

Effect of some essential oils on mycelium growth and primordia formation of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach

Wpływ wybranych olejków eterycznych na wzrost grzybni i wiązanie owocników pieczarki *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach

Marek Siwulski¹, Krzysztof Sobieralski¹, Romuald Górski², Jolanta Lisiecka¹, Iwona Sas-Golak¹

Summary

The aim of the studies was to determine the effect of three essential oils, i.e. tea tree, hemp and sage oils on mycelium growth and the capability of primordia formation of the Amycel 2600 strain of *Agaricus bisporus*. The mycelium growth of *A. bisporus* was tested on wheat agar medium. The tested essential oils were added to the medium at the concentration of 0.05–0.6%. The assessment of the primordia formation was carried out in glass cylinders of 600 cm³ volume. The essential oils were introduced into casing soil at the concentration of 0.1–0.8%. It was found that the tested essential oils influenced the mycelium growth of *A. bisporus*. Concentrations of tested oils of 0.05 and 0.1% did not cause a significant reduction in mycelial growth rate. The concentration of essential oils above 0.2% in the medium resulted in a significant reduction in mycelial growth rate, and at the highest concentrations of essential oils the mycelium of *A. bisporus* showed no growth. The concentration of essential oils tested had a significant impact on the primordia formation. It was found that the higher was the concentration of oils studied, the stronger was the effect of primordia formation inhibiting. The highest concentrations of the used oils resulted in complete inhibition of primordia formation.

Key words: mushroom cultivation, biological control, tea tree oil, hemp oil, sage oil

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu trzech olejków eterycznych, tj. z drzewa herbacianego, konopnego i szalwiowego, na wzrost grzybni i zawiązywanie owocników pieczarki *Agaricus bisporus* rasy Amycel 2600. Wzrost grzybni pieczarki badano na pożywce agarowej pszennej. Olejki dodawano do pożywki w stężeniu od 0,05 do 0,6%. Ocenę ilości zawiązywania owocników przeprowadzono w zlewkach szklanych o pojemności 600 cm³. Olejki wprowadzano do ziemi okrywowej w stężeniach od 0,1 do 0,8%. Stwierdzono, że zastosowane olejki eteryczne wpływały na wzrost grzybni pieczarki. Stężenia olejków 0,05 i 0,1% nie powodowały istotnego zmniejszenia szybkości wzrostu grzybni. Stężenie olejków powyżej 0,2% w pożywce powodowało znaczące obniżenie szybkości wzrostu grzybni, a przy najwyższych stężeniach olejków grzybni pieczarki nie wykazywała wzrostu. Stężenie olejków miało istotny wpływ na tworzenie zawiązków owocników. Stwierdzono, że im wyższe stężenie badanych olejków, tym silniejszy był efekt hamowania tworzenia zawiązków. Najwyższe z zastosowanych stężeń olejków spowodowały całkowite zahamowanie tworzenia zawiązków.

Słowa kluczowe: uprawa grzybów, biologiczna ochrona, olejek z drzewa herbacianego, olejek konopny, olejek szalwiowy

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

¹ Katedra Warzywnictwa
Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań
fungus@up.poznan.pl

² Katedra Metod Ochrony Roślin
Zgorzelecka 4, 60-198 Poznań

Wstęp / Introduction

Badania nad możliwością zastosowania środków naturalnych w ochronie grzybów uprawnych prowadzili Soković i wsp. (2006) oraz Górski i wsp. (2008a, b). Wykazano skuteczność różnych olejków eterycznych przeciwko patogenom grzybowym występującym w uprawach pieczarki i boczniaka, m.in. *Trichoderma harzianum* (Górski i wsp. 2010a), *Mycogone pernicioso* (Glamoclija i wsp. 2009; Regnier i Combrinck 2010), *Vericillium fungicola* i *Cladobotryum* sp. (Tanovic i wsp. 2009) oraz *Aspergillus* sp. i *Penicillium* (Mahanta i wsp. 2007). W badaniach Siwulskiego i wsp. (2010) stwierdzono skuteczność olejku z drzewa herbacianego w hamowaniu wzrostu grzybni izolatów *T. harzianum* i *T. atroviride*. Górski i wsp. (2010b) wykazali przydatność olejku manuka i pczulowego do zwalczania *T. harzianum* w uprawie pieczarki *Agaricus bisporus*. Angelini i wsp. (2008) badali wpływ olejku z drzewa herbacianego zarówno na wzrost grzybni *Pleurotus* sp., jak i *T. harzianum*. Większość wymienionych wyżej prac skupia się głównie na oddziaływaniu olejków eterycznych na grzyby patogeniczne.

