

## WPŁYW TEMPERATURY INKUBACJI NA ROZWÓJ I STOSUNKI BIOTYCZNE MIĘDZY *Trichoderma* spp. A GRZYBAMI PATOGENICZNYMI

Joanna Dłużniewska

Akademia Rolnicza w Krakowie

**Streszczenie.** W przeprowadzonym doświadczeniu badano wpływ temperatury inkubacji na wzrost grzybni, kiełkowanie zarodników oraz indywidualny efekt biotyczny (IEB) grzybów *Trichoderma harzianum*, *T. pseudokoningii* i *T. viride*. Temperatury w zakresie 5-15°C hamowały wzrost grzybni i tworzenie strzępek kiełkowych badanych izolatów *Trichoderma* spp. Również wartość IEB zależała od temperatury. Wszystkie izolaty *Trichoderma* spp. silnie ograniczały wzrost patogenów tylko w temperaturze 20°C.

**Słowa kluczowe:** *Trichoderma* spp., temperatura, rozwój, efekt biotyczny

### WSTĘP

W grupie czynników biologicznych ograniczających rozwój patogenów roślin ważną rolę spełniają grzyby antagonistyczne zaliczane do rodzaju *Trichoderma* [Pietr 1997]. Grzyby te łączą w sobie wiele cech dobrego antagonisty, do których należy: szybki wzrost, obfite zarodnikowanie, powszechne występowanie w środowisku glebowym, tworzenie substancji fungitoksycznych (głównie antybiotyków peptydowych), produkcja enzymów hydrolitycznych i celulolitycznych, możliwość egzystencji na wielu substratach, łatwość w wykorzystaniu wielu związków organicznych i nieorganicznych oraz zdolność do pasożytnictwa. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są silnymi antagonistami pasożytniczych grzybów glebowych z rodzaju: *Pythium*, *Verticillium*, *Gaeumannomyces*, *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, powodujących u roślin zgorzele siewek, gnicie korzeni oraz więdnienie prowadzące do zamierania roślin [Pietr 1997]. Z tych powodów grzyby z rodzaju *Trichoderma* wykorzystuje się do produkcji biopreparatów, które mogą być użyte do: zaprawiania nasion, cebul lub bulw, opryskiwania części nadziemnych roślin, wprowadzania do uprawnego środowiska glebowego albo indukowania odporności roślin [Pięta 1997]. Dotychczas zarejestrowano 14 biofungicydów opartych na 7 gatunkach grzybów

i bakterii. Jednak biopreparaty stanowią zaledwie 1% znajdujących się w sprzedaży środków do ochrony roślin, a biofungicydy nadal nie są liczącym się na rynku produktem. Roczna wartość ich sprzedaży nie przekracza 5 milionów dolarów [Orlikowski i in. 2002].

Zasadniczym problemem walki biologicznej jest bowiem utrzymanie populacji antagonisty i jego zdolności biokontrolujących na odpowiednim poziomie ilościowym i jakościowym, gwarantującym skuteczność działania w zmiennych warunkach środowiska. W celu ustalenia możliwości i ograniczeń stosowania biopreparatów wykorzystujących antagonistyczne oddziaływanie grzyba *Trichoderma* spp. w stosunku do wielu grzybów patogenicznych konieczne jest poznanie wpływu różnych czynników środowiska na reakcje tych mikopasożytów. Rozwój grzybów z rodzaju *Trichoderma* jest uwarunkowany czynnikami abiotycznymi, takimi jak pH gleby, wilgotność, przebieg temperatury, oraz biotycznymi, czyli oddziaływaniem na siebie mikroorganizmów saprofitycznych i patogenicznych, zasiedlających środowisko glebowe rośliny-gospodarza. Temperatura, wpływając na prawie każdy rodzaj aktywności grzyba, odgrywa ważną rolę w rozwoju zarówno grzybów antagonistycznych, jak i patogenicznych [Orlikowski i Skrzypczak 1995, Hannusch i Boland 1996, Mańka i Kacprzak 1997]. Z tego powodu podjęto badania nad wpływem temperatury inkubacji na wzrost, kiełkowanie zarodników i aktywność antagonistyczną wybranych gatunków *Trichoderma*.

