

LIDIA SZWAJKOWSKA-MICHAŁEK, HANNA KWAŚNA, JULIUSZ PERKOWSKI

Czy *Penicillium adametzii* może ograniczyć pasożytniczą zgorzel siewek sosny zwyczajnej?

Can *Penicillium adametzii* decrease the damping-off in pine?

ABSTRACT

Szwajkowska-Michałek L., Kwaśna H., Perkowski J. 2011. Czy *Penicillium adametzii* może ograniczyć pasożytniczą zgorzel siewek sosny zwyczajnej?. Sylwan 155 (1): 46-62.

Mixture of the *Penicillium adametzii* metabolites present in the chloroform extract usually did not inhibit the growth of damping-off fungi, including *C. destructans*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani* and *R. solani*, *in vitro*. Extract from the *P. adametzii* liquid culture: (i) protected the inoculated pine seedlings from the damping-off only temporarily, (ii) decreased the health of the non-inoculated seedlings, (iii) caused the temporary increases of the fungal population in soil, (iv) changed structure of the soil fungi communities, and (v) caused the continuous increase of *Trichoderma*, mostly *T. aureoviride* population. The increase of pine seedlings damping-off was connected with the increase of *T. aureoviride* population in soil. Natural isolates of *P. adametzii* cannot be considered as the effective biological factor in the biological control of damping-off.

KEY WORDS

damping-off, metabolites, *Penicillium adametzii*, pine seedlings

ADDRESSES

Lidia Szwajkowska-Michałek ⁽¹⁾ – e-mail: lidiasz17@wp.pl

Hanna Kwaśna ⁽²⁾ – e-mail: kwasna@up.poznan.pl

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

⁽¹⁾ Katedra Chemii; Uniwersytet Przyrodniczy; ul. Wojska Polskiego 75; 60-637 Poznań

⁽²⁾ Katedra Fitopatologii Leśnej; Uniwersytet Przyrodniczy; ul. Wojska Polskiego 71C; 60-637 Poznań

Wstęp

Pasożytnicza zgorzel siewek występuje w szkółkach całego świata, głównie w strefie klimatu umiarkowanego (ale również w północnej Afryce), na wszystkich roślinach nasiennych, w tym także na drzewach i krzewach leśnych. W leśnictwie, poza szkółkami, choroba ta występuje również w siewach odnowieniowych i samosiewach. Głównymi jej sprawcami są grzyby zgorzelowe z gromady *Ascomycota* (*Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.), *Fusarium oxysporum* Schlecht., *F. sambucinum* Fuckel, *F. solani* (Martius) App. et Wollenw)) i *Basidiomycota* (*Rhizoctonia solani* Kühn) oraz organizmy grzybopodobne z gromady *Oomycota* (*Phytophthora* spp., *Pythium* spp.). Wymienione organizmy należą do pasożytów fakultatywnych. Ich cechy fizjologiczne wyrażone przynależnością taksonomiczną pozwalają na aktywność chorobotwórczą w różnych warunkach siedliskowych i klimatycznych. Patogeny działają pojedynczo lub w zespole, przemiennie, w zależności od okoliczności.

Pasożytnicza zgorzel siewek zaliczana jest do grupy najważniejszych chorób lasu powodujących duże straty finansowe. Jest najpoważniejszą biotyczną przyczyną obniżającą wydajność siewów i produkcję materiału szkółkarskiego. Przy zaniedbaniach straty w produkcji

szkółkarskiej mogą sięgać do 80%. Powierzchnia szkótek leśnych opianowanych przez patogeny zgorzelowe wynosi w Polsce ponad 700 ha [Sierota i in. 2004]. Powstałe w latach siedemdziesiątych XX wieku szkółki zespolone są po 40 latach stałego użytkowania szczególnie narażone na kumulację materiału infekcyjnego i wystąpienie choroby. Nowe technologie, oparte na produkcji sadzonek w namiotach foliowych i różnych podłożach, często zwiększają nasilenie zagrożenia.

Obszary leśne w Polsce zajmują obecnie 28,7% powierzchni kraju i systematycznie rosną. Program zalesiania gruntów rolnych w ramach Narodowego Programu Zwiększania Lesistości realizowany od 1995 roku przewiduje wzrost powierzchni lasów do 30-33% powierzchni Polski w latach 2020-2050. W związku z powyższym produkcja materiału szkółkarskiego jest ważnym zadaniem praktyki leśnej.

Chociaż polityka leśna państwa w polskich lasach zakłada przebudowę drzewostanów zmierzającą do zwiększenia udziału gatunków liściastych i zróżnicowania struktury wiekowej i gatunkowej, to jednak warunki siedliskowe i klimatyczne na znacznych obszarach Polski decydują o przewadze drzewostanów iglastych. Zajmują one w Polsce ponad 78% ogólnej powierzchni lasów. Wysoki udział sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) w składzie gatunkowym lasów powoduje, że większość sadzonek produkowanych w szkółkach leśnych to sadzonki sosny. W roku 2007 szkółki leśne będące własnością Lasów Państwowych wyprodukowały 1077,4 mln sztuk sadzonek, w większości sosny zwyczajnej [Zajączkowski 2008].

Asortyment środków chemicznych stosowanych w polskim leśnictwie drastycznie zmniejsza się. Wyjątkowo trudna sytuacja powstała w szkółkach leśnych. Ograniczenia wynikają ze wskazań Forest Stewardship Council (FSC) – instytucji certyfikującej gospodarkę leśną w Lasach Państwowych. Większość zarejestrowanych i stosowanych dotychczas pestycydów uznana została za wysoce niebezpieczne. Zalecono wycofanie ich z rynku. Wysokie koszty (ponad milion euro) unijnego przeglądu substancji aktywnych spowodowały, że w wielu przypadkach producenci nie podjęli się próby rejestracji dotychczas stosowanych środków chemicznych i biologicznych. Producenci nowych środków chemicznych i biologicznych również nie podjęli wyzwania, najprawdopodobniej z obawy przed ponoszeniem wysokich kosztów rejestracji przy ograniczonej ewentualnej przyszłej sprzedaży wynikającej z niewielkiego zapotrzebowania. Aktualny rejestr środków ochrony roślin dopuszczonych do obrotu i stosowania, m.in. w ochronie przed pasożytniczą zgorzelą siewek, zawiera następujące substancje: Folpan 80 WG, Sadoplone 75 WP, Sarox T 500 FS, Thiram Granuflo 80 WG, Zaprawę Oxafun T 75 DS/WS. Znajdujące się w rejestrze Dithane NeoTec 75 WG i Manconex 80 WP nie są zalecane przez FSC.

Brak zgody na stosowanie środków chemicznych w ochronie szkótek przed patogenami wymusza stosowanie alternatywnych metod ochrony roślin. Jedną z nich jest metoda biologiczna. Klasyczna koncepcja biologicznej ochrony roślin zakłada wykorzystanie żywych organizmów do zwalczania organizmów szkodliwych. Baker i Cook [1974] definiują ją jako redukcję ilości inokulum lub intensywności choroby wywołaną działalnością jednego lub wielu czynników biologicznych. Alabouvette i in. [2006] uważają, że biologiczna ochrona to wykorzystywanie fizjologicznych i biochemicznych możliwości niepatogenicznych lub hypowirulentnych szczepów do eliminacji patogenów oraz aktywacji reakcji obronnych rośliny-gospodarza. Biologiczne metody ochrony należą do najbardziej przyjaznych dla środowiska naturalnego. Jednak po pierwszych, entuzjastycznie przyjętych próbach zauważono, że efekty biologicznej ochrony roślin mogą być niewielkie i początkowo niewidoczne, składniki biologicznie czynne – zawodne i nieprzewidywalne, a efektywność uzależniona od warunków siedliskowych i klimatycznych,

sposobu aplikacji środka oraz współdziałania ze strony rośliny-gospodarza [Alabouvette i in. 2006]. Pomimo wielu mankamentów, w sytuacji koniecznej likwidacji zagrożeń chemicznych, podejmowanie prób biologicznej ochrony roślin, chociaż niełatwe, jest konieczne. Łączenie metody biologicznej z innymi metodami i stosowaniem słabo toksycznych środków chemicznych, w ramach integrowanej ochrony roślin, może okazać się skuteczne i stanowić element nowoczesnej technologii uprawy.