Celem pracy było określenie wpływu wybranych olejków eterycznych na wzrost grzybni i zawiązywanie owocników pieczarki *A. bisporus*. Uzyskane wyniki mogą dać odpowiedź na pytanie, czy użycie olejków eterycznych, skutecznie hamujących rozwój grzybów patogenicznych, nie ma negatywnego wpływu na rozwój pieczarki.

Materiały i metody / Materials and methods

Badania przeprowadzono w laboratorium Katedry Warzywnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Użyto trzech olejków eterycznych, tj. z drzewa herbacianego, konopnego oraz szalwiowego. Doświadczenia wykonano na rasie pieczarki *A. bisporus* firmy Amycel oznaczonej jako 2600.

W pierwszym etapie badań określono wpływ olejków eterycznych na wzrost grzybni na pożywce pszennej z dodatkiem olejku. Pożywkę pszenną uzyskano poprzez gotowanie 150 g ziarna pszenicy w 1 dm³ wody destylowanej przez 1 godzinę, a następnie odsączenie całości na sicie w celu uzyskania wyciągu. Do wyciągu dodawano 1,5 g glikozy oraz 22 g agaru i uzupełniano wodą destylowaną do objętości 1 dm³. Pożywkę sterylizowano w temperaturze 121°C przez 20 minut. Po ostygnięciu pożywki do 45°C dodawano odpowiednią ilość olejku. Stężenie olejków, dla każdego z osobna, w pożywce wynosiło od 0,05 do 0,6%, w przedziałach co 0,05%. Pożywkę wylewano na płytki Petriego i po jej zestaleniu szczepiono krawężkami agaru o średnicy 4 mm przerośniętym strzępkami grzybni. Inkubację prowadzono w temperaturze 25°C. Miarą wzrostu grzybni była średnica kolonii grzybni po 14 dniach inkubacji. Kontrolę stanowiła grzybnia rosnąca na pożywce pszennej bez dodatków.

W drugim etapie badań wykonano ocenę ilości zawiązywania owocników pieczarki. Badania przeprowadzono w zlewkach szklanych o pojemności 600 cm³ według

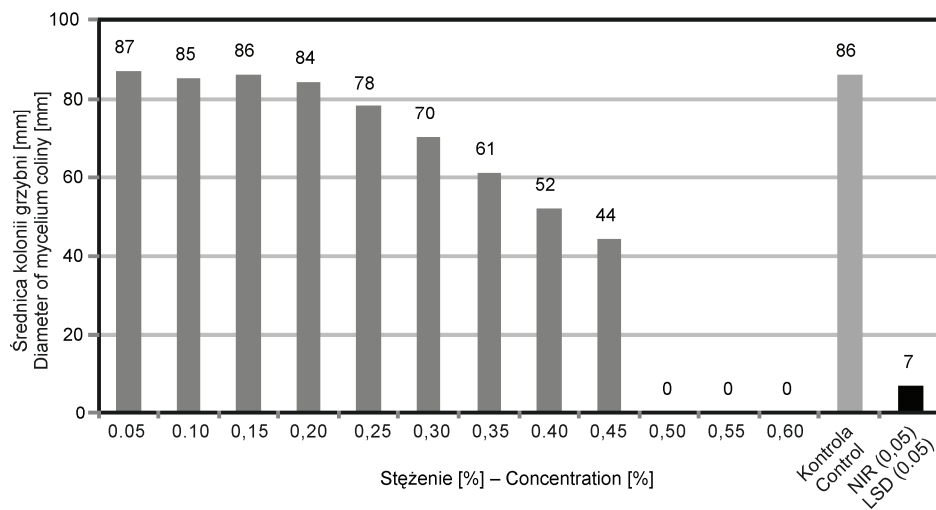
metody opisanej szczegółowo przez Sobieralskiego i wsp. (2010). Olejki, każdy z osobna, wprowadzano do ziemi okrywowej w stężeniach od 0,1 do 0,8% w przedziałach co 0,1%. Liczbę wytworzonych zawiązków owocników pieczarki przeliczano na 1 cm² powierzchni ziemi okrywowej.

