

Effect of *Trichoderma* isolates on primordia formation of crossbred cultures of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach

Wpływ izolatów *Trichoderma* na tworzenie zawiązków owocników kultur krzyżówkowych *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach

Romuald Górski¹, Krzysztof Sobieralski², Marek Siwulski², Iwona Sas-Golak², Daniel Lewandowski²

Summary

The aim of the studies was determination of *Trichoderma* effect on primordia formation of crossbred cultures of *Agaricus bisporus*. Isolates of two *Trichoderma* species originated from domestic mushroom farms, i.e. *T. aggressivum* f. *europaum* and *T. hamatum* were used. The assessment of the primordia formation was carried out in glass cylinders of 600 cm³ volume and 10 cm diameter. It was found that both *Trichoderma* species influenced significantly the number of primordia formed by strains and crossbred cultures of *A. bisporus*. All the *T. aggressivum* f. *europaum* isolates, i.e. T. 361, CBS115901 and T. agg. 29/15 drastically limited the primordia formation by *Agaricus* strains and crossbred cultures. It was demonstrated in the case of *T. hamatum* that isolate T. ham. 7/33 decreased the number of primordia to a much greater extent than the other two isolates T. ham.3/74 and T. ham. 9/11.

Key words: button mushroom; primordia; crossbred cultures; green moulds

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu różnych izolatów *Trichoderma* na wiązanie zawiązków owocników kilkunastu kultur krzyżówkowych *Agaricus bisporus*. Wykorzystano izolaty dwóch gatunków *Trichoderma* pochodzących z krajowych pieczarkarni: *T. aggressivum* f. *europaum* oraz *T. hamatum*. Ocenę wiązania owocników przeprowadzono w cylindrach szklanych o pojemności 600 cm³ i średnicy 10 cm. Wykazano bardzo duży wpływ izolatów obu gatunków *Trichoderma* na ilość zawiązków owocników wytworzonych przez badane odmiany i kultury krzyżówkowe pieczarki. Izolaty *T. aggressivum* f. *europaum*: T. 361, CBS115901 oraz T. agg. 29/15 powodowały drastyczne ograniczenie wiązania owocników przez odmiany i kultury krzyżówkowe pieczarki. W przypadku *T. hamatum* wykazano, że izolat T. ham. 7/33 w większym stopniu obniżał ilość wytworzonych zawiązków owocników niż dwa pozostałe izolaty T. ham. 3/74 oraz T. ham. 9/11.

Słowa kluczowe: pieczarka dwuzarodnikowa; zawiązki owocników; kultury krzyżówkowe; zielone pleśnie

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

¹ Katedra Entomologii i Ochrony Środowiska

Zgorzelecka 4, 60-198 Poznań

rgorski@up.poznan.pl

² Katedra Warzywnictwa

Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań

Wstęp / Introduction

Zielone pleśnie porażające uprawy pieczarek w wyniku występowania grzybów rodzaju *Trichoderma* są w ostatnich latach bardzo poważnym zagrożeniem (Kredics i wsp. 2010). Duże straty powodowane przez różne gatunki *Trichoderma* obserwowano w latach 1985–1986 w Wielkiej Brytanii oraz Irlandii (Seaby 1996). Infekcja upraw pieczarek zielonymi pleśniami szybko rozprzestrzeniła się, w 1994 roku obserwowano porażenie w Holandii (Geels 1997), a trzy lata później w Hiszpanii i Francji (Hermosa i wsp. 2000; Mamoun i wsp. 2000a). W ostatnich latach zidentyfikowano porażenie pieczarki grzybami rodzaju *Trichoderma* na Węgrzech (Hatvani i wsp. 2007), w Polsce (Szczech i wsp. 2008), a także Meksyku (Romero-Arenas i wsp. 2009), Australii (Clift i Shamshad 2009) oraz Chorwacji (Hatvani i wsp. 2012). Największe straty w uprawie pieczarki powoduje *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* (Szczech i wsp. 2008; Sobieralski i wsp. 2009b). Gatunek ten poraża grzybnię i owocniki (Hermosa i wsp. 2000; Samuels i wsp. 2002) oraz wpływa na obniżenie wielkości i jakości plonu pieczarki (Sharma i wsp. 1999; Mamoun i wsp. 2000b; Sobieralski i wsp. 2009a). Źródło zakażenia stanowi podłoże, okrywa lub grzybnia (Błażej i Tekieła 2002; Tekieła 2005; Sobieralski i wsp. 2009b).