Laboratoryjne i terenowe prace nad biologiczną ochroną siewek przed patogenami zgorzelowymi zapoczątkowali Weindling [1932, 1934], Allenn i Haenseler [1935], Weindling i Fawcett [1936] oraz Williams i Schmitthemer [1960]. W Polsce prekursorami byli Mańka i Gierczak [1972], Mańka i Przezbórki [1978], Kwaśna [1987], Mańka i in. [1989; 2001], Mańka i Kacprzak [1998] oraz Kwaśna i Dux [1999]. Największe sukcesy osiągnęto z grzybami z rodzaju *Trichoderma*. Swoją wyjątkową pozycję wśród czynników biologicznie czynnych zawdzięczają one zdolności: (i) kolonizowania podłoża o różnym składzie chemicznym i odczynie, (ii) niezwykle szybkiego wzrostu i rozwoju, (iii) szybkiej i intensywnej kolonizacji dzięki obfitemu zarodnikowaniu, (iv) produkcji licznych enzymów, w tym hydrolitycznych, (v) produkcji licznych metabolitów lotnych i nielotnych, w tym bakterio- i grzybobójczych, (vi) mikopasożytnictwa, (vii) stymulacji odżywiania i wzrostu roślin, (viii) indukowania odporności roślin na patogeny, (ix) unieszkodliwiania enzymów patogenów oraz (x) tolerowania pestycydów w otoczeniu [Harman i in. 2004].

Prace laboratoryjne nad biologiczną ochroną drzew przed patogenami odglebowymi pozwoliły zaobserwować ograniczanie wzrostu patogenów przez grzyby z rodzaju *Penicillium* [Przezbórski 1982; Kwaśna 1987; Mańka i in. 1989; Stępniewska 2004]. Wyjątkowym był gatunek *Penicillium adametzii* Zaleski [Kwaśna 1995; 1997b]. W kulturach dwugrzybniowych z *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref., na pożywce glukozowo-ziemniaczanej, wytwarzał on wyjątkowo szeroką strefę inhibicji. Indywidualny efekt biotyczny wynosił od +20 do +22 i był największym efektem inhibującym zaobserwowanym dotychczas w badaniach prowadzonych metodą szeregow biotycznych Mańki [1974]. Dalsze wyniki świadczące o hamującym wpływie grzybni i metabolitów *P. adametzii* na wzrost i rozwój *Armillaria* [Kwaśna i in. 2001a; Szynekiewicz-Wronek i in. 2006], w sytuacji powszechnego występowania *P. adametzii* w glebie drzewostanów iglastych i liściastych [Przezbórski 1982; Kwaśna 1995, 1996a, b, 1997a, b, c, 2004; Kwaśna i in. 2000, 2001a, b] sprawiły, że zainteresowano się wpływem grzybni i metabolitów *P. adametzii* na wzrost patogenów zgorzelowych pochodzących ze szkółek leśnych oraz wykorzystaniem grzyba do ograniczenia występowania patogenów korzeniowych.

Celem pracy było zbadanie wpływu grzybni i metabolitów *P. adametzii* na: (i) wzrost grzybów zgorzelowych powodujących pasożytniczą zgorzel siewek sosny (*C. destructans*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani*, *R. solani*) *in vitro*, (ii) zdrowotność siewek sosny inokulowanych pojedynczym grzybem zgorzelowym w warunkach sterylnej i niesterylnej gleby szkółkowej, (iii) strukturę zbiorowisk mikroorganizmów glebowych towarzyszących sośnie i patogenom zgorzelowym w glebie szkółkowej. Badano przydatność *P. adametzii* w biologicznej ochronie roślin i ewentualną możliwość włączenia jej do zintegrowanej ochrony lasu przed chorobami.

Materiały i metody

GRZYBY. Do badań użyto jednego izolatu *P. adametzii* pozyskanego z gleby drzewostanu bukowego oraz dwóch izolatów z każdego z 5 gatunków grzybów zgorzelowych (*Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*) wyizolowanych z korzeni siewek drzew leśnych z terenu Polski zachodniej w latach 2001-2005 (tab. 1).

Tabela 1.

Grzyby użyte do badań
Fungi used for the research

Gatunek	Symbol	Gospodarz	Miejsce zebrania	Data zebrania
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	KF 3 KF 3A	Klon (<i>Acer platanoides</i> L.) korzenie	Nadl. Zielona Góra, Leśnictwo Świdnica	październik 2003
<i>Fusarium oxysporum</i>	KF 15A KF 7C	Sosna zwyczajna (<i>P. sylvestris</i> L.) korzenie	Nadl. Zielona Góra, Leśnictwo Świdnica	maj 2005
<i>Fusarium sambucinum</i>	KF 9B KF 20	Świerk ajański (<i>Picea jezoensis</i> Sieb. et. Zucc.) korzenie	Nadl. Zdrojowa Góra, Gospodarstwo Szkółkarskie „Jutrzenka”	maj 2005
<i>Fusarium solani</i>	KF 7A KF 11F	Sosna zwyczajna (<i>P. sylvestris</i> L.) korzenie	Nadleśnictwo Bytów, Gospodarstwo Szkółkarskie „Jutrzenka”	maj 2005
<i>Penicillium adametzii</i>	KF 79	Buk zwyczajny (<i>Fagus sylvatica</i> L.) gleba	Nadleśnictwo Zielonka, Leśnictwo Rakownia	maj 2001
<i>Rhizoctonia solani</i>	KF 24C KF 306	Sosna smołowa (<i>Pinus rigida</i> Mill.) korzenie	Nadleśnictwo Zdrojowa Góra	maj 2001

PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU CHLOROFORMOWEGO *P. ADAMETZII*. Ekstrakt chloroformowy *P. adametzii* otrzymywano z hodowli grzyba na pożywce ryżowej. W celu jego przygotowania 200 g ryżu (po dwukrotnej sterylizacji przez 20 min. w temperaturze 121°C) szczepiono trzema krążkami o średnicy 5 mm pochodzącymi z obwodu kolonii *P. adametzii* na PDA (wyciąg z 200 g ziemniaków, glukoza 20 g, agar 20 g, woda destylowana do 1 l). Hodowlę inkubowano przez 40 dni w temperaturze 25°C w cyklu świetlnym dnia i nocy. Dla natlenienia i wyrównania warunków wzrostu, wstrząsano ją codziennie przez 3 min. W celu ekstrakcji metabolitów grzyba, ryż suszono przez 48 godz. w temperaturze 40°C, mielono i trzykrotnie przemywano chloroformem (CH₃Cl) w stosunku 1:1 [v/v]. Chloroform odparowywano w wyparce próżniowej w temperaturze 40°C. Ekstrakt suszono w strumieniu azotu.

PRZYGOTOWANIE PŁYNU POHODOWLANEGO *P. ADAMETZII*. Płynną pożywkę PDA (400 ml) szczepiono trzema krążkami o średnicy 5 mm z kolonii *P. adametzii*. Po 21 dniach inkubacji w temperaturze 25°C grzybnięć wyrosłą na powierzchni pożywki usuwano. Pożywkę sączono przez bibułę filtracyjną i sterylną membranę filtracyjną o średnicy por 0,6 µm. Uzyskany płyn pohodowlany przechowywano w temperaturze 4°C.

WPLYW EKSTRAKTU CHLOROFORMOWEGO *P. ADAMETZII* NA WZROST GRZYBÓW ZGORZELOWYCH *IN VITRO*. Ekstrakt chloroformowy *P. adametzii* rozpuszczano w chloroformie i dodawano do pożywki SNA (KH₂PO₄ 1 g, KNO₃ 1 g, KCl 0,5 g, MgSO₄ × 7 H₂O 0,5 g, glukoza 0,2 g, sacharoza 0,2 g, agar 15 g, woda destylowana do 1 l) w stężeniu 0,000125%, 0,00125%, 0,0125%, 0,125%, 0,5%, 1,0% i 1,25%. W kontroli względnej i bezwzględnej do pożywki dodawano odpowiednio chloroform lub wodę destylowaną sterylną, w ilości użytej w kombinacjach do rozpuszczenia ekstraktu.

Pożywkę szczepiono krążkiem grzyba zgorzelowego pobranego z obwodu 7-dniowej kolonii na SNA. Kultury inkubowano w temperaturze 25°C w cyklu świetlnym dnia i nocy. Każda kombinacja miała 4 powtórzenia. Średnicę kolonii grzyba zgorzelowego mierzono po 10 dniach inkubacji. Każdorazowo mierzono 2 średnice po przekątnej. Wyliczano wartości średnie

z 8 pomiarów. Wpływ ekstraktu chloroformowego *P. adametzii* obliczono ze stosunku kombinacji (grzyb zgorzelowy na SNA z ekstraktem chloroformowy *P. adametzii*) do kontroli względnej (grzyb zgorzelowy na SNA z chloroformem). Wpływ chloroformu obliczono ze stosunku kontroli względnej (grzyb zgorzelowy na SNA z chloroformem) do kontroli bezwzględnej (grzyb zgorzelowy na SNA z wodą destylowaną sterylną).

WPLYW PŁYNU POHODOWLANEGO NA ZDROWOTNOŚĆ SIEWEK SOSNY (DOŚWIADCZENIE INFEKCYJNE). *C. destructans*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani* i *R. solani* hodowano na pożywce PDA w płytkach Petriego. Nasiona sosny zwyczajnej sterylizowano powierzchniowo przez 5 s w 96% etanolu, a następnie przez 3 min. w 3% podchlorynie sodu. Po sterylizacji płukano je trzykrotnie po 10 min. w sterylnej wodzie destylowanej, po czym podkiełkowano przez 5 dni w temperaturze 25°C na wilgotnej bibule filtracyjnej.