Doświadczenie w etapie pierwszym wykonano w 5 powtórzeniach w dwóch seriach, natomiast w etapie drugim w 4 powtórzeniach i również dwóch seriach. Wyniki doświadczeń, jako wartości średnie z dwóch serii, analizowano z zastosowaniem analizy wariancji dla doświadczeń czynnikowych przy $\alpha = 0,05$.

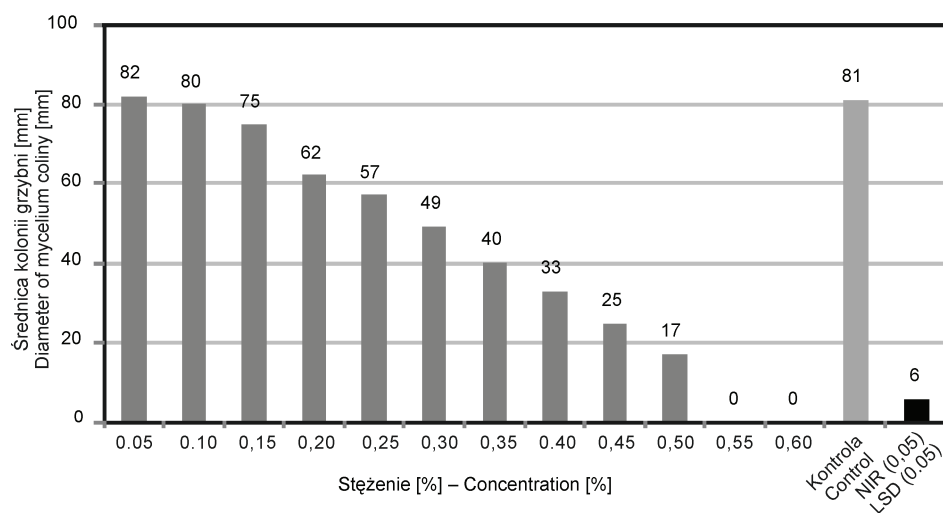
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

Zastosowane olejki eteryczne wpływały na wzrost grzybni pieczarki. Jej wzrost zależał od rodzaju olejku i jego stężenia w pożywce (rys. 1, 2, 3). Stężenia badanych olejków w ilości 0,05 i 0,1% nie powodowały istotnego zmniejszenia szybkości wzrostu grzybni, a w przypadku olejku z drzewa herbacianego i olejku szalwiowego dotyczyło to także stężeń 0,15 i 0,2%. Stężenie olejków powyżej 0,2% w pożywce powodowało znaczące obniżenie szybkości wzrostu grzybni. Stwierdzono tendencję do zmniejszania się szybkości wzrostu grzybni wraz ze wzrostem stężenia olejków w pożywce. Przy najwyższych stężeniach olejku z drzewa herbacianego i olejku szalwiowego, tj. od 0,5 do 0,6% grzybnia pieczarki nie wykazywała wzrostu. W przypadku olejku konopnego brak wzrostu grzybni stwierdzono dopiero od stężenia 0,55%. Angelini i wsp. (2008) wykazali, że olejek z drzewa herbacianego hamował wzrost grzybni boczniaków *Pleurotus nebrodensis* i *P. ferule* w stężeniu od 0,125 do 1 µl/ml, a im wyższe było stężenie olejku, tym większy był efekt inhibicyjny. Podobny efekt uzyskali w stosunku do wzrostu grzybni *T. harzianum* oraz kiełkowania zarodników tego gatunku. Ponadto stwierdzili, że stężenie olejku wynoszące 0,0625 µl/ml stymulowało wzrost grzybni badanych boczniaków, a ograniczało wzrost grzybni i liczbę kiełkujących zarodników *T. harzianum*. Soković i wsp. (2006) wykazali skuteczność olejku szalwiowego w ograniczeniu rozwoju patogenów występujących w uprawie pieczarki takich, jak: *V. fungicola*, *T. harzianum* i *Pseudomonas tolaasi*.

