

## Effect of *Trichoderma* on mycelium development of selected *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach strains

### Wpływ grzybów rodzaju *Trichoderma* na rozwój grzybni wybranych odmian *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach

Romuald Górski<sup>1</sup>, Krzysztof Sobieralski<sup>2</sup>, Marek Siwulski<sup>2</sup>, Iwona Sas-Golak<sup>2</sup>, Daniel Lewandowski<sup>2</sup>

#### Summary

Effect of *Trichoderma* isolates on mycelium development of some strains of *Agaricus bisporus* was investigated. The following strains of *A. bisporus* were examined: Amycel 2000, Polmycel 22, Irlandzka 501, Sylvan 130, Le Lion X13 and Somycel 516. The *Trichoderma* isolates belonged to several species, i.e. *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. inhamatum*, *T. koningii* and *T. viride*. The experiment was conducted on wheat agar medium. Based on individual biotic effect (IBE) varied interactions between *Trichoderma* isolates and *A. bisporus* strains were found. The obtained IBE index ranged from +2 to +8. The highest IBE index (+8) was recorded for *T. aggressivum* f. *europaeum* T. agg. 2/37 isolate in relation to all examined *A. bisporus* strains. The IBE index for *T. harzianum* T. har. 3/48 and *T. viride* T. vir. 4/29 isolates reached the value from +5 to +6. The IBE index for *T. hamatum* T. ham. 1/22 isolate ranged from +3 to +4, while for *T. inhamatum* T. inh. 5/32 isolate fluctuated from +2 to +4.

**Key words:** button mushroom; mycelium; strain; individual biotic effect

#### Streszczenie

Badano wpływ grzybów rodzaju *Trichoderma* na rozwój grzybni różnych odmian pieczarki dwuzarodnikowej *Agaricus bisporus*. Użyto następujących odmian pieczarki: Amycel 2000, Polmycel 22, Irlandzka 501, Sylvan 130, Le Lion X13, Somycel 516. Wykorzystano izolaty należące do kilku gatunków *Trichoderma*, tj. *T. aggressivum* f. *europaeum*, *T. atroviride*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. inhamatum*, *T. koningii* oraz *T. viride*. Doświadczenie przeprowadzono na pożywce agarowej pszennej. Na podstawie oceny indywidualnego efektu biotycznego (IEB) stwierdzono zróżnicowane oddziaływanie pomiędzy badanymi izolatami grzybów rodzaju *Trichoderma* oraz odmianami pieczarki. Uzyskane wartości IEB wahały się od +2 do +8. Najwyższe wskaźniki IEB (+8) w stosunku do wszystkich porównywanych odmian pieczarki stwierdzono w przypadku izolatu *T. aggressivum* f. *europaeum* T. agg. 2/37. Wskaźnik IEB w przypadku izolatów *T. harzianum* T. har. 3/48 oraz *T. viride* T. vir. 4/29 osiągnął wartość od +5 do +6. Dla izolatu *T. hamatum* T. ham. 1/22 wskaźnik IEB wahał się od +3 do +4, a dla *T. inhamatum* T. inh. 5/32 od +2 do +4.

**Słowa kluczowe:** pieczarka; grzybnia; odmiana; indywidualny efekt biotyczny

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

<sup>1</sup> Katedra Entomologii i Ochrony Środowiska

Zgorzelecka 4, 60-198 Poznań

rgorski@up.poznan.pl

<sup>2</sup> Katedra Warzywnictwa

Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań

## Wstęp / Introduction

Jednym z największych zagrożeń w uprawie pieczarki są grzyby rodzaju *Trichoderma* (Samuels i wsp. 2002; Hatvani i wsp. 2007, Kredics i wsp. 2010). Grzyby te porażają zarówno grzybnię, jak i owocniki (Hermosa i wsp. 2000; Samuels i wsp. 2002) oraz wpływają na obniżenie wielkości i jakości plonu pieczarki (Mamoun i wsp. 2000b; Savoie i wsp. 2001; Sobieralski i wsp. 2009a, 2010). Źródło zakażenia stanowi podłoże, okrywa lub grzybnia (Błażej i Tekiel 2002; Tekiel 2005; Sobieralski i wsp. 2009b). Badania przeprowadzone przez Sobieralskiego i wsp. (2010) wykazały, że izolaty *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* powodowały znacznie gorsze wiązanie zawiązków owocników pieczarki oraz obniżały plon.

