

DARIUSZ PIASECKI

Wpływ wodnych wyciągów z roślin na wzrost grzybni *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.

The Impact of Water Extracts from Plants on the *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Mycelium Growth

Korzeniowiec wieloletni – *Heterobasidion annosum* (Fr.) Brefeld jest sprawcą huby korzeni – jednej z najważniejszych chorób drzew leśnych.

Jako najbardziej typowy przypadek rozwoju grzyba uważa się sytuację, gdy zarodnik wraz z kroplą wody trafia na powierzchnię świeżego pniaka (3). Duża powierzchnia rany jaką stanowi pniak oraz występowanie okresu dużej podatności na infekcję sprawia, że jest to najczęściej spotykany sposób infekcji pierwotnej.

Duże szanse rozwoju mają zarodniki, które kiełkują na fragmentach i resztkach drewna w ściółce lub w próchnicy. Znajdujące się w ściółce lub próchnicy szczątki martwych gałązek lub korzeni stanowią dogodną bazę pokarmową dla rozwijającej się grzybni (6, 1).

Zarodniki grzyba mogą być wmywane wraz z wodą opadową w głąb gleby, gdzie mogą rozwijać się na obumarłych korzeniach lub infekować zdrowe korzenie w miejscu ich uszkodzenia.

Innym sposobem rozprzestrzeniania się grzyba jest infekcja za pomocą grzybni, zwana infekcją wtórną. Polega ona na przechodzeniu grzybni z chorego korzenia do sąsiedniego zdrowego korzenia. Po długim saprofitycznym rozwoju grzybni w pniaku lub na resztkach drzewnych ściółki i próchnicy grzybnia może również rozwijać się w próchnicy lub glebie i infekować znajdujące się w pobliżu, zdrowe korzenie (8).

Proces chorobowy jest jednym z aspektów fenotypu rośliny, który zależy od genotypu gospodarza, środowiska zewnętrznego i czasu (4). Na ogólny termin "środowisko zewnętrzne" składa się wiele czynników. Jednym z takich czynników mogą być substancje chemiczne mające swoje źródło w roślinach, niekoniecznie będących potencjalnym gospodarzem dla określonego patogena.

Źródłem związków allelopatycznych mogą być wszystkie organy rośliny, zarówno wegetatywne jak i generatywne. Substancje allelopatyczne mogą być wydzielane przez żywe

rośliny, bądź powstawać w wyniku rozkładu obumarłych organów lub całych roślin (2). Największe znaczenie allelopatyczne przypisuje się substancjom, których źródłem są wegetatywne organy roślin. Najbogatszym ich źródłem są liście roślin. Wydzielone na powierzchnię rośliny substancje chemiczne są następnie zmywane przez deszcz lub rosę do gleby. Z tego względu badania nad allelopatią najczęściej prowadzone są z wykorzystaniem wyciągów wodnych, które mają imitować działanie rosy i deszczu.

Celem badań było określenie charakteru i stopnia oddziaływania wodnych wyciągów z roślin runa borowych drzewostanów sosnowych rosnących na gruntach porolnych na wzrost grzybni *Heterobasidion annosum*.

W przeprowadzonych pracach laboratoryjnych przetestowane zostały wszystkie gatunki roślin występujących w drzewostanach sosnowych rosnących na gruntach porolnych (7). Testowane były wodne wyciągi sporządzane oddzielnie z nadziemnych i podziemnych części roślin. W przypadku roślin zielnych do sporządzania wyciągów wykorzystywane były całe pędy, zaś w przypadku roślin drzewiastych pobierane były liście. Części podziemne wykorzystywane do sporządzania wyciągów stanowiły, w zależności od gatunku, korzenie, rozłogi wraz z korzeniami lub kłącza wraz z korzeniami. Do sporządzania wyciągów używane były świeże rośliny oraz woda, jedyny rozpuszczalnik dostępny w warunkach naturalnych.