Doniczki o pojemności 300 ml wypełniono sterylną lub niesterylną glebą szkółkową. Sterylizację gleby wykonano 7 dni przed założeniem doświadczenia, dwukrotnie w odstępach 24 godz., każdorazowo przez 2 godz. w temperaturze 121°C. Pożywkę przefiltrowaną pojedynczym grzybem zgorzelowym mieszano ze sterylnym piaskiem rzeczonym w stosunku 1:1 [v/v]. Mieszaninę umieszczano w warstwie 0,5 cm grubości na powierzchni gleby w doniczce. 50 podkiełkowanych nasion sosny umieszczono na powierzchni gleby w odstępach 1x1 cm. Całość przykrywano warstwą sterylnego piasku rzeczowego 0,5 cm grubości. Nasiona, a później siewki, podlewano 2 razy w tygodniu, używając każdorazowo 50 ml płynu pohodowanego *P. adametzii*. Kontrolę względną 1 (inokulacja grzybem zgorzelowym) podlewano 50 ml wody destylowanej. Kontrolę względną 2 (inokulacja sterylną pożywką) podlewano 50 ml płynu pohodowanego. Kontrolę bezwzględną (inokulacja sterylną pożywką) podlewano 50 ml wody destylowanej. Zdrowe i chore siewki sosny liczone przez 8 tygodni. Wpływ płynu pohodowanego *P. adametzii* na zdrowotność siewek sosny inokulowanej grzybem zgorzelowym oceniano ze stosunku wyniku w kombinacji do wyniku w kontroli względnej 1. Wpływ płynu pohodowanego *P. adametzii* na zdrowotność siewek sosny nieinokulowanych grzybem zgorzelowym oceniano ze stosunku wyniku w kontroli względnej 2 do wyniku w kontroli bezwzględnej. Wpływ grzyba zgorzelowego na zdrowotność siewek sosny oceniano ze stosunku wyniku w kontroli względnej 1 do wyniku w kontroli bezwzględnej.

WPLYW PŁYNU POHODOWLANEGO NA STRUKTURĘ ZBIOROWISKA GRZYBÓW GLEBOWYCH. Grzyby izolowano z gleby doświadczenia metodą rozcieńczania próbki gleby [Johnson, Mańka 1961; Mańka 1964]. Próbkę gleby (1 g) pobierano z głębokości 2-3 cm ze środka doniczki. Łączono ją ze 149 g sterylnego piasku kwarcowego w kolbie. 27 mm³ mieszaniny glebowo-piaskowej umieszczano w sterylnej płytce Petriego. Zalewano ją schłodzoną do 50°C pożywką Martina-Johnsona (pepton 5 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ × 7 H₂O 0,5 g, glukoza 10 g, róż bengalski 0,03 g, aureomycyna 0,0025 g, agar 20 g, woda destylowana do 1l [Martin 1950; Johnson 1957]). Grzyby inkubowano w temperaturze 25°C przez 7 dni. Strukturę zbiorowiska wyrażoną przez liczbę gatunków, liczbę izolatów każdego gatunku oraz takson każdego izolatu określano poprzez zliczenie kolonii i identyfikację kultur reprezentacyjnych. Grzyby oznaczano na podstawie morfologii kultur oraz zarodnikowania na pożywkach specjalistycznych w oparciu o dostępną literaturę mikologiczną. Izolację grzybów wykonano 8-9 krotnie, raz w tygodniu, rozpoczynając tydzień przed (gleba niesterylna) i w momencie siewu nasion i inokulacji grzybami zgorzelowymi (gleba sterylna). Izolację każdorazowo wykonano w 10 powtórzeniach. Wpływ płynu pohodowanego *P. adametzii* na strukturę zbiorowiska grzybów glebowych w glebie inokulowanej grzybem zgorzelowym oceniano ze stosunku wyniku w kombinacji do wyniku w kontroli

względnej 1. Wpływ płynu pochowlanego *P. adametzii* na strukturę zbiorowiska grzybów glebowych w glebie nieinokulowanej grzybem zgorzelowym oceniano ze stosunku wyniku w kontroli względnej 2 do wyniku w kontroli bezwzględnej.

ANALIZA STATYSTYCZNA. Wyniki doświadczenia nad wpływem ekstraktu chloroformowego *P. adametzii* na wzrost grzybów zgorzelowych *in vitro* sprawdzono jednoczynnikową analizą wariancji. Wyniki doświadczenia nad wpływem płynu pochowlanego *P. adametzii* na zdrowotność siewek sosny w doświadczeniu infekcyjnym i na strukturę zbiorowiska grzybów glebowych sprawdzono testem zgodności χ^2 według wzoru:

$$\sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_x}$$

Obliczenia wykonano w programie Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.).

Wyniki

WPLYW EKSTRAKTU CHLOROFORMOWEGO *P. ADAMETZII* NA WZROST GRZYBÓW ZGORZELOWYCH *IN VITRO*. Na pożywce SNA ekstrakt chloroformowy z hodowli ryżowej *P. adametzii* nie wpływał na szybkość wzrostu grzybów zgorzelowych z rodzaju *Fusarium* (*Ascomycota*) oraz *R. solani* (*Basidiomycota*). *C. destructans* (*Ascomycota*) zareagował w mało wyraźny sposób. Jeden izolat tego grzyba (KF 3) zareagował zahamowaniem wzrostu przy średnim stężeniu ekstraktu (0,0125-0,5%; $P \leq 0,05$). Drugi izolat (KF 3A) rósł szybciej (o 10%) przy niewielkim stężeniu ekstraktu (0,00125-0,0125%; $P \leq 0,05$) (tab. 2).

WPLYW PŁYNU POCHODZANEGO *P. ADAMETZII* NA ZDROWOTNOŚĆ SIEWEK SOSNY. W glebie sterylnej płyn pochowlany *P. adametzii* stosowany do podlewania siewek sosny inokulowanych grzybami zgorzelowymi powodował opóźnienie wschodów i istotny ($P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$) wzrost liczby zdrowych siewek sosny tylko w 3.-4. tygodniu po inokulacji (tab. 3). Najsilniejszy i najdłuższy efekt ochronny zaobserwowano w kombinacjach z *F. oxysporum* i *F. sambucinum*. W glebie sterylnej w 5.-8. tygodniu zamarły wszystkie siewki inokulowane wszystkimi grzybami zgorzelowymi. W glebie niesterylnej tylko sporadycznie zaobserwowano istotny ($P \leq 0,05$) wzrost liczby zdrowych siewek sosny. W 7.-8. tygodniu zamarły wszystkie siewki inokulowane *C. destructans*, *F. sambucinum* i *R. solani*.

Tabela 2.

Średnica kolonii [% kontroli] grzybów zgorzelowych poddanych działaniu ekstraktu chloroformowego *P. adametzii*

Diameter of the colony [% of control] of damping-off fungi treated with chloroform extract of *P. adametzii*

	KF 3	KF 3A	KF 15A	KF 7C	KF 9B	KF 20	KF 7A	KF 11F	KF 24C	KF 306
Kontrola względna - CH ₃ Cl	100,0	100,0	98,9	98,0	98,0	97,5	100,0	100,0	100,0	99,0
0,000125%	105,1	100,0	82,5	98,4	96,9	110,0	101,7	86,9	92,5	97,5
0,00125%	97,4	110,8*	73,8	98,3	95,3	95,7	101,2	86,9	98,9	95,0
0,0125%	76,9*	110,8*	73,7	91,9	89,2	110,0	101,7	78,2	92,5	85,5
0,125%	82,0	97,2	81,5	96,7	84,8	107,1	105,5	82,0	87,5	87,5
0,5%	72,8*	97,3	85,6	98,3	86,3	94,6	101,7	82,6	88,9	89,5
1,0%	89,2	102,7	81,0	95,5	95,4	101,1	97,0	86,4	93,5	87,3
1,25%	99,0	89,3	88,3	94,8	97,2	105,4	105,2	89,2	96,5	95,0

* statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$

* statistically significant at $P \leq 0,05$

Tabela 3.

Udział [% kontroli] zdrowych siewek sosny inokulowanych grzybem zgorzelowym poddanych działaniu płynu pohodowlanego w kolejnych terminach obserwacji
Frequency [% of control] of healthy seedlings inoculated with damping-off fungi treated with of the *P. adamszki* liquid culture in consecutive observation dates

	Gleba sterylna								Gleba niesterylna							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>C. destructans</i>	0	0	311*	200	200	0	0	0	0	38*	76	29*	33*	38	20	0*
<i>F. oxysporum</i>	0	0	350**	500**	250	100	67	0	0	100	75	83	76	80	57	7**
<i>F. sambucinum</i>	0	164	95	480*	400	0	0	0	0	64	115	58	83	111	0*	0*
<i>F. solani</i>	0	55*	110	150	143	100	133	0	0	95	176*	76	75	80	92	62
<i>R. solani</i>	0	0	200*	71	0*	0*	0*	0*	0	62	153	118	110	100	13*	0*

* statystycznie istotne przy $P \leq 0,05$; statistically significant at $P \leq 0,05$

** statystycznie istotne przy $P \leq 0,001$; statistically significant at $P \leq 0,001$

Tabela 4.