Białe odmiany pieczarki uprawiane na podłożu zainfekowanym izolatami *T. aggressivum* f. *europaeum* reagowały większą obniżką plonu niż odmiany brązowe (Sobieralski i wsp. 2009a). Badania przeprowadzone w Polsce przez Błaszczak i wsp. (2011) potwierdziły występowanie w naszym kraju licznych gatunków *Trichoderma*. Jak podają Szczech i wsp. (2008) w krajowych pieczarkarniach najczęściej izolowane gatunki to: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum*, *T. aggressivum*. W Europie Środkowej duże straty w uprawie grzybów powoduje przede wszystkim *T. aggressivum* f. *europaeum* (Szczech i wsp. 2008; Sobieralski i wsp. 2009b; Kosanovic i wsp. 2013). W ostatnich latach zidentyfikowano w uprawach grzybów w Japonii nowy gatunek *Trichoderma* – *T. mienum* (Kim i wsp. 2012).

Szereg gatunków grzybów rodzaju *Trichoderma* nie wywiera dużego wpływu na plonowanie pieczarki. Stosunkowo małą patogennością charakteryzują się takie gatunki, jak: *T. viride*, *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii*, *T. hamatum* oraz *T. viride* (Seaby 1996; Fletcher i Gaze 2008).

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu różnych izolatów grzybów rodzaju *Trichoderma* na rozwój grzybni kilku odmian *Agaricus bisporus*.

## Materiały i metody / Materials and methods

W doświadczeniu użyto następujących odmian pieczarki: Amycel 2000, Polmycel 22, Irlandzka 501, Sylvan 130, Le Lion X13, Somycel 516. Izolaty różnych gatunków *Trichoderma* użytych w doświadczeniu podano w tabeli 1. Odmiany i szczepy, które posłużyły jako materiał doświadczalny, pochodziły z kolekcji grzybów Katedry Warzywnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Doświadczenie przeprowadzono na pożywce agarowej pszennej w trzech powtórzeniach.

Szczepienia dokonano na stole o laminarnym przepływie powietrza. Grzybnię grzyba testowanego i konkurencyjnego zaszczipiono na tej samej szalce Petriego w odległości 4 cm od siebie. Fragmenty zaszczipionej grzybni miały równą wielkość, co uzyskano posługując się rurkami plastikowymi o średnicy otworów 5 mm. Szalki Petriego zaszczipione pożywką inkubowano w cieplarni w stałej temperaturze 25°C, bez dostępu światła, przy wilgotności 80–85%.

Codziennie dokonywano pomiarów wzrostu grzybni badanych gatunków oraz obserwacji interakcji pomiędzy rozwijającymi się grzybniami. Ustalono oceny indywidualnego efektu biotycznego (IEB) na podstawie skali stosunków biotycznych opracowanych przez Mańkę (1974) (tab. 2). Obserwacji dokonywano w zakresie: stopnia otoczenia jednej kolonii przez drugą, szerokości strefy inhibicyjnej, ograniczenia wzrostu lub porażenia jednej kolonii przez drugą. Doświadczenie zakończono w momencie opanowania całej powierzchni pożywki przez rozwijające się kolonie, na każdej płytce.

Wynik interakcji między kolonią grzyba testowanego a kolonią grzyba konkurencyjnego wyraża się przez algebraiczne zsumowanie wszystkich możliwych punktów według przytoczonej skali ocen, tj. stopień otoczenia jednej kolonii przez drugą, szerokość strefy inhibicyjnej, ograniczenie wzrostu. Wynik dodatni oznacza wpływ ograniczający rozwój kolonii grzyba testowanego.