Świeże, nie myte rośliny były rozdrabniane nożem na fragmenty wielkości ok 3–4 mm, a następnie, po dodaniu wody destylowanej, gotowane przez 5 minut, co pozwoliło na wyekstrahowanie większej ilości substancji allelopatycznych. Sporządzony wyciąg, po ostudzeniu, był przesączany przez sączek filtracyjny (Filtrak – Niemcy) i wykorzystywany do sporządzenia pożywki agarowo-brzeczkowej, o składzie: 75 ml testowany wyciąg wodny, 25 ml brzeczka piwna, niechmielona (Browar Chełm), 4 g agar (Difco). Pożywka była sterylizowana w autoklawie przez 30 minut, a następnie rozlewana do dziesięciu płytek Petriego o średnicy 7 cm. Na przygotowanej w ten sposób pożywce szczepiona była czysta kultura *H. annosum* pochodząca z kolekcji kultur Zakładu Fitopatologii Leśnej SGGW w Warszawie (kultura nr 6, wyizolowana z korzenia sosny zwyczajnej przy owocniku). Płytki Petriego umieszczane były w termostacie, w ciemności, w warunkach optymalnych dla wzrostu grzyba (temp. 25°C, 2°C, wilg. wzgl. 80%, 5%). Po pięciu dobach od daty szczepienia wykonywany był pomiar wielkości wyhodowanej grzybni. Wielkość grzybni hodowanej na pożywkach z dodatkiem wyciągów z poszczególnych roślin porównywana była z hodowlą kontrolną. Stanowiła ją grzybnia hodowana na pożywce przy sporządzaniu której wodny wyciąg zastąpiono 75 ml destylowanej wody.

W każdym wariancie testu grzybnia szczepiona była na dziesięciu płytkach Petriego. Wielkość wyhodowanej grzybni mierzona była w dwóch kierunkach "na krzyż" z dokładnością do 1 mm. Na podstawie wyników pomiaru obliczano stopień inhibicji wzrostu grzybni według następującego wzoru:

$$i_x = \frac{k - a_x}{k} 100\%$$

gdzie:

i_x — stopień inhibicji wzrostu grzybni na x -owej płytce Petriego ($x = 1, \dots, 10$),

- k — średnica grzybni wyhodowanej na pożywce kontrolnej, (woda destylowana, bez dodatku wyciągu roślinnego),
- a_x — średnica grzybni wyhodowanej na x -owej płytce Petriego z pożywką, do której dodano testowany wyciąg ($x= 1, \dots, 10$).

Dla każdego wariantu badań z dziesięciu powtórzeń wyliczono średnią arytmetyczną oraz odchylenie standardowe stopnia inhibicji wzrostu grzybni.

Wyniki badań przedstawiono na rycinie. Na osi poziomej diagramu zostały zaznaczone wszystkie gatunki roślin poddane analizie, zaś na osi pionowej zaznaczono stopień inhibicji wzrostu grzybni przez wodne wyciągi z poszczególnych gatunków i części roślin. Symbolem "N" oznaczono wyciągi sporządzone z nadziemnych części roślin (liście, pędy), zaś symbolem "P" z podziemnych części roślin (korzenie, kłącza, rozłogi).