Udział [% kontroli] zdrowych siewek sosny inokulowanych grzybem zgorzelowym w kolejnych terminach obserwacji
Frequency [% of control] of healthy seedlings inoculated with damping-off fungi in consecutive observation dates

	Gleba sterylna								Gleba niesterylna							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>C. destructans</i>	0	3000**	23**	6**	7**	3**	4**	4**	0	104	36**	35**	32**	21**	15**	15**
<i>F. oxysporum</i>	0	3000**	26**	17**	13**	14**	11**	7**	0	129	42**	45*	45*	39**	41*	41*
<i>F. sambucinum</i>	0	2200**	49*	14**	3**	0**	0**	0**	0	157	43**	48**	32**	24**	18**	18**
<i>F. solani</i>	0	4000**	51*	29*	23*	17*	11*	11*	0	146	36**	43*	42*	39*	38*	38*
<i>R. solani</i>	0	2300**	21**	20**	23**	21**	18**	18**	2000**	93	32	28**	26**	26**	24**	24**

Objaśnienia jak w tabeli 3; Denotes as in table 3

Tabela 5.

Udział [% kontroli] zdrowych siewek sosny nieinokulowanych grzybem zgorzelowym poddanych działaniu płynu pohodowlanego w kolejnych terminach obserwacji
Frequency [% of control] of healthy seedlings non-inoculated with damping-off fungi treated with of the *P. adamszki* liquid culture in consecutive observation dates

	Gleba sterylna								Gleba niesterylna							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
0,0	0,0	97,0	74,0	66,6	69,0	64,0	61,0	61,0	0,0	0,0**	46,8*	100,0	78,9	78,9	73,5	70,6

Objaśnienia jak w tabeli 3; Denotes as in table 3

C. destructans, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani* i *R. solani* powodowały wystąpienie silnej zgorzeli siewek sosny podlewanej wodą wodociągową (tab. 4). Udział zdrowych siewek w stosunku do kontroli w 3.-8. tygodniu wynosił średnio w glebie sterylnej 15%, a w niesterylnej – 33%. Więcej zdrowych siewek w 1.-2. tygodniu była efektem przyspieszonych wschodów w stosunku do kontroli.

Płyn pohodowlany *P. adametzii* pogarszał kondycję siewek sosny nieinokulowanych grzybem zgorzelowym (tab. 5). Wyniki jednak na ogół nie były statystycznie istotne. W glebie niesterylnej obserwowano statystycznie istotne opóźnienie wschodów. W 4. tygodniu rośliny nadrobiły zaległości we wzroście, a w ciągu kolejnych 4 tygodni liczba zdrowych siewek była wyższa niż w glebie sterylnej.

WPLYW PŁYNU POHODOWLANEGO NA STRUKTURĘ ZBIOROWISKA GRZYBÓW GLEBOWYCH. W sterylnej lub niesterylnej glebie szkółkowej inokulowanej grzybami zgorzelowymi i podlewanej płynem pohodowlany *P. adametzii* w ciągu 8-9 tygodni trwania doświadczenia obserwowano okresowe wzrosty i spadki populacji grzybów w stosunku do kontroli podlewanej wodą (tab. 6). Na ogół obserwowano brak równomiernego i trwałego wzrostu lub spadku populacji grzybów. W glebie sterylnej okresowy wzrost populacji grzybów był na ogół znacznie wyższy i trwał dłużej niż w glebie niesterylnej. Największe i stosunkowo najtrwalsze wzrosty obserwowano w glebie sterylnej w obecności *F. solani*. Uległa zmianie natomiast struktura zbiorowiska grzybów. Generalnie obserwowano silne mnożenie się grzybów z rodzaju *Trichoderma*, głównie *T. aureoviride* Rifai (tab. 7 i 8). Największe, i stosunkowo najtrwalsze, wzrosty obserwowano w glebie sterylnej. Rozpoczęły się one w 6., rzadziej w 5., tygodniu i trwały do 8.-9. tygodnia doświadczenia. *T. aureoviride* zastępowała *T. harzianum* Rifai obecnego w kontroli podlewanej wodą. Populacja grzybów z rzędów *Mortierellales* i *Mucorales* wzrastała w 4.-6. tygodniu w glebie niesterylnej. W glebie sterylnej populacja *Mortierellales* i *Mucorales* utrzymywała się na bardzo niskim poziomie przez cały czas trwania doświadczenia. Liczebność grzybów z rodzaju *Penicillium* wzrastała

Tabela 6.

Liczebność grzybów [% kontroli] w sterylnej (S) i niesterylnej (N) glebie inokulowanej grzybem zgorzelowym i podlewanej płynem pohodowlany *P. adametzii* w kolejnych terminach obserwacji
Number of fungi [% of control] in sterilised (S) and not-sterilised (N) soil inoculated with damping-off fungus and watering of the *P. adametzii* liquid culture in consecutive observation dates

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Cylindrocarpon destructans</i>									
S	–	18**	92	112	172	135**	29**	86	20**
N	140	41**	78*	133	64**	125	27**	29**	54**
<i>Fusarium oxysporum</i>									
S	–	64**	47**	335**	80**	51**	187**	216**	39**
N	140	13**	52**	83	144*	86	42**	49**	33**
<i>Fusarium sambucinum</i>									
S	–	78	29**	330**	22**	4**	104	104	150**
N	140	15.7**	103	163**	80*	105	106	39**	28.8**
<i>Fusarium solani</i>									
S	–	9**	3144**	169**	295**	309**	36**	187**	50**
N	140	25**	41**	121	198**	76*	106	73*	123
<i>Rhizoctonia solani</i>									
S	–	66*	58**	454**	98	399**	43**	187**	127**
N	140	11**	111	91	269**	85	59**	86	41**

Objaśnienia jak w tabeli 3; Denotes as in table 3

Tabela 7.

Liczebność grup grzybów [% kontroli] w sterylnej (S) i niesterylnej (N) glebie inokulowanej grzybem zgorzelowym i podlewanej płynem pochodzącym z *P. adametzii* w kolejnych terminach obserwacji
 Number of fungi groups [% of control] in sterilised (S) and not-sterilised (N) soil inoculated with damping-off fungus and watering of the *P. adametzii* liquid culture in consecutive observation dates

Grupa grzybów	Gleba	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Cylindrocarpon destructans</i>										
<i>C. destructans</i>	S	–	0	0	0	0	0	0	0	1100**
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	1000**
<i>Mortierellales</i> i <i>Mucorales</i>	S	–	12,5*	6,7**	3,7**	5,9**	0,8**	3,2**	1,9**	9,8**
	N	209*	100	7,7*	100	121	113	7,4**	14,7**	23**
<i>Penicillium</i> spp.	S	–	3,7**	35,2**	48,2**	177**	167**	22,4**	92	8,6**
	N	136	29**	24,5**	90,5	36,7**	205*	18,6**	14,7**	23,7**
<i>Trichoderma</i> spp.	S	–	633**	746**	800**	292**	12400**	4100**	4200**	1200**
	N	137,5	29**	237**	170*	64,7	64,9*	65,6	62	75
Inne grzyby	S	–	1000	233	4460**	57,5	2300*	333	63,6	1070*
	N	100	233*	33	3500**	3000**	1307	2216	416	8500**
<i>Fusarium oxysporum</i>										
<i>F. oxysporum</i>	S	–	0	0	100	0	400	0	6800**	0
	N	0	0	0	0	600	0	0	300	57
<i>Mortierellales</i> i <i>Mucorales</i>	S	–	5**	6**	4,5**	8,3**	6,6**	1**	0,9**	1,4**
	N	209*	16,7*	400	313	400*	480**	21,9**	3,2**	4,4**
<i>Penicillium</i> spp.	S	–	54**	33**	375**	80,9**	22**	218**	361**	24,3**
	N	136	8**	37**	54,8**	75	24**	25**	7,9**	9,8**
<i>Trichoderma</i> spp.	S	–	411**	300**	650**	81,5	1222**	6300**	3900**	620**
	N	118	10,5**	143	75,7	178**	263**	127	4800**	171*
Inne grzyby	S	–	83	3200**	2400**	270	2,45	333	11,5	6200**
	N	100	810*	246	131,9	138,3	44,2	227,3	5000**	211,9
<i>Fusarium sambucinum</i>										
<i>F. sambucinum</i>	S	–	0	0	0	0	0	0	0	0
	N	0	0	0	0	0	0	0	0	600*
<i>Mortierellales</i> i <i>Mucorales</i>	S	–	25*	2**	100	2,4**	0,8**	2,7**	0,9**	2,8**
	N	209	37,5	100	514**	3200**	168*	81,8*	34,6*	7,5
<i>Penicillium</i> spp.	S	–	123	16**	604**	7**	9**	67*	133	139**
	N	136	6,6**	44,7**	130,5	54,5**	34**	222*	35,5**	36**
<i>Trichoderma</i> spp.	S	–	2,6**	440*	27,5**	288**	2417**	2750**	2467**	343**
	N	118	34,8**	179*	179,5*	52,8**	350**	112	103	19**
Inne grzyby	S	–	3,1	9450**	4700**	8550**	100	900*	1400**	2100**
	N	100	225	10100**	24	197	246	28,5	12,2	139
	N	118	39,5*	44,6**	100	211**	200**	117	227**	617**
	S	–	6100**	165	77	19	100	12,3	1,4	2840**
N	100	268	7450**	9050**	463*	1275*	1814*	1210*	440	