Tabela 1. Charakterystyka izolatów *Trichoderma* sp. pochodzących z polskich pieczarkarni  
Table 1. Characteristics of *Trichoderma* sp. isolates derived from Polish mushroom farms

Lp. No.	Gatunek Species	Symbol izolatu Isolate designation	Rok uzyskania izolatu Year of isolate collection	Miejscowość Place	Miejsce uzyskania izolatu Source of isolate
1.	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	T. agg. 2/37	2011	Skierniewice	okrywa casing soil
2.	<i>T. atroviride</i>	T. at. 7/52	2006	Lublin	podłoże substrate
3.	<i>T. harzianum</i>	T. har. 3/48	2007	Poznań	okrywa casing soil
4.	<i>T. hamatum</i>	T. ham. 1/22	2010	Leszno	podłoże substrate
5.	<i>T. inhamatum</i>	T. inh. 5/32	2008	Rakoniewice	okrywa casing soil
6.	<i>T. koningii</i>	T. kon. 8/46	2009	Leszno	podłoże substrate
7.	<i>T. viride</i>	T. vir. 4/29	2008	Mosina	okrywa casing soil

Tabela 2. Skala ocen do ustalenia indywidualnego efektu biotycznego (IEB) według Mańki (1974)  
Table 2. Score scale for the determination of individual biotic effect (IBE) (according to Mańka 1974)

Rodzaj interakcji między koloniami – Type of interaction between colonies	Punkty Points
Obydwie kolonie stykają się wzdłuż linii prostej Both colonies are in contact along straight line	0
Kolonja A styka się z kolonią B wzdłuż linii lekko krzywej tak, że otacza mniej niż 1/3 koloni A Colony A remains in contact with colony B along slightly curved line so that it surrounds less than 1/3 of colony A	+1
Kolonja A styka się z kolonią B wzdłuż linii krzywej tak, że otacza co najmniej 1/3, ale mniej niż 1/2 koloni A Colony A remains in contact with colony B along curved line so that it surrounds at least 1/3 but less than 1/2 of colony A	+2
Kolonja A styka się z kolonią B wzdłuż linii krzywej tak, że otacza co najmniej 1/2, ale mniej niż 2/3 koloni A Colony A remains in contact with colony B along curved line so that it surrounds at least 1/2 but less than 2/3 of colony A	+3
Kolonja A styka się z kolonią B wzdłuż linii krzywej tak, że otacza co 2/3 albo więcej koloni A Colony A remains in contact with colony B along curved line so that it surrounds at least 2/3 or more of colony A	+4
Każdy milimetr strefy inhibycyjnej zajęty przez kolonię A Each millimetre of the inhibition zone is occupied by colony A	+1
Kolonja B co najmniej o 1/3 lecz mniej niż o 1/2 mniejsza niż jej kolonia kontrolna rozwinięta indywidualnie na innej płytce Colony B at least by 1/3 but less than 1/2 smaller than its control colony developed individually on a separate plate	+2
Kolonja B co najmniej o 2/3 mniejsza niż jej kolonia kontrolna rozwinięta indywidualnie na innej płytce Colony B at least by 2/3 smaller than its control colony developed individually on a separate plate	+3
Kolonja B zupełnie nierozwinięta Colony B completely undeveloped	+4

Tabela 3. Indywidualny efekt biotyczny dla izolatów *Trichoderma* i odmian pieczarki  
Table 3. Individual biotic effect index for *Trichoderma* isolates and *A. bisporus* strains

Izolaty <i>Trichoderma</i> <i>Trichoderma</i> isolates	Odmiana – Strain					
	Amycel 2000	Polmycel 22	Irlandzka 501	Sylvan 130	Le Lion X13	Somycel 516
<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i> T. agg. 2/37	8	8	8	8	8	8
<i>T. atroviride</i> T. at. 7/52	4	3	3	2	3	3
<i>T. harzianum</i> T. har. 3/48	6	5	6	6	5	6
<i>T. hamatum</i> T. ham. 1/22	3	3	4	3	4	4
<i>T. inhamatum</i> T. inh. 5/32	3	2	3	2	2	3
<i>T. koningii</i> T. kon. 8/46	5	5	4	5	4	5
<i>T. viride</i> T. vir. 4/29	6	5	5	5	6	5

## Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Na podstawie oceny indywidualnego efektu biotycznego (IEB) stwierdzono wzajemne zróżnicowane oddziaływanie pomiędzy badanymi izolatami grzybów rodzaju *Trichoderma* oraz odmianami pieczarki (tab. 3). Wartości IEB, które uzyskano w trakcie badań, wahały się od +2 do +8. Najwyższe wskaźniki IEB (+8) w stosunku do wszystkich porównywanych odmian pieczarki stwierdzono w przypadku izolatu *T. aggressivum* f. *europaeum* T. agg. 2/37. Badania Mamoun i wsp. (2000a) wykazały, że istnieje chemiczna interakcja pomiędzy *A. bisporus* i *T. aggressivum*. Silne ograniczenie wzrostu i rozwoju *A. bisporus* przez grzyb *T. aggressivum* stwierdzili także Williams i wsp. (2003).