## MATERIAŁ I METODY

Do badań wybrano następujące gatunki grzybów antagonistycznych: *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma pseudokoningii* Rifai, *Trichoderma viride* Pers. ex Gray oraz patogenicznych: *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium solani* Sacc. oraz *Rhizoctonia solani* Kühn. Izolaty grzybów uzyskano z gleb użytkowanych rolniczo. We wszystkich opisanych poniżej doświadczeniach temperatury inkubacji wynosiły 5, 10, 15 lub 20°C.

Wpływ temperatury na tempo wzrostu grzybów z rodzaju *Trichoderma* badano wyszczepiając na pożywkę glukozowo-ziemniaczaną (PDA) inokulum badanych grzybów *Trichoderma* spp. Inkubację prowadzono do momentu, aż w kombinacji przetrzymywanej w temperaturze 20°C grzybnia zarosła całą szalkę. Na podstawie wyników uzyskanych z codziennych pomiarów średnic kolonii obliczano indeks tempa wzrostu [Burgieł 1984]. Również zdolność zarodników grzybów z rodzaju *Trichoderma* do kiełkowania w zróżnicowanych temperaturach oceniono metodą opisaną w tej pracy. Sporządzano wodną zawiesinę zarodników pobranych z dwutygodniowych kultur. Po 24 godzinach inkubacji zatrzymywano proces kiełkowania przez dodanie kropli formaliny. Następnie oceniano stopień skiełkowania zarodników według skali i na podstawie uzyskanych wyników obliczano indeks kiełkowania zarodników [Burgieł 1984].

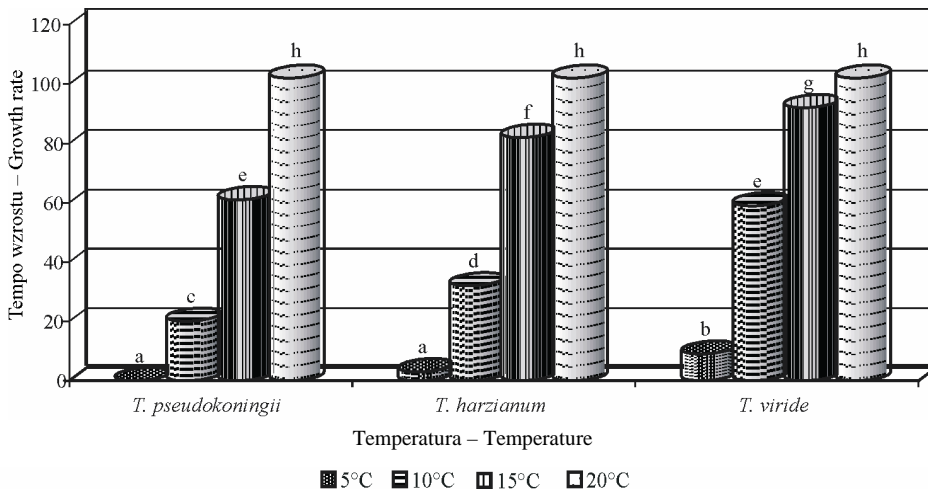
Doświadczenia wykonywano w 4 powtórzeniach, a ich wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji dla doświadczeń dwuczynnikowych (czynnik A – temperatura, czynnik B – gatunek *Trichoderma*). Istotność weryfikowano testem Duncana.

Wpływ temperatury na wzajemne relacje między grzybami antagonistycznymi, traktowanymi badanymi czynnikami, a patogenami *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* określano metodą szeregów biotycznych według Mańki [1974]. W centrum płytki Petriego z pożywką PDA wyszczepiano inokulum grzyba z rodzaju *Trichoderma* i w odległości 2 cm inokulum grzyba patogenicznego (4 powtórzenia). W kombinacjach kontrolnych wyszczepiano inokulum każdego grzyba osobno (2 po-

wtórzeń). Po 10 dniach inkubacji oceniano każdą kombinację, uwzględniając trzy parametry: stopień otoczenia kolonii jednego grzyba przez drugiego, strefę inhibicji i zmniejszenie kolonii w stosunku do kombinacji kontrolnej. W przypadku dominacji grzyba saprofitycznego przyznawano znak “+” (efekt pozytywny), natomiast grzyba patogenicznego znak “-” (efekt negatywny). W przypadku braku przewagi jednej z kolonii przyznawano ocenę “0”. Uzyskane oceny dawały łącznie indywidualny efekt biotyczny (IEB), obrazujący wpływ danego izolatu *Trichoderma* spp. na wzrost patogena.

