inoculum at a rate 5%, 10% or 15% with *Hebeloma crustuliniforme* biopreparate [H.c.] or without the biopreparate was applied to the substrate, as well as in control combinations, positive control [KTR 0], negative control [KTR H.c.]



Ryc. 5.

Efekt wzajemnego oddziaływania *Hebeloma crustuliniforme* i patogenów w hodowlach dwuorganizmowych (od lewej: *H. crustuliniforme* + *F. oxysporum*, *H. crustuliniforme* + *Pythium* sp., *H. crustuliniforme* + *R. solani*)
 Effect of the *Hebeloma crustuliniforme* – pathogen interaction in two-organism cultures (from the left: *H. crustuliniforme* + *F. oxysporum*, *H. crustuliniforme* + *Pythium* sp., *H. crustuliniforme* + *R. solani*)

mułowali Annesi i Motta [1998] w rezultacie badań nad siewkami świerka mikoryzowanymi niezidentyfikowanym do gatunku szczepem *Hebeloma* sp. z sekcji *Denudata* Fr. (Sacc.), podsekcji *Crustuliniformia* Quadr. U siewek hodowanych w glebie ze szkółki leśnej, naturalnie zainfekowanej przez *Pythium* spp., *Fusarium* spp. i *R. solani*, nie zaobserwowano różnic w liczbie obumarłych korzeni krótkich w obecności inokulum *Hebeloma* sp. w porównaniu z kombinacją kontrolną (bez *Hebeloma* sp.). Według autorów przyczyną mógł być młody wiek siewek, u których nie było jeszcze w pełni wykształconych mikoryz. W takich warunkach ochronny wpływ komponenta mikoryzowego na korzenie siewek przejawiać się może poprzez oddziaływanie substancji wydzielanych przez grzybnię, jeżeli wykazują one działanie antagonistyczne wobec patogenu. Teza ta znajduje zastosowanie także w niniejszych badaniach. U kilkutygodniowych siewek sosny zaczynają dopiero formować się korzenie krótkie, które z czasem mogą przekształcić się w mikoryzy, zatem ochronny wpływ *H. crustuliniforme* mógł przejawiać się tylko poprzez biochemiczne oddziaływanie grzybni obecnej w podłożu. Bezpośrednim wpływem grzybni *H. crustuliniforme* na *Pythium ultimum* tłumaczą Perrin i Garbaye [1983] zmniejszenie zasiedlenia podłoża przez tego patogena w trakcie hodowli w nim siewek buka inokulowanych *H. crustuliniforme*. Z kolei Chakravarty i Unestam [1987] wykazali lepszy stan zdrowotny siewek sosny (*Pinus sylvestris* L.) hodowanych w podłożu zawierającym inokulum *R. solani* i *F. moniliforme* oraz grzybnię *H. crustuliniforme* w ciągu pierwszych 3 miesięcy życia siewek, nawet przed uformowaniem się mikoryz. Nie wynikało to jednak z antagonistycznego działania *H. crustuliniforme* na patogeny, ponieważ w testach *in vitro* autorzy nie obserwowali takich oddziaływań.

Wytwarzanie antybiotyków jest jednym z mechanizmów ograniczania patogenów przez mikoryzy. Zdolność taką wykazano u wielu grzybów ektomikoryzowych w warunkach *in vitro*. Wskazuje na nią obecność strefy inhibicji (zahamowania wzrostu) między koloniami komponenta mikoryzowego i patogenu w hodowlach dwuorganizmowych [Marx 1969]. W badaniach opisanych w niniejszej pracy szczep *H. crustuliniforme* nie wykazywał takich uzdolnień wobec *F. oxysporum*, *Pythium* sp. lub *R. solani*. Brak takich właściwości *H. crustuliniforme* wobec *F. oxysporum* wykazali także Chakravarty i Hwang [1991]. Jednak nie musi to być jednoznaczne z brakiem zdolności danego komponenta mikoryzowego do ochrony korzeni siewek przed patogenami. W niniejszych badaniach, w doświadczeniu infekcyjnym przeżywalność siewek w kombinacji z *R. solani* w obecności *H. crustuliniforme* była wyraźnie wyższa niż przy braku tego grzyba. Może to wynikać z wytwarzania substancji grzybobójczych przez grzyb ektomikoryzowy, stymu-