Stosunkowo wysoki wskaźnik IEB wahający się o +5 do +6 stwierdzono w przypadku izolatów *T. harzianum* T. har. 3/48 oraz *T. viride* T. vir. 4/29. Uzyskane wyniki nie potwierdzają wyników uzyskanych przez Seaby (1996), który zalicza m.in. *T. viride* do gatunków o małej patogeniczności w stosunku do pieczarki. Wskaźnik IEB

dla izolatu *T. viride* był wysoki, od +5 do +6, natomiast dla izolatu *T. hamatum* T. ham. 1/22 wahał się od +3 do +4, był więc stosunkowo niski i do pewnego stopnia zgodny ze stwierdzeniem cytowanego wyżej autora.

Najsłabszym oddziaływaniem charakteryzował się izolat *T. inhamatum* T. inh. 5/32, gdzie wartość wskaźnika IEB wahała się od +2 do +3. Jest to zgodne z wynikami licznych badań, w których wykazano istotne różnice pomiędzy odmianami pieczarki dwuzarodnikowej w odporności na grzyby rodzaju *Trichoderma* (Anderson i wsp. 2001; Chen i wsp. 2003; Sobieralski i wsp. 2009a). Uzyskane wyniki w pełni potwierdziły występowanie zróżnicowanej interakcji pomiędzy *A. bisporus* oraz grzybami rodzaju *Trichoderma* (Krupke i wsp. 2003; Savoie i Mata 2003; Williams i wsp. 2003; Largeteau i Savoie 2010).

## Wnioski / Conclusions

1. Izolat *T. aggressivum* f. *europaeum* wykazał bardzo dużą agresywność w stosunku do grzybni wszystkich badanych odmian pieczarki.

2. Stosunkowo dużą agresywność w odniesieniu do grzybni pieczarki badanych odmian wykazały izobaty *T. harzianum* oraz *T. viride*.
3. Małą agresywność w stosunku do grzybni badanych odmian wykazał izolat *T. inhamatum* oraz *T. atroviride*.
4. Stwierdzono zróżnicowaną interakcję pomiędzy grzybnią badanych odmian pieczarki oraz izolatami grzybów rodzaju *Trichoderma*.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2009–2012 jako projekt badawczy nr NN310 089037.