## WYNIKI

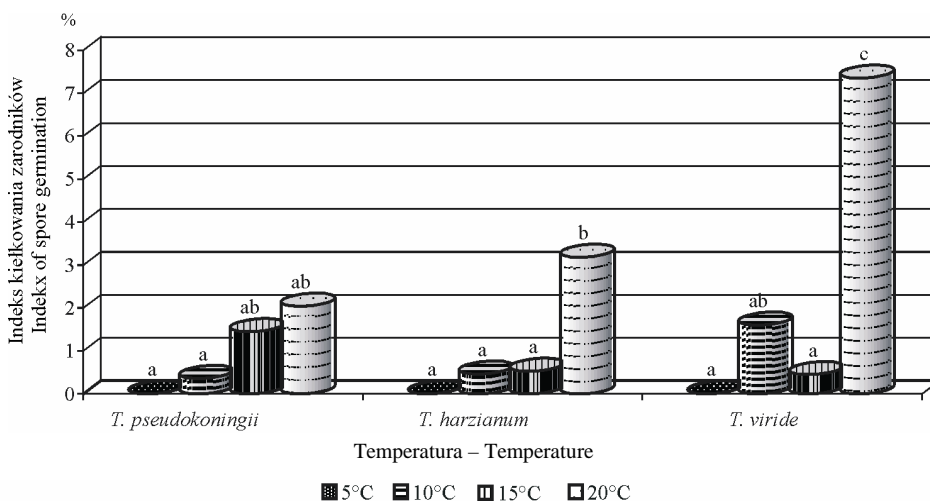
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że tempo wzrostu, kiełkowanie zarodników oraz antagonizm badanych grzybów zależały od temperatury. Analiza wartości indeksu tempa wzrostu wykazała, że temperatura 20°C była najbardziej optymalna dla wzrostu grzybni wszystkich izolatów *Trichoderma* spp. (rys. 1). W temperaturze 5°C wzrost kolonii *Trichoderma* spp. był silnie zahamowany. Istotne różnice w tempie wzrostu grzybni między poszczególnymi mikopasożytami wystąpiły w temperaturach 10 i 15°C. Wśród badanych grzybów izolat *T. viride* charakteryzował się istotnie większym tempem wzrostu w temperaturach 5, 10 i 15°C.



kolumny oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie według testu Duncana ( $p = 0,05$ ) – columns marked with the same letter are not statistically different following verification with Duncan test ( $p = 0.05$ )

Rys. 1. Tempo wzrostu grzybów z rodzaju *Trichoderma* w różnych temperaturach inkubacji  
Fig. 1. Growth rate of *Trichoderma* spp. fungi depending on incubation temperatures

W temperaturze 5°C kiełkowanie zarodników izolatów *Trichoderma* spp. było całkowicie zatrzymane (rys. 2). Wzrost temperatury inkubacji do 10 i 15°C skutkowało tworzeniem strzępek kiełkowych przez te grzyby. Jednak zarodniki kiełkowały słabo i nie obserwowano istotnych różnic między gatunkami. Dopiero w temperaturze 20°C zanotowano istotne zwiększenie tempa tworzenia strzępek kiełkowych u grzybów *T. pseudokoningii* i *T. viride*.



objaśnienia jak w rysunku 1 – for explanations, see Figure 1

Rys. 2. Kiełkowanie zarodników grzybów z rodzaju *Trichoderma* w różnych temperaturach inkubacji

Fig. 2. Spore germination of *Trichoderma* spp. fungi depending on incubation temperature

Ocena indywidualnego efektu biotycznego (IEB) wykazała, że temperatura oddziaływała na wzajemne relacje w układzie antagonista – patogen (tab. 1). Wszystkie badane grzyby z rodzaju *Trichoderma* najsilniej ograniczały rozwój patogenów w temperaturze 20°C. Obniżenie temperatury inkubacji do 10 i 15°C spowodowało wyraźny spadek lub zanik aktywności antagonisticznej u izolatów *T. pseudokoningii* i *T. harzianum*. W temperaturze 5°C jedynie izolat *T. viride* zachował, chociaż w zmniejszonym zakresie, zdolność do ograniczania wzrostu grzybów patogennych.