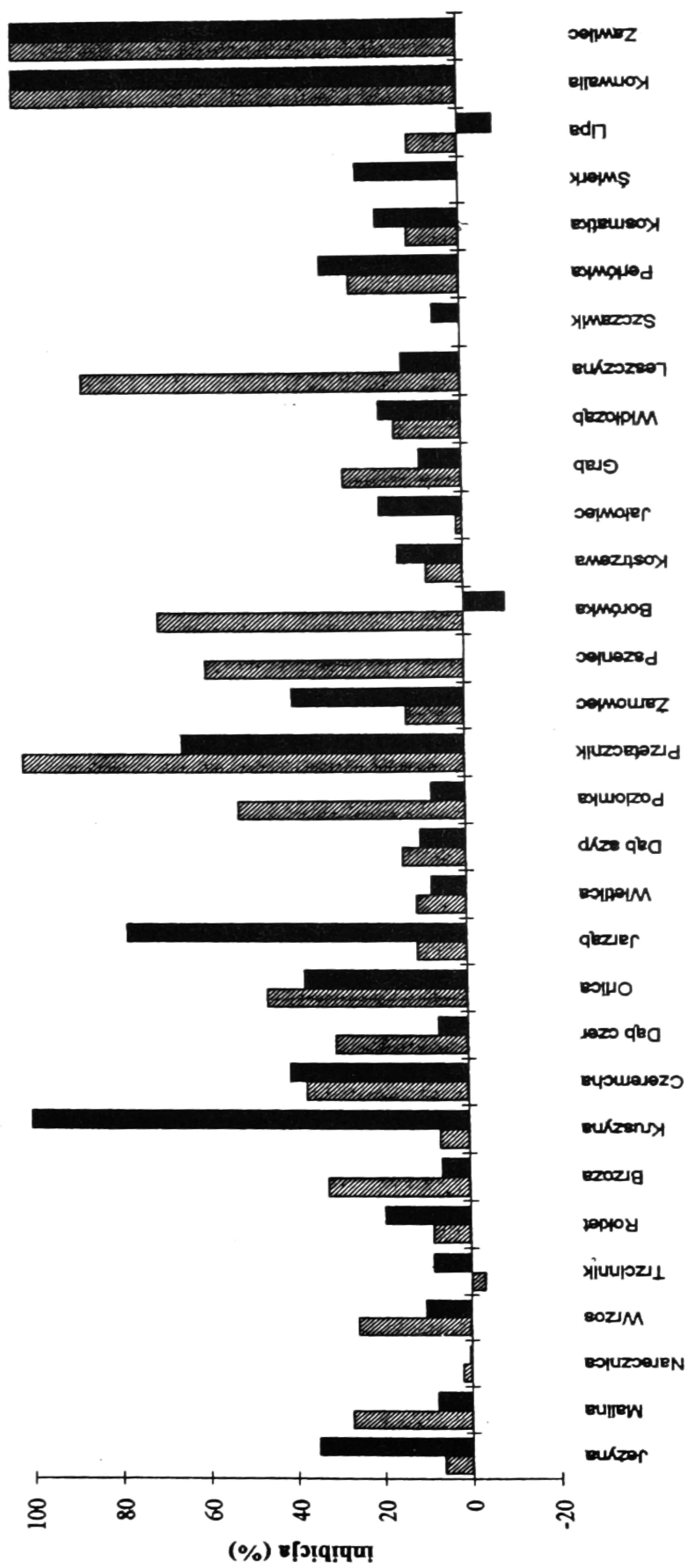
Większość testowanych wyciągów z roślin powodowała inhibicję wzrostu grzybni korzeniowca wieloletniego. Jedynie w nielicznych przypadkach występowała słaba stymulacja wzrostu. Stopień inhibicyjnego oddziaływania poszczególnych gatunków był bardzo zróżnicowany. Różnice zaznaczały się zarówno między gatunkami roślin jak również pomiędzy różnymi częściami tej samej rośliny.

Na największą uwagę zasługują rośliny, które powodowały silną inhibicję wzrost grzybni. Najwyraźniej wpływ ten uwidoczniał się w przypadku zawilca gajowego oraz konwalii majo-wej. Zarówno pędy, jak również kłącza tych roślin całkowicie hamowały wzrost grzybni. Grzybnia zaszczerpiona na pożywce z dodatkim wyciągu z tych roślin obumierała. Stopień inhibicji wynosił 100%.

Do drugiej grupy została zaliczona kruszyna pospolita oraz przetacznik leśny. Obydwa gatunki wykazywały bardzo duże różnice w stopniu oddziaływania wyciągów z pędów i korzeni.

Wyciągi z korzeni kruszyny pospolitej powodowały zamieranie grzybni, a więc posiadały właściwości podobne do właściwości kłączy konwalii i zawilca. W przeciwieństwie do korzeni, wyciągi z liści kruszyny niemal w ogóle nie wpływały na wzrost grzybni, stopień inhibicji wynosił zaledwie 7%. Odwrotna sytuacja zaistniała przy testowaniu wyciągów z przetacznika leśnego. Bardzo silne właściwości inhibicyjne, powodujące zamieranie grzybni, posiadały wyciągi z pędów przetacznika leśnego. Tymczasem wyciągi z korzeni tego gatunku wprawdzie inhibowały wzrost grzybni, ale stopień ich oddziaływania, w porównaniu z wyciągami z pędów był znacznie mniejszy i wynosił 74% inhibicji. W wymienionych przypadkach stwierdzona została najsilniejsza inhibicja wzrostu grzybni, powodująca nawet całkowite zamieranie grzybni zaszczerpionej na pożywce. W pozostałych przypadkach zawsze obserwowano wzrost grzybni, choć często był on silnie zahamowany. Zaobserwowano przy tym duże różnice pomiędzy oddziaływaniem wyciągów z części nadziemnych i podziemnych roślin. Najlepszym potwierdzeniem tego zjawiska jest omówiona wcześniej kruszyna pospolita. Stwierdzenie to potwierdzają również przedstawione poniżej przykłady.