## Literatura / References

- Anderson M.G., Beyer D.M., Wuest P.J. 2001. Yield comparison of hybrid *Agaricus* mushroom strains as a measure of resistance to *Trichoderma* green mold. *Plant Dis.* 85 (7): 731–734.
- Błaszczak L., Popiel D., Chełkowski J., Koczyk G., Samuels G.J., Sobieralski K., Siwulski M. 2011. Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *J. Appl. Genetics* 52: 233–243.
- Błażej J., Tekiel A. 2002. Występowanie grzybów pasożytniczych i konkurencyjnych dla pieczarki [*Agaricus bisporus* (Lange) Sing] w różnych podłożach i okrywie. *Acta Sci. Pol. Hort. Cult.* 1 (2): 33–41.
- Chen X., Ospina-Giraldo M.D., Wilkinson V., Royse D.J., Romaine C.P. 2003. Resistance of pre- and post-epidemic strains of *Agaricus bisporus* to *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*. *Plant Dis.* 87 (12): 1457–1461.
- Fletcher J.T., Gaze R.H. 2008. *Mushroom Pest and Disease Control*. Manson Publishing Ltd, London, 192 pp.
- Hatvani L., Antal Z., Manczinger L., Szekeres A., Druzhinina I.S., Kubicek C.P., Nagy A., Nagy E., Vágvölgyi C., Kredics L. 2007. Green mold diseases of *Agaricus* and *Pleurotus* spp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. *Phytopathology* 97: 532–537.
- Hermosa M.R., Grondona I., Iturriaga E.A., Diaz-Minguez J.M., Castro C., Monte E., Garcia-Acha I. 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1890–1898.
- Kim C.S., Shirouzu T., Nakagari A., Sotome K., Nagasawa E., Maekawa N. 2012. *Trichoderma mienium* sp. nov., isolated from mushroom farms in Japan. *Antonie van Leeuwenhoek* 102: 629–641.
- Kosanovic D., Potocnik I., Duduk B., Vukojevic J., Stajic M., Rekanovic E., Milijasevic-Marcic S. 2013. *Trichoderma* species on *Agaricus bisporus* farms in Serbia and their biocontrol. *Ann. Appl. Biol.* 163: 218–230.
- Kredics L., Garcia Jimenez L., Naeimi S., Czifra D., Urban P., Manczinger L., Vágvölgyi C., Hatvani L. 2010. A challenge to mushroom growers, the green mould disease of cultivated champignons. In: *Curr. Res., Technol. Edu. Topics Appl. Microbiol. Microbial Biotechnol.* (A. Mendez-Vilas, ed.). Microbiology Book Series 2 (1), Formatex, Badajoz, Spain: 295–305.
- Krupke O.A., Castle A.J., Rinker D.L. 2003. The North American mushroom competitor, *Trichoderma aggressivum* f. *aggressivum*, produces antifungal compounds in mushroom compost that inhibit mycelial growth of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 107 (12): 1467–1475.
- Largeteau M.L., Savoie J.M. 2010. Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*, biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 63–73.
- Mamoun M., Savoie J.M., Olivier J.M. 2000a. Interaction between the pathogen *Trichoderma harzianum* Th2 and *Agaricus bisporus* in mushroom compost. *Mycologia* 92: 233–240.
- Mamoun M., Iapicco R., Savoie J.M., Olivier J.M. 2000b. Green mould disease in France, *Trichoderma harzianum* Th2 and other species causing damage on mushroom farms. *Mushroom Sci.* 15: 625–632.
- Mańka K. 1974. Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. *Zesz. Probl. Post. Nauk. Rol.* 160: 9–23.
- Samuels G.J., Dodd S.L., Gams W., Castelbury L.A., Petrini O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia* 94 (1): 146–170.
- Savoie J.M., Iapicco R., Largeteau-Mamoun M.L. 2001. Factors influencing the competitive saprophytic ability of *Trichoderma harzianum* Th2 in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost. *Mycol. Res.* 105: 1348–1356.
- Savoie J.M., Mata G. 2003. *Trichoderma harzianum* metabolites pre-adapt mushrooms to *Trichoderma aggressivum* antagonism. *Mycologia* 95 (2): 191–199.
- Seaby D.A. 1996. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production. *Plant Pathol.* 45: 905–912.
- Sobieralski K., Siwulski M., Frużyńska-Józwiak D., Górski R. 2009a. Impact of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* Th2 on the yielding of *Agaricus bisporus*. *Phytopathologia* 53: 5–10.
- Sobieralski K., Siwulski M., Górski R., Frużyńska-Józwiak D. 2009b. Porównanie rozwoju grzybni grzybów z rodzaju *Trichoderma* pochodzących z krajowych pieczarkarni. [Comparison of mycelium growth of *Trichoderma* genus fungi obtained from polish mushroom houses]. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 49 (2): 723–726.
- Sobieralski K., Siwulski M., Frużyńska-Józwiak D., Górski R. 2010. Impact of infection with *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* isolates on carpophore setting and yielding of *Agaricus bisporus*. *Phytopathologia* 55: 35–41.
- Szczeczek M., Staniaszek M., Habdas H., Ulinski Z., Szymański J. 2008. *Trichoderma* spp. – the cause of green mold on polish mushroom farms. *Veg. Crops Res. Bull.* 69: 105–114.
- Tekiel A. 2005. Grzyby patogeniczne w uprawie pieczarki dwuzarodnikowej *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Acta Agrobot.* 58 (2): 189–196.
- Williams J., Clarkson J.M., Mills P.R., Cooper R.M. 2003. Saprotrophic and mycoparasitic components of aggressiveness of *Trichoderma harzianum* groups toward the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (7): 4192–4199.