Objaśnienia jak w tabeli 3; Denotes as in table 3

tylko okresowo, częściej w glebie sterylnej. Największe i najtrwalsze wzrosty obserwowano w glebie inokulowanej *F. solani*. Wśród innych grzybów zbiorowiska do najliczniejszych należały: *Aspergillus kanagawaensis* Nehira, *Candida albicans* (C. P. Robin) Berkhout, *Chaetomium globosum* Kunze, *Chrysosporium merdarium* (Ehrenb.) J. W. Carmich., *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G. A. de Vries, *Geotrichum candidum* Link, *Sporothrix schenckii* Hektoen et C. F. Perkins i *T. asperum* Harz. Grzyby zgorzelowe wprowadzone do gleby izolowano tylko sporadycznie.

Tabela 8.

Liczebność grup grzybów [% kontroli] w sterylnej (S) i niesterylnej (N) glebie inokulowanej grzybem zgorzelowym i podlewanej płynem pochodzącym z *P. adametzii* w kolejnych terminach obserwacji
 Number of fungi groups [% of control] in sterilised (S) and not-sterilised (N) soil inoculated with damping-off fungus and watering of the *P. adametzii* liquid culture in consecutive observation dates

Grupa grzybów	Gleba	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Fusarium solani</i>										
<i>F. solani</i>	S	–	300	200	0	23	0	5	0	8600**
	N	0	100	100	200	700*	500*	1850*	1200*	533*
<i>Mortierellales</i> i <i>Mucorales</i>	S	–	2**	50	14*	14,3*	80	22*	0,8**	0,95**
	N	209*	23,8*	36	222*	725**	550*	11*	3,2**	8,3**
<i>Penicillium</i> spp.	S	–	0,47**	3955**	144**	802**	295**	220*	423**	3,08**
	N	136	20,5**	27**	75,5	97,7	11,9**	11,4**	43,9**	83
<i>Trichoderma</i> spp.	S	–	700*	125	369**	526**	1750**	338*	5100**	7000**
	N	118	39,5*	44,6**	100	211**	200**	117	227**	617**
Inne grzyby	S	–	6100**	165	77	19	100	12,3	1,4	2840**
	N	100	268	7450**	9050**	463*	1275*	1814*	1210*	440
<i>Rhizoctonia solani</i>										
<i>R. solani</i>	S	–	0	0	0	0	0	0	0	0
	N	0	0	0	0	0	0	200	0	0
<i>Mortierellales</i> i <i>Mucorales</i>	S	–	20*	300	10*	75	1,3**	2,9**	2,9**	3,3**
	N	209*	20	150	158	150	1600**	7**	58	24**
<i>Penicillium</i> spp.	S	–	17,4**	31**	900**	60**	630**	19**	274**	106
	N	136	10,4**	41**	29,8**	175**	5,1**	9,3**	38**	28,3**
<i>Trichoderma</i> spp.	S	–	250**	133	134	11400**	9100**	1471**	16,7*	182**
	N	118	7,5**	328**	109	435**	389**	318**	263**	68,9
Inne grzyby	S	–	830*	41	1030*	41	1375*	259	50	656*
	N	100	2700*	10750**	2	1,5	50	500*	80	4620**

Objaśnienia jak w tabeli 3; Denotes as in table 3

Jedynie *F. solani* trwale zasiedlił glebę, głównie niesterylną, a jego populacja rosła w czasie. Brak pozytywnych efektów izolacji nie oznacza jednak braku patogena w glebie, o czym świadczą pozytywne efekty izolacji *C. destructans*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *R. solani* wykonane w 6.-9. tygodniu doświadczenia.

W sterylnej lub niesterylnej glebie szkółkowej nieinokulowanej grzybami zgorzelowymi, a podlewanej płynem pochodzącym z *P. adametzii*, w ciągu 8-9 tygodni trwania doświadczenia obserwowano trwały wzrost populacji *Trichoderma* spp. i okresowe wzrosty populacji *Mortierellales* i *Mucorales* oraz *Penicillium* spp. (tab. 9).

Dyskusja

Penicillium adametzii jest często najbardziej licznym gatunkiem *Penicillium* spp. w glebie leśnej [Kwaśna 1995; Kwaśna i in. 2001b]. W Polsce północno-zachodniej, w glebie 4-letniej brzozy brodawkowatej, buka zwyczajnego, czeremchy amerykańskiej, dębu bezszypułkowego, modrzewia europejskiego oraz 30-letniej sosny zwyczajnej jego frekwencja w zbiorowisku grzybów wynosiła odpowiednio 30-71% oraz 48%. Grzyb ten kolonizuje również korzenie drzew leśnych i ich pniaków [Kwaśna 1996a, b, 1997a, b, c]. Występuje również w glebie gruntów porolnych i nieużytków przeznaczonych do zalesienia [Kwaśna, Sierota 1999; Kwaśna i in. 2000]. Powszechne występowanie *P. adametzii* świadczy o tolerowaniu szerokiego zakresu naturalnych warunków

Tabela 9.

Liczebność grup grzybów [% kontroli] w sterylnej (S) i niesterylnej (N) glebie nieinokulowanej grzybem zgorzelowym i podlewanej płynem pochodzącym z *P. adametzii* w kolejnych terminach obserwacji
 Number of fungi groups [% of control] in sterilised (S) and not-sterilised (N) soil noninoculated with damping-off fungus and watering of the *P. adametzii* liquid culture in consecutive observation dates

Grupa grzybów	Gleba	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Mortierellales</i>	S	–	100	25*	100	100	200	100	100	14*
i <i>Mucorales</i>	N	100	367*	25	81.3	25*	346**	33	150	200
<i>Penicillium</i>	S	–	21**	733**	27**	149**	127**	189**	83*	84*
spp.	N	100	44,8**	54,7**	39,3**	18,4**	69,8	28,6**	81,6	57,7*
<i>Trichoderma</i>	S	–	3900**	171	700**	833**	1640**	1700**	5500**	1700**
spp.	N	100	2600**	324*	283**	220*	56*	517**	182	429**

Objaśnienia jak w tabeli 3; Denotes as in table 3

środowiska. Było ono jednym z powodów podjęcia badań nad wpływem grzyba i jego metabolitów na ograniczenie chorób powodowanych przez patogeny odglebowe. Planowano ewentualne wykorzystanie grzyba jako czynnika aktywnego w biologicznej ochronie drzewostanów przed *Armillaria* i *Heterobasidion* oraz szkółek przed patogenami zgorzelowymi.

Okazało się, że metabolity *P. adametzii* obecne w ekstrakcie chloroformowym nie hamowały wzrostu grzybów zgorzelowych *C. destructans*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani* i *R. solani in vitro*. Wynik ten potwierdził badania wpływu kolonii *P. adametzii* na wzrost grzybów zgorzelowych w kulturach dwugrzybniowych przy zastosowaniu metody szeregów biotycznych Mańki [1974]. Przezbórski [1982], Kwaśna [1987] i Mańka i in. [1989], stosując tę metodę wykazali, że *P. adametzii in vitro* nigdy nie hamuje wzrostu patogenów zgorzelowych, ale jest hamowany w stopniu 2. przez *F. oxysporum* i w stopniu 5. – przez *R. solani*.