Wyciąg z liści leszczyny powodował 85% inhibicję, zaś stopień inhibicji wzrostu grzybni przez wyciąg sporządzony z korzeni tego gatunku wynosił tylko 13%. Inhibicja wzrostu



RYC. Stopień inhibicji wzrostu grzybni *Heterobasidion annosum* przez wodne wyciągi z roślin

grzybni powodowana przez wyciąg z korzeni jarzębu pospolitego wynosiła 77%, natomiast wpływ wyciągu z liści był mniejszy i powodował 11% inhibicję wzrostu grzybni.

Z kolei w przypadku borówki czarnej wyciąg z liści wywierał znacznie większy wpływ na wzrost grzybni niż wyciąg z korzeni tego gatunku. Wyciąg z liści powodował 69% inhibicję wzrostu grzybni gdy tymczasem wyciąg z korzeni borówki stymulował w 9% wzrost grzybni.

Na uwagę zasługuje fakt, że gatunki, które powodowały bardzo silną inhibicję wzrostu grzybni (zawilec i konwalia) występowały wyłącznie w drzewostanach zdrowych (7). Pozostałe gatunki odznaczające się silnym wpływem na wzrost grzybni *H. annosum* występowały częściej w drzewostanach zdrowych aniżeli porażonych (borówka, przetacznik). Zauważyć również należy, że gatunki roślin, które występowały z większą ilościowością w drzewostanach porażonych nie wywierały hamującego wpływu na wzrost grzybni lub wpływ ten był bardzo słaby. Wyciągi z liści jeżyny fałdowanej, korzeni maliny właściwej oraz rozłogów i pędów trzcinnika leśnego nie wpływały na wzrost grzybni. Jedynie wyciągi z korzeni jeżyny fałdowanej oraz liści maliny właściwej w niewielkim stopniu hamowały wzrost grzybni. W przypadku korzeni jeżyny fałdowanej wzrost grzybni był inhibowany w 35%, zaś przy liściach maliny w 28%.

Badania wykazały, że wodne wyciągi z roślin bardzo licznie występujących w drzewostanach porażonych nie inhibują wzrostu grzybni, a więc obecność tych roślin nie może hamować swobodnego rozprzestrzeniania się choroby. Jednocześnie wśród roślin występujących w drzewostanach bez oznak porażenia były gatunki o bardzo silnych właściwościach inhibujących wzrost grzybni *Heterobasidion annosum*. Można więc przypuszczać, że obecność tych roślin wpływa w konkretnych drzewostanach na rozwój choroby. Potwierdzenie tej hipotezy wymaga przeprowadzenia badań środowiskowych, uwzględniających modyfikujące oddziaływania wielu czynników środowiska.

Badania nie potwierdziły poglądu, że większość związków o działaniu allelopatycznym znajduje się w liściach (9). Z przedstawionych przykładów wynika, że niektóre gatunki roślin zawierają znacznie więcej związków allelopatycznych w podziemnych organach niż w liściach lub pędach.

Niektóre z testowanych w tej pracy gatunków roślin były wcześniej badane przez Fedorova, Solovjova i Vasiljauskasa. Fedorov (1) wykrył inhibicyjne oddziaływanie wyciągów z dębu czerwonego i lipy drobnolistnej. Szczególną uwagę zwrócił na dąb czerwony, którego korzenie i liście silnie inhibowały wzrost grzybni. Przeprowadzone w tej pracy badania właściwości tych nie potwierdziły. Obydwa gatunki powodowały bardzo słabą inhibicję wzrostu grzybni, a niekiedy nawet nieznacznie stymulowały wzrost grzybni. Znacznie więcej gatunków przetestował w swojej pracy Vasiljauskas (10). W jego badaniach jedynie wyciągi z liści czeremchy amerykańskiej i żarnowca miotlastego inhibowały wzrost grzybni. Pozostałe gatunki, do których należały: borówka czarna, narecznica samcza, orlica pospolita, dąb czerwony, brzoza brodawkowata, jarząb pospolity, leszczyna, grab zwyczajny i świerk pospolity stymulowały wzrost grzybni. Badania wykazały, że wiele z tych gatunków roślin dość silnie inhibowało wzrost grzybni. Można przypuszczać, że uzyskanie różnych wyników przy badaniu tych samych roślin wynikało z zastosowania innej metody sporządzania wyciągów. Vasiljauskas moczył rozdrobnione rośliny w zimnej wodzie przez