W krajowych pieczarkarniach najczęściej izolowano gatunki: *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. longibrachiatum* oraz *T. aggressivum* (Szczech i wsp. 2008). Do gatunków o stosunkowo małej patogeniczności można zaliczyć: *T. viride*, *T. aureoviride*, *T. pseudokoningii* oraz *T. hamatum* (Seaby 1996; Fletcher i Gaze 2008). Szereg badań prowadzonych w różnych ośrodkach naukowych wykazało występowanie skomplikowanej interakcji pomiędzy *Agaricus bisporus* a grzybami rodzaju *Trichoderma* (Krupke i wsp. 2003; Savoie i Mata 2003; Williams i wsp. 2003; Largeteau i Savoie 2010).

Celem przeprowadzonych badań była ocena wpływu różnych izolatów grzybów rodzaju *Trichoderma* pochodzących z krajowych pieczarkarni na wiązanie zawiązków owocników kilkunastu kultur krzyżówkowych *Agaricus bisporus*.

Materiały i metody / Materials and methods

Doświadczenie przeprowadzone zostało w laboratorium biologicznym Katedry Warzywnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W doświadczeniu użyto kultur krzyżówkowych uzyskanych poprzez krzyżowanie kultur jednozarodnikowych różnych odmian pieczarki dwuzarodnikowej *A. bisporus*. Porównanie wzrostu grzybni kultur krzyżówkowych oraz odmian przeprowadzono na pożywce agarowej standardowej, pożywce obornikowej oraz w podłożu zastępczym według metody podanej przez Sobieralskiego (1998) w 3 powtórzeniach.

W badaniach wykorzystano izolaty dwóch gatunków *Trichoderma*: *T. aggressivum* f. *europaeum* oraz *T. hamatum*. Izolaty pochodziły z kolekcji grzybów Katedry Warzywnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Charakterystykę izolatów przedstawiono w tabeli 1.

Ocenę wiązania owocników prowadzono w cylindrach szklanych o pojemności 600 cm³ i średnicy 10 cm. Cylindry wypełniono do 2/3 ich wysokości grzybnią na ziarnie pszenicy badanych kultur *A. bisporus*. Na górną powierzchnię grzybni pieczarki nałożono po 5 ziaren pszenicy przerośniętych strzępkami badanych izolatów *Trichoderma*, rozmieszczając je równomiernie na całej powierzchni. Następnie nałożono 6-centymetrową warstwę okrywy torfowej. Inkubację prowadzono w temperaturze 25°C, przy wilgotności względnej powietrza 90–95%, aż do wrośnięcia grzybni pieczarki w okrywę do wysokości 5,5 cm. Po inkubacji temperaturę obniżono do 15°C. Na powierzchni okrywy liczono zawiązki powstałe do 16. dnia od momentu obniżenia temperatury. Liczbę zawiązków przeliczano na 1 cm² powierzchni. Kontrolę dla każdej odmiany i kultury krzyżówkowej stanowiła kombinacja nieinfekowana izolatami *Trichoderma*. Szczegółowy opis metody podał Sobieralski (1998).

Doświadczenie założono w układzie całkowicie losowym w 4 powtórzeniach i 2 seriach. Wyniki analizowano przy użyciu analizy wariancji dla doświadczeń czynnikowych przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$ (test Newmana-Keuls). Wyniki omówiono na podstawie wartości średnich uzyskanych z 2 serii doświadczeń ze względu na brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy seriami.

Tabela 1. Pochodzenie izolatów *Trichoderma* użytych do badań
Table 1. Derivation of *Trichoderma* isolates used in the experiments

Nr izolatu No. of isolate	Gatunek – Species	Pochodzenie – Derivation
T 361	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	Wiena University of Technology
CBS 115901	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	The Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre
T. agg. 29/15	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>	Poznań
T. ham. 3/74	<i>T. hamatum</i>	Kościan
T. ham. 7/33	<i>T. hamatum</i>	Skierniewice
T. ham. 9/11	<i>T. hamatum</i>	Poznań

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

W tabeli 2. przedstawiono wzrost grzybni badanych odmian i kultur krzyżówkowych na pożywce agarowej standardowej i obornikowej oraz podłożu zastępczym. Wykazano bardzo duże zróżnicowanie wzrostu badanych odmian i kultur krzyżówkowych zarówno na pożywkach, jak i podłożu zastępczym. Średnica pożywki przerośniętej przez grzybnię na pożywce agarowej standardowej po okresie inkubacji wahała się od 16 mm (kultura krzyżówkowa KW./3/71) do 38 mm (odmiana Polmycel 23). Na pożywce obornikowej stwierdzono także bardzo duże zróżnicowanie wzrostu grzybni. Średnica pożywki przerośniętej przez grzybnię wahała się od 31 mm (kultura krzyżówkowa KW./11/24) do 86 mm (odmiana Somycel 91). Na podłożu zastępczym warstwa podłoża przerośnięta przez grzybnię wahała się od 41 mm (kultura krzyżówkowa KW./5/149) do 105 mm (kultura krzyżówkowa KW./8/67).