Metabolity *P. adametzii* obecne w płynie pochodzącym tylko początkowo chroniły siewki sosny zwyczajnej przed pasożytniczą zgorzelą siewek. Bardziej wyraźny, ale nietrwały, efekt ochronny wystąpił w glebie sterylnej. Efekt ochronny był bardziej trwały w glebie niesterylnej. Lepsza kondycja siewek w glebie niesterylnej związana była ze wzrostem populacji *T. harzianum*. Niewykluczone, że to właśnie jemu należy zawdzięczać działanie kurujące. *T. harzianum* jest znany z ochrony siewek sosny przed *C. destructans* i *F. oxysporum*, ale nie przed *R. solani* [Kwaśna, Dux 1999]. Metabolity *P. adametzii* obecne w płynie pochodzącym obniżały kondycję siewek nieinokulowanych grzybem zgorzelowym. Liczba zdrowych siewek podlewanym płynem pochodzącym była na ogół niższa o 20-40% w porównaniu z kontrolą podlewaną wodą. Powodowały one także okresowy wzrost populacji saprotroficznych grzybów glebowych oraz trwałe zmiany w strukturze zbiorowisk grzybów. Najszybciej i najobficiej mnożyły się grzyby z rodzaju *Trichoderma*. Wzrost ich populacji był zdecydowanie bardziej wyraźny w glebie sterylnej. Gatunkiem, który mnożył się najszybciej i najobficiej, był *T. aureoviride*. Całkowicie lub częściowo zastępował on *T. harzianum*, co mogło być efektem wzajemnego działania antagonistycznego obu gatunków. Mniejsza populacja *Trichoderma* spp. umożliwiała okresowe mnożenie się grzybów z rzędów *Mortierellales* i *Mucorales* i lokalne (najczęściej z *F. solani*) mnożenie się *Penicillium* spp. Niniejsza praca jest pierwszą zwracającą uwagę na fakt stymulacji rozwoju *Trichoderma* spp. przez metabolity *P. adametzii*.

Wzrost zawartości *Trichoderma* spp. w glebie był na ogół skorelowany ze wzrostem liczby chorych siewek sosny. W związku z powyższym nie można wykluczyć destrukcyjnych, a nawet patogenicznych zdolności *T. aureoviride*. W celu uzyskania odpowiedzi na pytanie czy grzyb ten

tylko osłabia kondycję siewek i zwiększa ich podatność na porażenie przez grzyby zgorzelowe, czy sam ma właściwości patogeniczne, konieczne jest przeprowadzenie badań nad jego zdolnościami infekcyjnymi.

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* występujące w środowisku naturalnym generalnie traktujemy jako pożyteczne i pożądane z uwagi na to, że są (i) oportunistycznymi, awirulentnymi symbiontami roślin, (ii) induktorami lokalnej lub systemicznej odporności roślin na patogeny i stres, (iii) stymulantami wzrostu i rozwoju tkanek, głównie w korzeniach, (iv) katalizatorami w pozyskiwaniu składników pokarmowych i odżywianiu, (v) konkurentami patogenów, (vi) pasożytami grzybów chorobotwórczych i, w efekcie, (vii) czynnikami aktywnymi naturalnej i spontanicznej albo wymuszonej biologicznej ochrony roślin [Bailey, Lumsden 1998; Harman i in. 2004]. Należy jednak zauważyć, że zjawisko obniżania kondycji roślin przez *Trichoderma* spp. zdarza się. Grzyby te mogą być również patogeniczne dla roślin. Różne gatunki z tego rodzaju powodowały choroby jabłoni, kukurydzy i roślin motylkowatych [Bailey, Lumsden 1998].

Spadek kondycji i odporności roślin rosnących w otoczeniu dużej populacji *Trichoderma* spp. może być wywołany różnymi przyczynami. Summerbell [1987] zaobserwował pasożytowanie *T. viride* Pers. i *T. polysporum* (Link ex Pers.) Rifai na *Laccaria bicolor* (Maire) Orton, będącym gatunkiem mikoryzowym świerka. W efekcie oczekiwano spadku odporności siewek świerka na choroby. Harman i in. [2004] uważają, że *Trichoderma* spp. infekując, kolonizując i rozkładając korzenie zakłóca proces odżywiania roślin, co u młodych siewek może doprowadzić do śmierci. Niektóre gatunki i szczepy *Trichoderma* spp. są słabymi induktorami odporności roślin, w efekcie czego spada odporność roślin na infekcję ze strony patogena i zwiększa się ich wrażliwość na porażenie.

Niewiele wiemy o występowaniu, właściwościach i aktywności biochemicznej *T. aureoviride*, które mogłoby pomóc w wyjaśnieniu negatywnego wpływu tego grzyba na kondycję siewek sosny, bowiem nie jest to gatunek przyciągający uwagę świata. Nie posiada cech *T. harzianum*, *T. reesei* E. G. Simmons i *T. viride*, których właściwości antagonistyczne w stosunku do patogenów wywołują szerokie zainteresowanie, często z punktu widzenia wykorzystania grzybów w biopreparatach komercyjnych [Harman 2000; Hjeljord, Tronsmo 1998; Kubicek, Penttila 1998; Kwaśna, Dux 1999; Pięta i in. 2002; Sivasithamparam, Ghisalberti 1998; Sadowski i in. 2006]. *T. aureoviride* jest gatunkiem rzadkim. Lieckfeld i in. [2001] twierdzą, że występuje głównie w Wielkiej Brytanii i Holandii. Z terenu Polski, z gleby leśnej, izolowana jest rzadko. Niewykluczone, że z powodu silnej reakcji na składniki drewna, które hamują wzrost i kiełkowanie grzyba [Akpata 1987]. Naturalnie występujące szczepy *T. aureoviride* z reguły nie posiadają atrakcyjnych właściwości biochemicznych i fizjologicznych predestynujących je do wykorzystania w biologicznej ochronie roślin. Bliskie filogenetyczne pokrewieństwo *T. aureoviride* z *T. aggressivum* Samuels & W. Gams, *T. inhamatum* Veerkamp & W. Gams, *T. spirale* Bissett i *T. tomentosum* Bissett [Kullnig-Gradinger i in. 2002; Samuels i in. 2002] sugerowałyby występowanie u *T. aureoviride* cech czterech ostatnich gatunków [Bissett 1991a, b]. U nich nie tylko nie zaobserwowano właściwości antagonistycznych w stosunku do patogenów roślin, ale wręcz agresywne i destrukcyjne działanie w stosunku do kapeluszowych grzybów jadalnych. Wydaje się, że podobny agresywny stosunek może wystąpić w kontakcie z roślinami. Należy jednak zaznaczyć, że duże zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe *T. aureoviride* oraz modyfikowanie szczepów grzyba pozwoliło wykorzystać niektóre z nich w biologicznej ochronie roślin [Phuoc 1988; Barros i in. 1995; Bruce i in. 1996]. Wiemy, że *T. aureoviride* może produkować (i) znaczne ilości celulozy, β -glukozydazy (celobiaz) i chitynazy rozkładających ścianę komórkową grzybów i roślin [Harman, Kubicek 1998; Zaldívar i in. 2001; Nguyen i in. 2008], (ii) koninginin G – związek, który nawet

w bardzo małych stężeniach hamuje wzrost tkanek roślinnych [Cutler i in. 1999], oraz (iii) lotne metabolity drugorzędowe hamujące wzrost i syntezę białek u grzybów z gromady *Basidiomycota* [Humphris i in. 2002]. Koninginin G powodował znaczną (56%) inhibicję wzrostu koleoptylu u pszenicy [Cutler i in. 1999]. Delikatna budowa tkanek siewek pszenicy i sosny jest zbliżona. Można więc przypuszczać, że podobny efekt inhibitujący wzrost mógł wystąpić na siewkach iglastych.

Z faktu spadku i wzrostu populacji *Mortierellales* i *Mucorales* + *Penicillium* spp. w obecności odpowiednio dużej i mniejszej populacji *T. aureoviride* należy wnioskować, że ten ostatni może być agresywny w stosunku do obu grup grzybów. Z faktu braku obecności *C. destructans*, *F. sambucinum* oraz *R. solani* i okresowej obecności *F. oxysporum* i *F. solani* w otoczeniu dużej populacji *T. aureoviride* można wnioskować, że *T. aureoviride* jest agresywny w stosunku do trzech pierwszych patogenów i mniej agresywny w stosunku do dwóch dalszych patogenów. Ten ostatni wniosek jakby zaprzecza obserwacjom Nguyena i in. [2008], którzy stwierdzili, że chitynaza tworzona przez *T. aureoviride* degraduje ścianę komórkową i drastycznie zmniejsza kiełkowanie zarodników u *F. solani*.

Ustępowanie *Mortierellales* i *Mucorales* w glebie sterylnej z pewnością nie poprawiło kondycji siewek sosny. Generalnie grzyby z tych rzędów ograniczają wzrost grzybów zgorzelowych, a ich obecność w glebie jest pożądana [Przezbórski 1982; Mańka 1988, 1993; Mańka i in. 1989; Kacprzak 1999; Kacprzak, Mańka 2000]. Ich ustępowanie było prawdopodobnie wynikiem antybiozy i mikopasożytnictwa nie tylko ze strony *T. aureoviride*, ale również *Penicillium* spp. Grzyby z rzędów *Mortierellales* i *Mucorales* często są obiektem mikopasożytnictwa w warunkach *in vitro* i *in vivo* [Zych i in. 1969]. Wzrost ich populacji, będący efektem wyjątkowej szybkości wzrostu i rozwoju oraz specyficznych właściwości biochemicznych, mógł przyczynić się do wycofywania się patogenów glebowych oraz poprawy i utrwalenia kondycji siewek w glebie niesterylnej.

