

BADANIE CYST MĄTWIKA ZIEMNIACZANEGO ZAKAŻONYCH IN VITRO
KILKOMA SZCZEPAMI FUSARIUM OXYSPORUM SCHLECHT

Helena Wronkowska, Krystyna Janowicz

Katedra Mikrobiologii Rolnej,
Katedra Entomologii Stosowanej AR w Szczecinie

Pasożytowanie grzybów na mątwiku ziemniaczanym jest sprawą dyskusyjną. Przeważają opinie o małym wpływie tego zjawiska na populację wymienionych nicieni [8, 13]. Dotychczasowe badania mikroflory cyst Globodera rostochiensis [14, 15] wskazują na znaczny w niej udział grzybów z rodzaju Fusarium. Wśród kilkunastu wyizolowanych grzybów najliczniej występował na tym materiale F. oxysporum [15]. Rola tego gatunku w patologii mątwików nie jest jednoznacznie określona. Zdaniem Barro-
na [1], a także Goswami i Rumpfenhorsta [6], Fusaria towarzyszą pasożytom wewnętrznym nicieni, same nie posiadając właściwości patogenicznych. Kerry i in. [9] oraz Tribe [12] wymieniają je wśród słabych pasożytów cyst. Z kolei z innych prac wynika, że F. oxysporum pasożytuje na Heterodera schachtii [11] i H. glycines [4].

Nasuwa się pytanie, czy i w jakim stopniu F. oxysporum pasożytuje na mątwiku ziemniaczanym? W tym celu podjęto badania nad wpływem szczepów tego grzyba wyizolowanych z mątwika ziemniaczanego i mątwika zbożowego na zdrowotność cyst G. rostochiensis.

MATERIAŁ I METODA

Zdrowe, jasnobrązowe cysty G. rostochiensis zawierające średnio 330 jaj i pozyskane z gleby bezpośrednio po zbiorze ziemniaków przemywano kilkakrotnie w sterylnej wodzie destylowanej z dodatkiem NaClO (5%), a następnie wykładano po 15 sztuk do płytek Petriego z agarem wodnym + 100 ppm streptomycyny, szczepionym i nie szczepionym grzybnią (kontrola), w 5 powtórzeniach dla każdego szczepu i terminu badań. Badano 6 szczepów F. oxysporum wyizolowanych uprzednio z cyst mątwika

zbożowego - F. oxysporum H-1 i mątwika ziemniaczanego - F. oxysporum G-1, G-11, G-12, G-13, G-14 [14, 15]. Cysty wykładano na pożywkę bezpośrednio po zaszczepieniu jaj 10-dniowymi kulturami grzybów rosnącymi na PDA. Hodowlę prowadzono w cieplarni w temperaturze 20°C przeprowadzając obserwacje po 4, 8 i 12 tygodniach. Spasożytowanie jaj określano na podstawie obecności strzępek przerastających ich wnętrza. W tym celu z każdej płytki wybierano co miesiąc 10 cyst, rozgniatało je na szkiełku przedmiotowym i badano pod mikroskopem w kropli wody. Równocześnie badano przerośnięcie cyst przez grzybnie sporządzając w tym celu preparaty w laktofenolu.

WYNIKI

Stwierdzono różny stopień porażenia jaj w zależności od użytego do badań szczepu Fusarium (tab.). Izolaty z G. rostochiensis, aczkolwiek różniące się nieco w działaniu między sobą, przerastały procentowo więcej jaj w cystach, aniżeli izolaty z H. avenae. Po 4 tygodniach hodowli stwierdzono do 10% jaj przerośniętych strzępkami badanych szczepów F. oxysporum. W miarę upływu czasu wzrastało porażenie jaj przez szczepy wyizolowane z G. rostochiensis. Wśród nich wyróżniły się dwa - G-1 i G-11, które poraziły ponad 50% jaj. Porażenie jaj przez szczep wyizolowany z H. avenae było najmniejsze i nie przekroczyło 10% przez cały okres badań.

Obserwacje mikroskopowe pozwoliły stwierdzić szereg zmian morfologicznych w badanym materiale. Niektóre szczepy F. oxysporum (G-1, G-11, G-12) czopowały naturalne otwory cyst. Stwierdzono również, że nieznacznym uszkodzeniom uległy fragmenty powierzchni cyst (G-1).

Jaja wykazywały różne objawy porażenia; hialinowa grzybnia, często z chlamydosporami, oplątywała ich powierzchnię; grzybnia przerastała wnętrza jaj niszcząc larwy; w jajach strzępki występowały w formie skupisk (dotyczyło to przede wszystkim materiału badanego w 4 tygodniu hodowli). Zmiany te zaobserwowano we wszystkich kombinacjach doświadczenia. Puste jaja wypełnione były grzybnia niezależnie od użytego do badań szczepu.

Niektóre larwy kontaktujące się z F. oxysporum (G-11) wykazywały charakterystyczne deformacje. Polegały one na wklęśnięciach oskórki między prążkowaniem poprzecznym, w związku z czym larwy wyglądały tak, jakby ich zawartość skurczyła się. Po 3 miesiącach przetrzymywania cyst na pożywce szczepionej F. oxysporum wszystkie larwy, nawet te wyglądające typowo, były martwe.