lowanego przez wydzieliny korzeniowe siewek [Duchesne i in. 1988]. Możliwe jednak, że był to skutek działania *H. crustuliniforme*, pod wpływem którego w korzeniach siewek doszło do syntezy substancji antagonistycznych wobec *R. solani*. Korzenie objęte symbiozą mikoryzową wydzielają kilkakrotnie więcej substancji o charakterze fungistatycznym (terpenów i związków fenolowych) niż korzenie autotroficzne [Krupa, Fries 1971], a mechanizm ten może być aktywowany w korzeniach w obecności grzybni symbionta mikoryzowego jeszcze przed wykształceniem się mikoryz [Stack, Sinclair 1975].

Chakravarty i Unestam [1986] wykazali jednak, że wydzieliny korzeniowe siewek *P. sylvestris* inokulowanych *H. crustuliniforme* zawierały niewielkie ilości fenoli i nie wykazywały efektu antagonistycznego wobec *Fusarium* i *Rhizoctonia*. Z kolei, w obecności wydzielin korzeniowych siewek inokulowanych *Laccaria laccata* lub *Pisolithus tinctorius* efekt taki obserwowano, a poziom fenoli był znacznie wyższy niż u siewek inokulowanych *H. crustuliniforme*. Ten właśnie mechanizm autorzy uznali za najlepiej tłumaczący efekt ochronny ektomikoryz przed grzybami zgorzelowymi.

Hebeloma crustuliniforme wydaje się być grzybem w mniejszym stopniu zdolnym do ochrony korzeni siewek przed infekcją przez patogeny glebowe niż inne grzyby ektomikoryzowe takie, jak *L. laccata* czy *P. tinctorius*. Może to jednak wynikać ze zróżnicowanych właściwości szczepów zarówno *H. crustuliniforme*, jak i patogenów, badanych przez różnych autorów. Szczep *H. crustuliniforme* badany w niniejszej pracy wykazuje takie zdolności ochronne, zwłaszcza w stosunku do *R. solani*. Wskazane byłoby kontynuowanie prac w tym zakresie z użyciem większej liczby szczepów sprawców zakaźnej zgorzeli siewek. Niezbędne jest także przeprowadzenie badań biochemicznych *H. crustuliniforme* w aspekcie wzajemnych oddziaływań tego grzyba i rośliny-gospodarza.

Literatura

- Annes T., Motta E. 1998. *Hebeloma* inoculation on Norway spruce seedlings in solarized and infested soil. Eur. J. For. Path. 28: 159-166.
- Chakravarty P., Hwang S. F. 1991. Effect of an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*, on *Fusarium* damping-off in *Pinus banksiana* seedlings. Eur. J. For. Path. 21: 97-106.
- Chakravarty P., Unestam T. 1986. Role of mycorrhizal fungi in protecting damping-off of *Pinus sylvestris* L. seedlings. In: Mycorrhizae: physiology and genetics. Ist ESM, Dijon, 1-5 July 1985. INRA, Paris, 1986: 811-814.
- Chakravarty P., Unestam T. 1987. Differential influence of ectomycorrhizae on plant growth and disease resistance in *Pinus sylvestris* seedlings. J. Phytopath. 120 (2): 104-120.
- Duchesne L. C., Peterson R. L., Ellis B. E. 1988. Pine root exudate stimulates the synthesis of antifungal compounds by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. New Phytol. 108: 471-476.
- Jung T., Hansen E. M., Winton L., Oswald W., Delatour C. 2002. Three new species of *Phytophthora* from European oak forests. Mycol. Res. 106 (4): 397-411.
- Kowalski S. 2007. Charakterystyka ilościowa i jakościowa mikoryz sadzonek sosny zwyczajnej, poddanej i niepoddanej zabiegowi sterowanej mikoryzacji grzybem *Hebeloma crustuliniforme*. W: Kowalski S. (red.). Ektomikoryzy. Nowe biotechnologie w polskim szkółkarstwie leśnym. Centrum Informacyjne Lasów Państwowych: 276-287.
- Krupa S., Fries N. 1971. Studies on ectomycorrhizae of pine. I. Production of volatile organic compounds. Can. J. Bot. 49: 1425-1431.
- Marx D. H. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59: 153-163.
- Matheron M. E., Mircetich S. M. 1985. Pathogenicity and relative virulence of *Phytophthora* spp. from walnut and other plants to rootstocks of English walnut trees. Phytopathology 75: 977-981.
- Neal J. L. Jr., Trappe J. M., Lu K. C., Bollen W. B. 1967. Sterilization of red alder seedcoast with hydrogen peroxide. For. Sci. 13, 1: 104-105.
- Perrin R., Garbaye J. 1983. Influence of ectomycorrhizae on infectivity of *Pythium*-infested soils and substrates. Plant and Soil 71 (1-3): 345-351.
- Rudawska M. 2000. Rola ektomikoryz w biologicznej ochronie drzew leśnych przed patogenami glebowymi. Sylwan 144 (4): 27-39.