Wykazano bardzo duży wpływ izolatów *T. aggressivum* f. *europaeum* na tworzenie zawiązków owocników przez badane odmiany i kultury krzyżówkowe pieczarki (tab. 3). Wszystkie trzy izolaty: T. 361, CBS115901 oraz T. agg. 29/15 powodowały drastyczne ograniczenie wiązania owocników przez odmiany i kultury krzyżówkowe pieczarki (0,2–1,0 szt./cm²). W kilkunastu przypadkach

odmiany i kultury krzyżówkowe na skutek infekcji nie wytworzyły żadnych zawiązków. Średnia liczba zawiązków wytworzonych przez badane odmiany i kultury krzyżówkowe zainfekowane w/w izolatami była bardzo zbliżona.

Uzyskane dane potwierdzają wcześniejsze wyniki badań autorów odnośnie dużej agresywności izolatów grzybów *T. aggressivum* f. *europaeum*, które powodowały znaczne zmniejszenie tworzenia zawiązków, a także bardzo znaczną obniżkę plonu (Sobieralski i wsp. 2010). Dużą agresywność izolatów *T. aggressivum* wykazali wcześniej m.in. Mamoun i wsp. (2000a), Savoie i wsp. (2001) oraz Samuels i wsp. (2002).

Izolaty *T. hamatum* wpływały także istotnie na tworzenie zawiązków owocników badanych odmian i kultur krzyżówkowych pieczarki. Średnia liczba zawiązków owocników wytworzonych przez odmiany i kultury krzyżówkowe zainfekowane izolatami *T. hamatum* wynosiła 0,8 oraz 1,0 szt./cm² i była istotnie niższa od kontroli (1,2 szt./cm²). Izolat T. ham. 7/33 w większym stopniu obniżał ilość wytworzonych zawiązków owocników niż dwa pozostałe izolaty T. ham. 3/74 oraz T. ham. 9/11. Szereg autorów zalicza *T. hamatum* do grzybów nie wywierających dużego wpływu na plonowanie pieczarek (Seaby 1996; Fletcher i Gaze 2008). Uzyskane wyniki nie potwierdzają tych danych.

Tabela 2. Ocena wzrostu grzybni odmian i kultur krzyżówkowych uzyskanych poprzez krzyżowanie kultur jednozarodnikowych różnych odmian pieczarki dwuzarodnikowej *A. bisporus*

Table 2. Mycelium growth evaluation of strains and crossbred cultures obtained by crossing of *A. bisporus* single-spore cultures

Nr No.	Odmiany i kultury krzyżówkowe Strains and crossbred cultures	Wzrost grzybni – Mycelium growth [mm]		
		pożywka agarowa standardowa standard agar medium	pożywka obornikowa manure medium	podłoże zastępcze substitute substrate
1.	Somycel 91	37 a	86 a	98 a
2.	Hauser A6.5	35 a	80 a	102 a
3.	KW./7/141	22 de	48 f	55 f
4.	KW./9/76	25 c	55 e	62 e
5.	KW./4/31	27 c	58 d	81 c
6.	KW./11/24	18 ef	31 h	50 g
7.	KW./17/112	32 b	67 c	93 b
8.	KW./8/67	34 ab	85 a	105 a
9.	KW./3/71	16 f	32 h	50 g
10.	Italspawn F62	32 b	64 c	93 b
11.	Polmycel 23	38 a	61 d	90 b
12.	KW./26/15	18 ef	40 g	67 e
13.	KW./18/43	33 b	60 d	75 d
14.	KW./31/17	34 ab	65 c	81 c
15.	KW./5/149	18 ef	32 h	41 h
16.	KW./2/110	36 a	75 b	96 ab
17.	KW./16/168	21 d	44 f	68 e
18.	KW./33/19	23 d	52 e	72 d

Wartości w kolumnach oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$

Values in columns marked with the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0.05$

Tabela 3. Wpływ izolatów *Trichoderma* na tworzenie zawiązków owocników odmian i kultur krzyżówkowych *A. bisporus* [szt./cm²]
 Table 3. Effect of *Trichoderma* isolates on primordia formation of *A. bisporus* strains and crossbred cultures [pcs/cm²]