24 godziny. Zastosowanie zimnej wody, jakkolwiek uznawane za postępowanie najbardziej zbliżone do warunków naturalnych, pozwala wyekstrahować przede wszystkim łatwo rozpuszczalne w wodzie związki tzw. metabolizmu podstawowego. Związki allelopatyczne natomiast na ogół należą do trudno rozpuszczalnych w wodzie (5). Z tego względu można przypuszczać, że zastosowane w moich badaniach metody ekstrakcji gorącą wodą pozwalały na wyekstrahowanie większej ilości związków allelopatycznych.

Literatura

1. **Fedorov N. I.** 1984: Kornevye gnili chvojnych porod. "Lesnaja promyslennost", Moskva.
2. **Grodzinskij A. M.** 1965: Allelopatija v zizni rastenij i ich soobscestv. Akademiya Nauk Ukrainskoj SSR "Naukowa Dumka" Kiev.
3. **Mańka K.** 1972: O warunkach porażenia drewna sosnowego przez grzyb *Fomes annosus* (Fr.) Cke. Zeszyty Naukowe SGGW – Leśnictwo nr 18, Materiały VI Sympozjum Ochrony Drewna, s. 151–160.
4. **Mańka H.** 1992: Fitopatologia leśna. PWRiL Warszawa, wyd. IV.
5. **Oleszek W.** 1992: Techniki badań allelopatii. Wiadomości Botaniczne nr 36, s. 17–25.
6. **Orłóś H.** 1966: Grzyby leśne na tle środowiska. PWRiL Warszawa.
7. **Piasecki D.** 1997: Allelopatyczny wpływ roślin na porażenie drzewostanów sosnowych na gruntach porolnych przez *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Sylwan (w druku).
8. **Twarowska I.** 1970: Drogi infekcji huby korzeni w drzewostanach sosnowych. Sylwan nr 4, s. 7–17.
9. **Wójcik–Wojtkowiak D.** 1987: Rola allelopatii w rolniczych ekosystemach. Postępy Nauk Rolniczych nr 1/2, s. 37–54.
10. **Vasiljauskas A.** 1989: Kornevaja gubka i ustojciwost' ekosistem chvojnych lesov. "Mokslas " Vil'njus.

Summary

The Impact of Water Extracts from Plants on the *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. Mycelium Growth

The disease process is the one of aspects of the plant phenotype that depends on the host genotype, ambiency, and time. The external ambiency is shaped by many factors. Chemical substances from plants can be one of them.

Identification of features and levels of the impact of water extracts from plants occurring in pine stands growing in former agricultural lands on the growth of the *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. mycelium was the aim of the research.

The research was carried out using the method of testing in laboratory the impact of water extracts from donor plants on the growth of mycelium. Extracts from 31 plant species were tested in the research. Separately were tested extracts from roots, leaves, and shoots.

Most tested extracts caused an inhibition of the mycelium growth. Only in few cases there was a very low stimulation noted. Extracts from wood anemone and mayflower gave the the strongest influence. The dieback of grafted mycelium was caused by extracts from both stems and rhizomes of those plants.

In the case of alder buckthorn the extracts from roots caused a dieback of mycelium, while those from leaves did not however impact the mycelium growth almost at all. The reverse situation was recorded at testing extracts from speedwell. An extract from its stems caused a mycelium dieback, while that from roots inhibited the mycelium growth at the level of 74%.

Extracts made from the remaining plant species had their impacts on the mycelium growth at various levels that depended on the on the species and the part of a plant from which the extract had been made. The extract from hazel leaves inhibited significantly the growth of mycelium, at the level of 85%; from rowan roots – at 77%; from bilberry leaves – at 69%.

The research has not confirmed the opinion presented by many authors that most allelopathic compounds are located in plant leaves.