Tabela 1. Indywidualny efekt biotyczny grzybów z rodzaju *Trichoderma* w różnych temperaturach inkubacji

Table 1. Individual biotic effect of *Trichoderma* spp. depending on incubation temperature

Temperatura inkubacji, °C Incubation temperature	<i>T. pseudokoningii</i>			<i>T. harzianum</i>			<i>T. viride</i>		
	<i>R.s.*</i>	<i>B.c.</i>	<i>F.s.</i>	<i>R.s.</i>	<i>B.c.</i>	<i>F.s.</i>	<i>R.s.</i>	<i>B.c.</i>	<i>F.s.</i>
5	0	-2	-1	+2	-6	-1	+3	+2	+3
10	+2	-5	-1	+4	-2	+2	+7	+4	+6
15	+3	+3	+3	+4	+2	+4	+6	+4	+7
20	+7	+8	+7	+5	+6	+7	+7	+8	+7

\* *R.s.* – *Rhizoctonia solani*, *B.c.* – *Botrytis cinerea*, *F.s.* – *Fusarium solani*

## DYSKUSJA

W prezentowanej pracy stwierdzono, że temperatury 5, 10 i 15°C niekorzystnie wpływały na rozwój i aktywność biologiczną *Trichoderma* spp. Podobnie obniżenie

tempa wzrostu grzybni *T. harzianum* i *T. aureoviride* przy 3, 10 i 15°C obserwowano również Przybył [1993]. Temperatura wydaje się mieć nawet większy wpływ na wzrost grzybów niż odczyn podłoża [Kacprzak i Mańka 1997]. Przy 20 i 25°C wzrost grzybni *T. viride* i *T. koningii* był szybszy niezależnie od pH pożywki.

Dane literaturowe również wskazują na duży wpływ temperatury na antagonizm Trichoderma spp. Stwierdzono, że temperatury optymalne dla wybranych szczepów *Trichoderma* spp. są istotnie wyższe niż dla grzybów patogenicznych [Naar i Kecskes 1995]. Izolat *T. harzianum* silnie ograniczał wzrost *Ophiosoma quercu* przy 20 i 25°C, natomiast takiego działania nie obserwowano w temperaturach 3-15°C [Przybył 1993]. Z kolei inne badania wskazują, że wraz ze wzrostem temperatury malała zdolność zbiorowisk grzybów do ograniczania wzrostu patogenów *Fusarium solani* i *F. culmorum* [Kacprzak i Mańka 1997]. Temperatury w zakresie 10-35°C nie miały natomiast wpływu na wartość IEB grzybów z rodzaju *Trichoderma* i *Penicillium* wobec *Fusarium oxysporum* [Frużyńska-Józwiak i Mańka 1994]. Zmienne reakcje w układzie antagonisty – patogen mogą wynikać ze zróżnicowania izolatów grzybów, będących elementami tego układu. Obserwowano, że jedne izolaty *T. harzianum* i *Zygorhynchus moelleri* oddziaływały silnie biotycznie we wszystkich temperaturach, podczas gdy inne izolaty tych samych grzybów glebowych wykazywały silne oddziaływanie tylko w określonym zakresie temperatury [Weber i in. 1996]. Powodem zmian w antagonizmie grzybów *Trichoderma* spp. może być zmiana pod wpływem temperatury składu kompleksów enzymatycznych, które są jednym z elementów mikopasożytniczego działania *Trichoderma* spp. [Janas i Targoński 1995].

Uzyskane w przedstawionej pracy wyniki wskazują, że temperatura należy do ważnych czynników decydujących o właściwościach biologicznych grzybów z rodzaju *Trichoderma*. Sugeruje to, że przeszkodę w biologicznej ochronie roślin przed patogenami powodującymi zgorzele siewek może stanowić m.in. niska temperatura gleby w okresie wschodów roślin. Dlatego też chemiczne zaprawianie materiału siewnego pozostanie nadal jedną z najczęściej stosowanych metod ochrony roślin w czasie wschodów. Wydaje się, że biopreparaty oparte na *Trichoderma* spp. mają większe perspektywy stosowania w ochronie roślin uprawianych w szklarni, gdzie pewne czynniki są kontrolowane, a nie na polu, gdzie nie ma możliwości wpływu m.in. na temperaturę. Inną możliwością jest poszukiwanie takich izolatów grzybów z rodzaju *Trichoderma*, które mimo niekorzystnych warunków środowiska nie będą traciły swoich właściwości antagonistycznych.