Okresowy i lokalny wzrost populacji grzybów z rodzaju *Penicillium* był połączony ze wzrostem populacji *P. citrinum* Thom, *P. daleae* Zaleski, *P. janczewskii* Zaleski i *P. spinulosum* Thom. Gatunki te *in vitro* posiadają silne właściwości antagonistyczne w stosunku do grzybów zgorzelowych. Najczęściej są one efektem ich właściwości biochemicznych i specyfiki tworzonych metabolitów [Dorenda 1974; Przezbórski 1982; Mańka 1988; Madi, Katan 1998; Venkata Dasu, Panda 1999; Park i in. 2002; Singh i in. 2002; Stępniewska 2004]. *Penicillia* dzięki zdolności indukcji procesów odpornościowych w roślinie mogą poprawiać kondycję roślin. Pomimo ich właściwości, w niniejszych badaniach nie obserwowano korelacji między wzrostem populacji *Penicillium* spp. w glebie a wyższą zdrowotnością siewek sosny.

Zmiany w strukturze glebowych zbiorowisk grzybów po wprowadzeniu płynu pohodowlanego były najprawdopodobniej wynikiem zmian w składzie chemicznym podłoża i preferencji pokarmowych grzybów. Płyn pohodowlany *P. adametzii* wzbogacił podłoże w szczególne związki organiczne (m.in. w kwasy organiczne, flawonoidy i glikozydy), zmienił pH i wywołał wymuszoną sukcesję organizmów. Zwyciężyły najbardziej wytrzymałe (np. *Trichoderma*), a ustępowały bardziej wrażliwe (np. *Mortierellales* i *Mucorales*). Obecność metabolitów *P. adametzii* sprzyjała mnożeniu się samego grzyba.

Opóźnienie wschodów siewek sosny w glebie sterylnej mogło być wywołane negatywnym wpływem związków powstałych z rozkładu resztek organicznych i połączeń mineralnych pod wpływem ciśnienia i temperatury sterylizacji. Przezbórski i in. [1985] stwierdzili, że zmiany chemiczne i mikrobiologiczne zachodzące w glebie po autoklawowaniu wpływają zdecydowanie niekorzystnie na kiełkowanie nasion i wzrost siewek sosny. Wyniki badań sugerują, że autoklawowana gleba mogła nie sprzyjać również samym patogenom, które mogły w niej egzystować, ale nie tworzyły szczególnie dużego potencjału inokulacyjnego.

Wnioski

- ✦ Metabolity *Penicillium adametzii* nie wpływały na szybkość wzrostu większości grzybów zgorzelowych z rodzaju *Cylindrocarpon* i *Fusarium* (Ascomycota) oraz *Rhizoctonia solani* (Basidiomycota) *in vitro*.
- ✦ Metabolity *P. adametzii* stosowane do podlewania siewek sosny inokulowanych grzybami zgorzelowymi opóźniają wschody i poprawiają zdrowotność siewek w pierwszych 3-5 tygodniach.
- ✦ W glebie leśnej metabolity *P. adametzii* okresowo zwiększają liczebność grzybów z rodzaju *Trichoderma* (głównie *T. aureoviride*), z rzędów *Mortierellales* i *Mucorales* oraz z rodzaju *Penicillium*.

Literatura

- Akpata T. V. 1987. Effects of sawdust pollution on the germination of fungal spores in Lagos Lagoon. Environmental Pollution 44: 37-48.
- Alabouvette C., Olivain C., Steinberg C. 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. Eur. J. Plant Pathol. 114: 329-341.
- Allen M. C., Haenseler C. M. 1935. Antagonistic action of *Trichoderma* on *Rhizoctonia* and other soil fungi. Phytopath. 25: 244-252.
- Bailey B. A., Lumsden R. D. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. W: Harman G. E., Kubicek C. P. [red.]. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor & Francis, London. 185-204.
- Baker K. F., Cook R. J. 1974. Biological control of plant pathogens. San Francisco: Freeman.
- Barros S. T., Oliveira N. T., Bastos S. T. G. 1995. *Trichoderma* spp. in the biological control of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scribb, agent of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) anthracnose. Bol. Micologico 10 (1/2): 5-11.
- Bissett J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. In frageneric classification. Canadian Journal of Botany 69: 2357-2372.
- Bissett J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Sect. Pachybasium. Canadian Journal of Botany 69: 2373-2417.
- Bruce A., Knudzewicz A., Wheatley R. 1996. Influence of culture age on the volatile organic compounds produced by *Trichoderma aureoviride* and associated inhibitory effects on selected wood decay fungi. Materiel and Organismen 30: 337-353.
- Cutler H. G., Cutler S. J., Ross S. A., El Sayed K., Dugan F. M., Bartlett M. G., Hill A. A., Hill R. A., Parker S. R. 1999. Koniginin G, a new metabolite from *Trichoderma aureoviride*. J. Nat. Prod. 62 (1): 137-139.
- Doreda M. 1974. Badania fitopatologicznego aspektu mikoflory kształtującej w środowisku uprawnym pod wpływem zmianowania. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 160: 74-80.
- Harman G. E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Dis. 84: 377-393.
- Harman G. E., Howell C. R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. 2004. *Trichoderma* spp. opportunistic avirulent plant symbionts. Nature Microbiol. Rev. 2: 43-56.
- Harman G. E., Kubicek C. P. [red.]. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor & Francis, London. 393-396
- Hjeljord L., Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. W: Harman G. E., Kubicek C. P. [red.]. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor & Francis, London. 131-151.
- Humphris S. N., Bruce A., Buultjens E., Wheatley R. E. 2002. The effects of volatile microbial secondary metabolites on protein synthesis in *Serpula lacrymans*. FEMS Microbiology Letters 210: 215-219.
- Johnson L. F. 1957. Effect of antibiotics on the numbers of bacteria and fungi isolated from soil by the dilution-plate method. Phytopathology 47: 630-631.
- Johnson L. F., Mańka K. 1961. Modification of Warcup's soil plate method for isolating soil fungi. Soil Sci. 92: 79-83.
- Kacprzak M. 1999. Zbiorowiska grzybów glebowych wybranych szkółek leśnych a zagrożenie siewek sosny zyczejnej (*Pinus sylvestris* L.) infekcyjną zgorzelą w zależności od niektórych warunków środowiska glebowego. Maszynopis pracy doktorskiej. Wydział Leśny Akademii Rolniczej w Poznaniu.
- Kacprzak M., Mańka M. 2000. Effect of soil fungi communities on the growth of damping-off pathogens in the relation to incubation temperature and medium pH. Acta Mycol. 35 (2): 275-290.