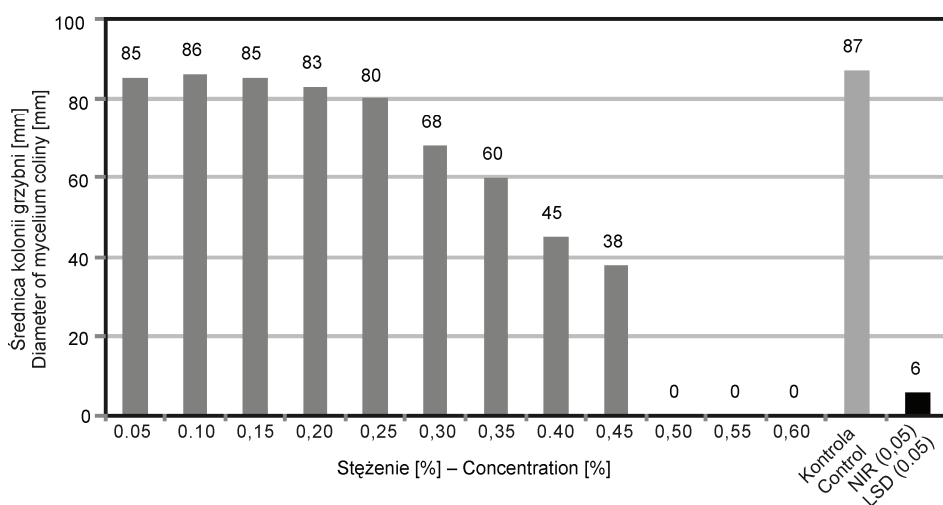
Brak jest w literaturze danych dotyczących wpływu wymienionych wyżej olejków eterycznych na powstawanie owocników. Zdolność tworzenia owocników dwóch gatunków pieczarki, tj. *A. bisporus* oraz *A. arvensis* była przedmiotem badań Sobieralskiego i wsp. (2011). Wykazali oni, że badane rasy obydwu gatunków różniły się pod tym względem. Ilość tworzonych zawiązków owocników przez *A. bisporus* wahała się od 0,4 do 2,4 na 1 cm². W badaniach własnych liczba powstałych zawiązków owocników w kombinacjach kontrolnych dla rasy Amycel 2600 wahała się od 2,1 do 2,4 na cm². Natomiast w kombinacjach z zastosowanymi olejkami stwierdzono duże zróżnicowanie ilości tworzonych zawiązków owocników. Stężenie badanych olejków miało istotny wpływ na



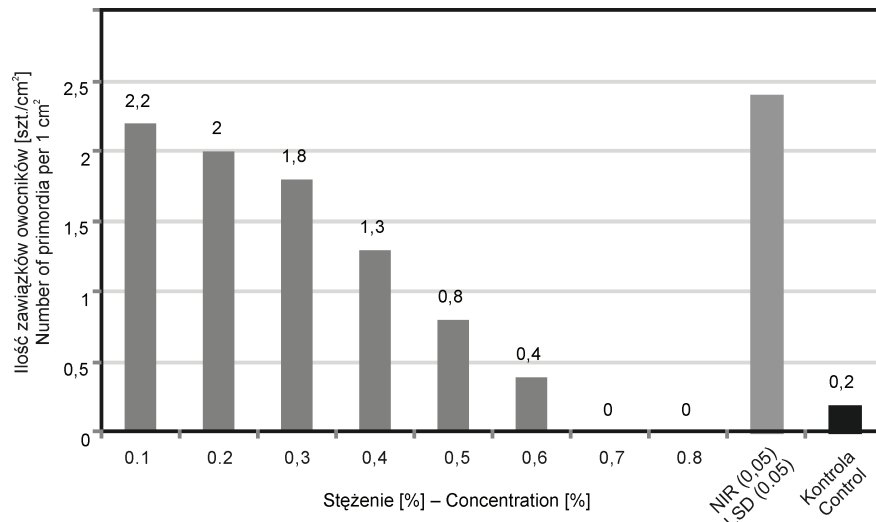
Rys. 1. Wpływ olejku z drzewa herbacianego na wzrost grzybni pieczarki rasy Amycel 2600 na pożywce pszennej
Fig. 1. Effect of tea tree essential oil on mycelium growth of Amycel 2600 strain of *A. bisporus* on wheat medium