Stack R. W., Sinclair W. A. 1975. Protection of Douglas-fir seedlings against *Fusarium* root rot by a mycorrhizal fungus in the absence of mycorrhiza formation. *Phytopathology* 65: 468-472.

SUMMARY

Contribution to studies on the effect of *Hebeloma crustuliniforme* on damping-off of pine seedlings

Many studies concerning the effect of ectomycorrhizal fungi on root pathogens of tree seedlings show that ectomycorrhizal fungi through different types of impacts can have a limiting effect on pathogens growth, thus improving seedling health condition. Application of an ectomycorrhizal fungal inoculum to the soil in the controlled mycorrhization process seems to be one of the forms of biological protection of seedlings against soil pathogens. The aim of the paper was to determine the intensity of damping-off of pine seedlings caused by *F. oxysporum*, *Pythium* sp. and *R. solani* in the presence of a biopreparate containing *Hebeloma crustuliniforme*. Moreover, interactions between *H. crustuliniforme* and the pathogens in *in vitro* tests were investigated.

The intensity of damping-off disease in pine seedlings was tested in a pot experiment on a medium containing forest nursery soil (sterilised), biopreparate with *H. crustuliniforme* at a rate 20% (v/v) and pathogen inoculum at a rate of 5%, 10% or 15% (v/v). After six weeks of the experiment in the phytotron chamber (photoperiod 16 hours, day/night temperature 25°C/15°C) the survival index was determined as a percentage ratio of the number of healthy seedlings to sown seeds. The interaction between *H. crustuliniforme* and the pathogens under *in vitro* conditions was analysed in two-organism tests on Melin-Norkrans medium.

The presence of *H. crustuliniforme* in the substrate had no impact on seedling survival at the statistical significance level. However, when combined with the fungus *R. solani*, the survival of seedlings was higher in the presence of the biopreparate than its absence irrespective of the rate of pathogen inoculum. In combination with the fungus *F. oxysporum* the survival rate of seedlings in the presence of the biopreparate was higher only at a pathogen inoculum rate of 5%, while in combination with *Pythium* sp. – at a rate of 5% and 15%. No inhibition zone between the *H. crustuliniforme* colony and *F. oxysporum*, *Pythium* sp. or *R. solani* colonies was observed. It may suggest an inability of *H. crustuliniforme* to produce compounds antagonistic to the pathogens. However, such ability in the presence of root excretions of pine seedling cannot be precluded, which can explain a better survival rate of seedlings in the presence of *H. crustuliniforme* in some combinations tested in the experiment.

The obtained results suggest that the application of the *H. crustuliniforme*-based biopreparate to the substrate can modify the intensity of damping-off, especially with *R. solani*, as a causal agent. It is recommended that the studies in this field using a higher number of pathogen strains be continued. Also, biochemical tests of *H. crustuliniforme* should be carried out to find interactions between this fungus and the host plant.