- Kubicek C. P., Penttila M. E. 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. W: Harman G. E., Kubicek C. P. [red.]. *Trichoderma and Gliocladium*. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor & Francis, London. 49-71.
- Kullnig-Gradinger C. M., Szakaacs G., Kubicek C. P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol. Res.* 106: 757-767.
- Kwaśna H. 1987. Możliwość użycia saprofitycznych grzybów do ochrony siewek sosny zwyczajnej przed zgorzelą powodowaną przez *Fusarium oxysporum* Schl. *Rhizoctonia solani* Kühn. *Roczn. Nauk Roln. E.* 17 (1): 117-133.
- Kwaśna H. 1995. Fungal communities in soil beneath Scots pine and their stumps. Effect of fungi on *Heterobasidion annosum* and *Armillaria ostoyae* growth. *Acta Mycol.* 30: 193-205.
- Kwaśna H. 1996a. Mycobionta of birch and birch roots and their possible effect to the infection by *Armillaria* spp. (Romagn.) Herink growth. Part I. *Acta Mycol.* 31: 101-110.
- Kwaśna H. 1996b. Mycobionta of birch and birch roots and their possible effect to the infection by *Armillaria* spp. (Romagn.) Herink growth. Part II. *Acta Mycol.* 31: 110-122.
- Kwaśna H. 1997a. Fungi on the surface of roots of Scots pine and its stumps and their effect on *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. and *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink growth. *Pol. Agric. Ann.* 26: 109-123.
- Kwaśna H. 1997b. Antagonistic effect of fungi from Scots pine stumps roots against *Heterobasidion annosum* and *Armillaria ostoyae*. *Acta Mycol.* 32: 369-381.
- Kwaśna H. 1997c. Antagonistic effect of fungi communities from Scots pine fine roots on *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. and *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink growth. *Phytopathol. Pol.* 13: 133-146.
- Kwaśna H. 2004. Natural shifts in communities of rhizosphere fungi of common oak after felling. *Plant soil* 264: 209-218.
- Kwaśna H., Dux J. 1999. Możliwość ograniczenia zgorzeli siewek sosny zwyczajnej przez *Trichoderma* spp. *Sylwan* 143 (2): 83-87.
- Kwaśna H., Kotyńska U., Łakomy P., Mallett K. 2001a. Stimulation of *Armillaria rhizomorph* growth by oak root fungi. *Acta Mycol.* 36 (2): 257-272.
- Kwaśna H., Mańka M., Sierota Z., Łakomy P., Szewczyk W. 2001b. Określenie czynników wpływających na zagrożenie chorobowe drzewostanów ze strony opieńki oraz sposobów przeciwdziałania im. Akademia Rolnicza w Poznaniu, IBL. Poznań-Warszawa.
- Kwaśna H., Sierota Z. 1999. Structure of fungal communities in barren post agricultural soil 1 and 2 years after pine sawdust application. *Phytopathol. Pol.* 15: 126-130.
- Kwaśna H., Sierota Z., Bateman G. L. 2000. Fungal communities in fallow soil before and after amending with pine sawdust. *Appl. Soil Ecol.* 14: 177-182.
- Lieckfeld E., Kullnig C. M., Kubicek C. P., Samuels G. J., Börner T. 2001. *Trichoderma aureoviride*: phylogenetic position and characterization. *Mycological Research* 105: 313-322.
- Madi L., Katan J. 1998. *Penicillium janczewskii* and metabolites, applied to leaves, elicit systemic acquired resistance to stem rot caused by *Rhizoctonia solani*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53: 163-175.
- Mańka K. 1964. Próby dalszego udoskonalenia zmodyfikowanej metody Warcupa izolowania grzybów z gleby. *Prace Kom. Nauk Rol. i Kom. Nauk Leśn. PTPN.* 17 (1): 30-43.
- Mańka K. 1974. Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 160: 9-23.
- Mańka K. 1988. Wpływ środowiska na choroby roślin. *Rocznik Nauk Rolniczych Ser. E* 18 (11): 11-16.
- Mańka K., Gierczak M. 1972. Możliwość użycia grzyba *Mycelium radialis atrovirens* Melin do biologicznego zwalczania zgorzeli siewek. *Prace Kom. Nauk Rol. i Kom. Nauk Leśn. PTPN* 25: 197-205.
- Mańka K., Przezbórski A. 1978. Biologiczne zwalczanie zgorzeli siewek sosny zwyczajnej za pomocą grzyba *Mycelium radialis atrovirens* Melin. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 213: 34-45.
- Mańka K., Przezbórski A., Kwaśna H., Żółtańska E. 1989. Badania nad wpływem mieszanin grzybów saprofitycznych na grzyby powodujące zgorzel siewek sosny pospolitej. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 374: 266-281.
- Mańka M. 1993. Zgorzel siewek drzew leśnych. *Poradnik Leśnika, Seria A: Ochrona Lasu*, Wyd. ARCARUS, Poznań.
- Mańka M., Kacprzak M. 1998. Środowiskowe uwarunkowania wzrostu *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum* i *F. solani*. W: *Profilaktyka i terapia w szkółkach leśnych zagrożonych przez choroby infekcyjne*. Materiały konferencji naukowo-technicznej 25-25 III 1998, Warszawa-Śękocin. 10-12.
- Mańka M., Stępniewska S., Kacprzak M. 2001. Soil fungal communities from forest nursery versus damping-off pathogens. W: *Proceedings of the 5th Congress of the European Foundation for Plant Pathology, Biodiversity in Plant Pathology, Taormina-Giardini Naxos, Italy 18-22 September 2000.* 479-482.
- Martin J. P. 1950. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method of estimating soil fungi. *Soil Sci.* 69: 215-232.
- Nguyen N. V., Kim Y. J., Oh K. T., Jung W. J., Park R. D. 2008. Chitinases from *Trichoderma aureoviride* DY-59 and *Rhizopus microsporus* VS-9. *Current Microbiology* 56 (1): 28-32.
- Park J. Y., Okada G., Takahashi M., Oyaizu H. 2002. Screening of fungal antagonists against yellows of cabbage caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Mycoscience* 43 (6): 447-451.

- Phuoc K. 1988. Effect of *Trichoderma* spp. on tomato root and stem rot. Assessment of *Trichoderma* populations in conidial suspension on PDA revealed that conidial. ARC Training 1-11.
- Pięta D., Patkowska E., Pastucha A., Bełkot M. 2002. Wpływ mikroorganizmów antagonistycznych na ograniczenie porażenia soi przez grzyby chorobotwórcze przebywające w glebie. Hort. Cult. 1 (1): 23-30.
- Przezbórski A. 1982. Terenowe i laboratoryjne badania nad możliwościami biologicznej ochrony sosny zwyczajnej przed zakaźną zgorzelą siewek. Roczn. AR. Pozn. Rozpr. Nauk 124: 1-103.
- Przezbórski A., Kwaśna H., Żółtańska E. 1985. Próba rekultywacji substratu naturalnego po dwukrotnej sterylizacji chemicznej, ocenianej wydajnością i zdrowotnością siewek sosny zwyczajnej. Prace Kom. Nauk Roln. i Kom. Nauk Leśn. PTPN 62: 145-152.
- Sadowski C., Lenc L., Korpala W. 2006. Out of investigations on vegetable seed coating with *Trichoderma viride* and plant health in organic system. J. Res. Appl. Agric. Eng. 51 (2): 150-154.
- Samuels G. J., Dodd S. L., Gams W., Castlebury L. A., Petrini O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia 94: 146-170.
- Sierota Z., Małecka M., Stoeka T. 2004. Choroby infekcyjne. W: Krótkoterminowa prognoza występowania ważniejszych szkodników i chorób infekcyjnych drzew leśnych w Polsce w 2004 roku. Warszawa. 94-111.
- Singh R., Singh B. K., Upadhyay R. S., Rai B., Su Lee Y. 2002. Biological control of *Fusarium*. Wilt Disease of Pigeonpea. J. Plant Pathol. 18 (5): 1.
- Sivasithamparam K., Ghisalberti E. L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. W: Harman G. E., Kubicek C. P. [red.]. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor & Francis, London. 139-191.
- Stępniewska S. 2004. Charakterystyka populacji grzybów *Rhizoctonia*, sprawców zgorzeli siewek sosny, z uwzględnieniem wpływu zbiorowisk grzybów glebowych na te patogeny. Maszynopis pracy doktorskiej. Wydział Leśny Akademii Rolniczej w Poznaniu.
- Summerbell R. C. 1987. The inhibitory effect of *Trichoderma* species and other soil microfungi on formation of mycorrhiza by *Laccaria bicolor* *in vitro*. New Phytologist 105: 437-448.
- Szynkiewicz-Wronek A., Kwaśna H., Sz wajkowska-Michałek L., Perkowski J. 2006. Populacja *Penicillium adametzii* Zaleski w otoczeniu korzeni buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) i wpływ grzyba na *Armillaria* spp. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu. 546 seria Rolnictwo 89: 339-347.
- Venkata Dasu V., Panda T. 1999. Studies on production of griseofulvin. Bioprocess and Biosystems Engineering 21: 489-495.
- Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology 22: 837-845.
- Weindling R. 1934. Studies on a lethal principal effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology. 24: 1153-1179.
- Weindling R., Fawcett H. S. 1936. Experiments in the control of *Rhizoctonia* damping-off of citrus seedlings. Hilgardia 10: 1-16.
- Williams L. E., Schmitthenner A. F. 1960. Effect of growing crops and crop residues on soil fungi and seedling blights. Phytopathology 50: 22-24.
- Zajączkowski P. 2008. Duże wypierają małe. Las Polski 7: 14-15.
- Zaldívar M., Velásquez J. C., Contreras I., Pérez L. M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. Electron. J. Biotechnol. 4: 3-8.
- Zych H., Siepmann R., Linnemann G. 1969. Mucorales. Eine Beschreibung aller gattungen und arten dieser pilzgruppe. D-3301 Lehre Verlag von J. Cramer.

SUMMARY

Can *Penicillium adametzii* decrease the damping-off in pine?

Biological methods of protection belong to the most environment-friendly. Laboratory tests enabled to detect decrease in growth of pathogens caused by *Penicillium* spp. fungi, especially by *Penicillium adametzii* Zaleski. Hampering influence of *P. adametzii* inoculum and isolates on growth and development of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref and *Armillaria* was observed [Mańka 1974; Kwaśna i in. 2001; Szynkiewicz-Wronek i in. 2006], which was crucial as far as it is very popular fungus in forest soils.

Mixture of the *Penicillium adametzii* metabolites present in the chloroform extract usually did not inhibit the growth of damping-off fungi, including *C. destructans*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. solani* and *R. solani*, *in vitro*. Extract from the *P. adametzii* liquid culture: (i) protected the inoculated pine seedlings from the damping-off only temporarily, (ii) decreased the health of the non-inoculated seedlings, (iii) caused the temporary increases of the fungal population in soil, (iv) changed structure of the soil fungi communities, and (v) caused the continuous increase of *Trichoderma*, mostly *T. aureoviride* population. Increased damping-off was connected with the increase of *T. aureoviride* population in soil. Natural isolates of *P. adametzii* cannot be considered as the effective biological factor in the biological control of damping-off.