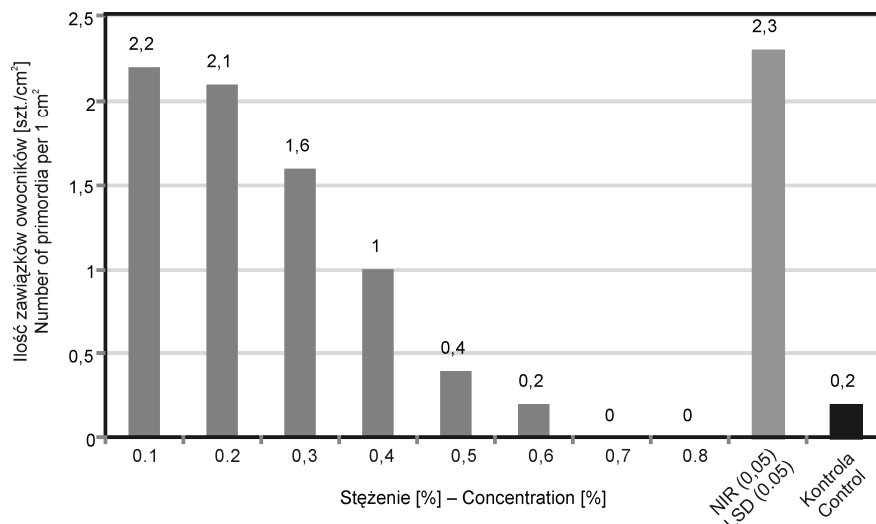
Rys. 2. Wpływ olejku konopnego na wzrost grzybni pieczarki rasy Amycel 2600 na pożywce pszennej
Fig. 2. Effect of hemp oil on mycelium growth of Amycel 2600 strain of *A. bisporus* on wheat medium



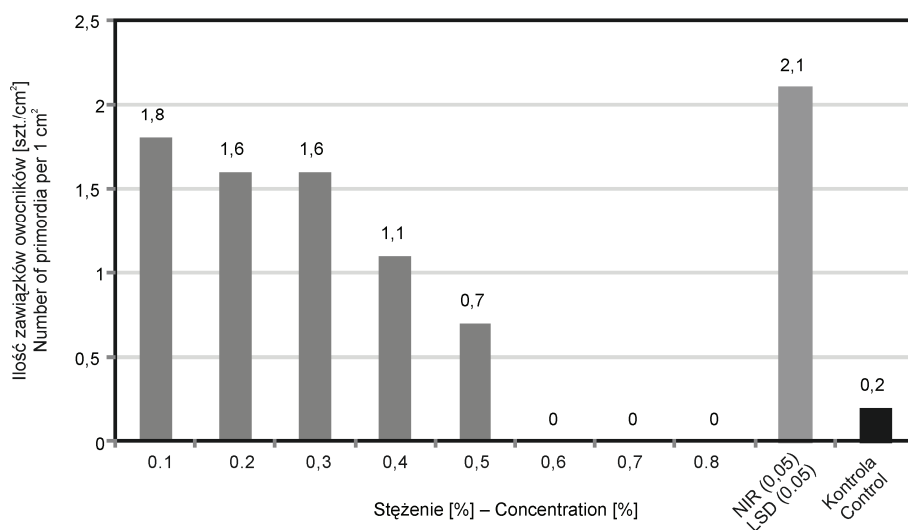
Rys. 3. Wpływ olejku szalwiowego na wzrost grzybni pieczarki rasy Amycel 2600 na pożywce pszennej
Fig. 3. Effect of sage oil on mycelium growth of Amycel 2600 strain of *A. bisporus* on wheat medium



Rys. 4. Wpływ olejku z drzewa herbacianego na tworzenie zawiązków owocników pieczarki rasy Amycel 2600
 Fig. 4. Effect of tea tree essential oil on primordia formation of Amycel 2600 strain of *A. bisporus*



Rys. 5. Wpływ olejku z drzewa herbacianego na tworzenie zawiązków owocników pieczarki rasy Amycel 2600
 Fig. 5. Effect of hemp oil on primordia formation of Amycel 2600 strain of *A. bisporus*



Rys. 6. Wpływ olejku szalwiowego na tworzenie zawiązków owocników pieczarki rasy Amycel 2600
 Fig. 6. Effect of sage oil on primordia formation of Amycel 2600 strain of *A. bisporus*

tworzenie zawiązków owocników (rys. 4, 5, 6). Stwierdzono, że im wyższe było stężenie badanych olejków, tym silniejszy był efekt hamowania tworzenia zawiązków. Najwyraźniej efekt ten ujawnił się w przypadku olejku szałwiowego. Najwyższe z zastosowanych stężeń spowodowały całkowite zahamowanie tworzenia zawiązków. Trzeba jednak dodać, że najniższe stężenie olejków wynoszące 0,1% tylko nieznacznie ograniczało liczbę tworzonych zawiązków. W ocenie wpływu olejków na wzrost grzybni przy tym stężeniu nie stwierdzono również efektu inhibicyjnego.