## WNIOSKI

Temperatury inkubacji 5, 10 i 15°C wpływają na obniżenie tempa wzrostu grzybni, kiełkowania zarodników i antagonizmu wybranych grzybów z rodzaju *Trichoderma*. Przeszkodę w biologicznej ochronie roślin przed patogenami powodującymi zgorzele siewek może stanowić m.in. niska temperatura gleby w okresie wschodów roślin. Biopreparaty oparte na *Trichoderma* spp. mają większe perspektywy stosowania w uprawach szklarniowych lub pod osłonami niż w warunkach polowych.

## PIŚMIENNICTWO

- Burgiel Z., 1984. Wpływ niektórych herbicydów na występowanie i rozwój patogenów powodujących choroby podszuszkowe pszenicy ozimej. Cz. II. Rozwój patogenów. Acta Agr. Silv., Agraria XXIII, 187-196.
- Frużyńska-Jóźwiak D., Mańka M., 1994. Biotic series method for evaluation of soil fungi effect on plant pathogenic fungi II. Effect of medium pH, medium amendments and temperature on individual biotic effect value. Phytopathol. Polonica 7 (XIX), 131-136.
- Hannusch D.J., Boland G.J., 1996. Influence of air temperature and relative humidity on biological control of the mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). Phytopathol. 86 (2), 156-162.
- Janas P., Targoński Z., 1995. Effect of temperature on the production of cellulase, xylanases and litic enzymes by selected *Trichoderma reesei* mutants. Acta Mycol. 30 (2), 255-264.
- Kacprzak M., Mańka M., 1997. Wpływ pH pożywki i temperatury inkubacji na stosunki biotyczne między zbiorowiskami grzybów glebowych ze szkółki leśnej a patogenami *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. i *Fusarium culmorum* Sacc. Drobnoustroje w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie, Praca pod red. W. Barabasz, 259-277.
- Mańka K., 1974. Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 160, 9-23.
- Mańka M., Kacprzak M., 1997. Effect of incubation temperature and medium pH on biotic relations between soil fungi communities and *Rhizoctonia solani* Kühn. Mat. VIII Conf. of the Section for Biological Control of Plant Diseases of the Polish Phytopath. Soc., Skierniewice, 42-47.
- Naar Z., Kecskes M., 1995. A method for selecting *Trichoderma* strains antagonistic against *Sclerotinia minor*. Microbiological-Res. 150 (3), 239-246.
- Orlikowski L.B., Skrzypczak Cz., 1995. Occurrence and control of *Rhizoctonia rot* on *Ficus pumila*. Phytopathol. Polonica 9 (XXI), 29-35.
- Orlikowski L.B., Skrzypczak Cz., Wojdyła A., Jaworska-Marosz A., 2002. Wyciągi roślinne i mikroorganizmy w ochronie roślin przed chorobami. Zesz. Nauk. AR w Krakowie, Rolnictwo 82, 19-32.
- Pietr S.J., 1997. The mode action of *Trichoderma*: short summary. Mat. VIII Conf. of the Section for Biological Control of Plant Diseases of the Polish Phytopath. Soc., Skierniewice, 7-14.
- Pięta D., 1997. Niektóre aspekty wykorzystania mikroorganizmów antagonistycznych do zwalczania chorób roślin. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Sect. EEE, Horticultura V, 1-8.
- Przybył K., 1993. Comparison in different temperatures on growth rate of *Trichoderma* spp. and some fungi isolated from declining oak-trees. Biotechnol. 1 (20), 27-31.
- Weber Z., Werner M., Frużyńska-Jóźwiak D., 1996. Biotic effect of some selected fungi on different formae speciales of *Fusarium oxysporum* Schlecht. Phytopathol. Polonica 11, 127-133.

## EFFECT OF INCUBATION TEMPERATURE ON DEVELOPMENT AND BIOTIC RELATIONS BETWEEN *Trichoderma* spp. AND PATHOGENIC FUNGI

**Abstract.** The present experiment investigated the effect of incubation temperature on growth of mycelium, spore germination and on the individual biotic effect (IBE) of *Trichoderma harzianum*, *T. pseudokoningii* and *T. viride* fungi. The incubation temperature from 5 to 15°C inhibited mycelium growth and sporogenous hypha formation of the isolates researched. Also the IBE value depended on temperature. All *Trichoderma* spp. isolates strongly inhibited the growth of pathogens only at the temperature of 20°C.

**Key words:** *Trichoderma* spp., temperature, development, biotic effect

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.03.2004