Odmiany, kultury krzyżówkowe Strains, crossbred cultures	Gatunek Species						Kontrola Contol	Średnia Mean
	<i>T. aggressivum</i> f. <i>europaeum</i>			<i>T. hamatum</i>				
	nr izolatu No. of isolate			nr izolatu No. of isolate				
	T. 361	CBS115901	T. agg. 29/15	T. ham. 3/74	T. ham. 7/33	T. ham. 9/11		
Somycel 91	0,4	0,2	0,4	1,4	1,2	1,6	1,6	1,0 ab
Hauser A6.5	0,2	0,2	0,6	0,8	0,6	1	1,1	0,6 cd
KW./7/141	0	0	0	0,2	0,2	0,2	0,3	0,1 e
KW./9/76	0,2	0	0,2	0,6	0,4	0,7	0,7	0,4 d
KW./4/31	0	0	0	0,8	0,2	0,4	0,8	0,3 de
KW./11/24	0,6	0,4	0,2	1	0,6	1	1,2	0,7 c
KW./17/112	0,2	0,2	0,4	0,6	0,6	0,6	0,8	0,5 cd
KW./8/67	0,4	0,2	0,6	1,8	1,4	1,8	2	1,2 a
KW./3/71	0,2	0,6	0,8	1,2	1,2	1,4	1,4	1,0 ab
Italspawn F62	0,4	0,2	0,4	2	1,8	2	2,2	1,3 a
Polmycel 23	0,6	0,8	0,6	1,6	1,4	1,8	2	1,3 a
KW./26/15	1	0,6	0,8	1,4	1,2	1,4	1,8	1,2 a
KW./18/43	0	0	0	0,2	0	0,2	0,2	0,1 e
KW./31/17	0	0,2	0	0,8	0,2	0,6	0,8	0,4 d
KW./5/149	0	0	0	0,2	0	0	0,2	0,1 e
KW./2/110	0,6	0,8	0,4	1	1	0,8	1,1	0,8 bc
KW./16/168	0,2	0,4	0,4	1,2	1,4	1,2	1,5	0,9 b
KW./33/19	0,8	0,8	0,6	1,6	1,5	1,4	1,7	1,2 a
Średnia – Mean	0,3 d	0,3 d	0,4 d	1,0 b	0,8 c	1,0 b	1,2 a	

Wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie na poziomie $\alpha = 0,05$
 Means marked with the same letter do not differ significantly at $\alpha = 0.05$

Wnioski / Conclusions

1. Izolaty grzybów *T. aggressivum* f. *europaeum* oraz *T. hamatum* zmniejszyły istotnie liczbę wytworzonych zawiązków owocników przez badane odmiany oraz kultury krzyżówkowe pieczarki.
2. Izolaty *T. hamatum* w różnym stopniu ograniczały tworzenie zawiązków owocników przez badane odmiany i kultury krzyżówkowe.

Część badawcza pracy została sfinansowana ze środków na naukę w latach 2009–2012 jako projekt badawczy nr NN310 089037.

Literatura / References

- 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.
- Clift A.D., Shamshad A. 2009. Modeling mites, moulds and mushroom yields in the Australian Mushroom Industry p. 491–497. In: Proc. 18th World IMACS/MODSIM 09 Congress (R.S. Anderssen, R.D. Braddock, L.T.H. Newham, eds). Cairns, Australia, IMACS/MODSIM, 3537 pp.
- Fletcher J.T., Gaze R.H. 2008. Mushroom Pest and Disease Control. Manson Publishing Ltd, London, 192 pp.
- Geels F.P. 1997. Rondetafel – bijeenkomst over Trichoderma. Champignoncultuur 41, p.13.
- 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.
- Hatvani L., Sabolić P., Kosubé S., Kredics L., Vágvölgyi C., Kaliterna J., Ivić D., Dermić E., Kosalec I. 2012. The first report on mushroom green mould in Croatia. Arch. Ind. Hyg. Toxicol. 63: 481–487.

- 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.
- 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.
- Romero-Arenas O., Lara M.H., Huato M.A.D., Hernandez F.D., Victoria D.A.A. 2009. The characteristics of *Trichoderma harzianum* as a limiting agent in edible mushrooms. Revista Colombiana de Biotecnología 11: 143–151.
- 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., 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.
- Sharma H.S.S., Kilpatrick M., Ward F., Lyons G., Burns L. 1999. Colonisation of phase II compost by biotypes of *Trichoderma harzianum* and their effect on mushroom yield and quality. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 572–578.
- Sobieralski K. 1998. Selekcja, ocena i krzyżowanie wybranych kultur jenozarodnikowych pieczarki dwuzarodnikowej *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. Roczn. AR Poznań, Rozpr. Nauk., Zeszyt 291, 57 ss.
- 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.
- Szczech M., Staniaszek M., Habdas H., Uliński Z., Szymański J. 2008. *Trichoderma* spp. – the cause of green mold on polish mushroom farms. Veg. Crops Res. Bull. 69: 105–114.
- Tekiela 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.