Wnioski / Conclusions

1. Badane olejki eteryczne miały wpływ na wzrost grzybni i tworzenie zawiązków owocników pieczarki. Im wyższe było stężenie olejków, tym silniejszy był efekt inhibicji.
2. Najniższe z zastosowanych stężeń badanych olejków nieznacznie wpływały na wzrost grzybni i wiązanie owocników. Fakt ten może stanowić podstawę do dalszych badań nad ich wykorzystaniem w biologicznej ochronie upraw pieczarki.

Literatura / References

- Angelini P., Pagiotti R., Granetti B. 2008. Effect of antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil on antagonistic potential of *Pleurotus* species against *Trichoderma harzianum* in dual culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 197–202.
- Glamoclija J., Sokovic M., Grubisic D., Vukojevic J., Milinekovic I., Ristic M. 2009. Antifungal activity of *Critmum maritimum* essential oil and its components against mushroom pathogen *Mycogone perniciosa*. *Chem. Natural Compounds* 45 (1): 96–97.
- Górski R., Frużyńska-Józwiak D., Andrzejak R. 2008a. Wpływ naturalnych olejków eterycznych na rozwój *in vitro* grzyba *Trichoderma harzianum* występującego w uprawie pieczarki dwuzarodnikowej (*Agaricus bisporus*). *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 529: 19–26.
- Górski R., Frużyńska-Józwiak D., Andrzejak R. 2008b. The effect of selected preparations on *in vitro* development of fungus *Trichoderma harzianum* found in button mushroom (*Agaricus bisporus*) crop. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 529: 27–33.
- Górski R., Kozłowska M., Góra K., Kozłowski R.J. 2010a. Analiza porównawcza wpływu naturalnych olejków eterycznych na ograniczenie wzrostu grzyba *Trichoderma harzianum* występującego w uprawie pieczarki dwuzarodnikowej (*Agaricus bisporus*). *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 50 (1): 352–356.
- Górski R., Sobieralski K., Siwulski M., Góra K. 2010b. Effect of selected natural essential oils on *in vitro* development of fungus *Trichoderma harzianum* found in common mushroom (*Agaricus bisporus*) cultivation. *Ecol. Chem. Eng.* 17 (2): 177–185.
- Mahanta J.J., Chutia M., Bordoloi M., Pathak M.G., Adhikary R.K., Sarma T.C. 2007. *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. spawns. *Flavour Fragr. J.* 22: 525–530.
- Regnier T., Combrinck S. 2010. *In vitro* and *in vivo* screening of essential oils for the control of wet bubble disease of *Agaricus bisporus*. *South Afr. J. Bot.* 76 (4): 681–685.
- Siwulski M., Sobieralski K., Górski R. 2010. Wpływ olejku herbacianego na wzrost grzybni kilku krajowych izolatów grzybów rodzaju *Trichoderma* w warunkach *in vitro*. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 50 (4): 2049–2053.
- 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*. *Phytopathol. Pol.* 55: 35–41.
- Sobieralski K., Siwulski M., Sas-Golak I., Jasińska A. 2011. Capability of primordia formation as a trait differentiating wild strains of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach and *A. arvensis* Schaff derived from the area of western Poland. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus* 10 (3): 123–131.
- Soković M., Leo J.L.D., van Griensven L.J.L.D. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushrooms, *Agaricus bisporus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 116: 211–224.
- Tanovic B., Potocnik I., Delibasic G., Ristic M., Kostic M., Markovic M. 2009. *In vitro* effect of essential oils from aromatic and medicinal plants on mushroom pathogens: *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone perniciosa*, and *Cladobotryum* sp. *Arch. Biol. Sci., Belgrade* 61 (2): 231–237.