W kontroli jaja były zdrowe i tylko pojedyncze zawierały ciemnobrązowe, gładkie, owalne komórki o długości do 10 µm, występujące pojedynczo lub w parach. Grzybów z tych jaj nie udało się wyhodować.

T a b e l a

Odsetek jaj G. rostochiensis porażonych przez różne szczepy F. oxysporum in vitro (\bar{x} z 30 cyst)

Percentage of G. rostochiensis eggs invaded by different strains of F. oxysporum in vitro (\bar{x} of 30 cysts)

Szczep Strain	Termin badań w tygodniach Term of investigations (in weeks)		
	4	8	12
G-1	9,4	60,1	68,0
G-11	7,8	58,3	65,2
G-12	5,2	6,8	16,0
G-13	8,6	12,1	25,0
G-14	10,2	26,7	31,5
H-1	6,8	9,2	9,8
Kontrola Control	0	0	0

G - szczep z G. rostochiensis - strain from G. rostochiensis. H - szczep z H. avenae - strain from H. avenae.

DYSKUSJA

Uzyskane uprzednio wyniki [14, 15] sugerują, że cysty G. rostochiensis są pasożytowane przez grzyby glebowe, a nie przez pasożyty wewnętrzne w rozumieniu Barona [1]. Chcąc sprawdzić, co dzieje się z cystami przy długotrwałym kontakcie z grzybnią przeprowadzono badania nie na jajach wyjętych z cyst, jak to się na ogół praktykuje [5], ale na całych cystach, przyjmując że rozwój grzybów na ścianie cyst, czopowanie ich naturalnych otworów i wydzieliny grzybów (enzymy, toksyny) nie pozostają bez wpływu na żywotność mątwików.

Godoy i in. [5] w badaniach in vitro nie potwierdzili patogenicznych właściwości F. oxysporum, szczepu wyizolowanego z cyst H. glycines, na jaja tego gatunku. W naszych badaniach obserwowano spasożytowanie jaj wewnątrz cyst przez wszystkie badane szczepy F. oxysporum. Wśród nich wyróżniły się dwa: G-1 i G-11, które po 8 tygodniach poraziły ponad 50% jaj. Był to długi okres bezpośredniego kontaktu grzybni z cystą, ale w glebie okres ten znacznie się wydłużył i aczkolwiek warunki spasożytowania są inne, to jednak należy wziąć pod uwagę ekspansywność tego gatunku grzyba [3] oraz to, że mamy do czynienia z osiadłymi formami nicieni. Nigh i in. [11], badając porażenie jaj H. schachtii przez F. oxysporum w doświadczeniu wazonowym uzyskali podobne rezultaty wynoszące około 50% spasożytowanych jaj.

Różnice w stopniu spasożytowania jaj przez szczepy wyizolowane z H. avenae i G. rostochiensis sugerowałyby możliwość adaptacji grzybów do określonego gatunku

mątwika, bądź też różną ich wirulencję, wynikającą ze specyficznych cech fizjologicznych [7]. Izolaty F. oxysporum wyszczepiane z cyst G. rostochiensis są przede wszystkim związane z żywicielem mątwika - ziemniakiem. Ich pasożytnictwo na cystach wydaje się być sprawą wtórną. Wirulencję szczepów w stosunku do G. rostochiensis być może należałoby przypisać związkom tych grzybów z ziemniakami i mikoflorą ich rizosfery, jak to obserwowano u F. oxysporum f. sp. psii [2].

W naszych badaniach larwy sztucznie uwolnione z jaj nie porażonych grzybnią, a wyłożonych na pożywkę z F. oxysporum, były martwe. Wydaje się więc, że przy ocenie wpływu F. oxysporum poza bezpośrednim pasożytowaniem grzyba należałoby się liczyć z działaniem jego toksyn lub innych metabolitów, np. lotnych substancji, co sugerują badania Maniego i Sethiego [10]. Praktyczne znaczenie w ograniczaniu populacji nicieni mogłyby więc mieć te szczepy, które wnikają do wnętrza cyst albo naturalnymi otworami, albo dzięki fizjologicznym właściwościom umożliwiającym im rozkład ścian cyst. Takie cechy wydaje się mieć szczep G-1, który obok silnego spasożytowania jaj (tab.) powodował uszkodzenia ścian cyst.

Obecność zarodników nie zidentyfikowanego grzyba w pojedynczych jajach mątwika ziemniaczanego świadczy o ich zakażeniu w glebie, niezależnie od hodowli z F. oxysporum. Przy oznaczaniu stopnia spasożytowania nie brano pod uwagę tych jaj.

Znaczny udział F. oxysporum w mikoflorze cyst G. rostochiensis [15] oraz wyniki niniejszej pracy przemawiałyby za uwzględnieniem tych grzybów pośród mikroorganizmów mogących w sprzyjających warunkach ograniczać populację mątwika ziemniaczanego.

LITERATURA

1. Barron G. L.: The nematode-destroying fungi. Topics in mycobiology 1. Can. Biol. Publ., Ltd., Guelph, (1977)
2. Buxton E. W.: Effects of pea root exudate on the antagonism of some rhizosphere microorganism towards Fusarium oxysporum f, sp. psii. J. Gen. Microb., 22: 678-689 (1960)
3. Dorenda M.: Oddziaływanie zbiorowisk grzybów ze środowiska uprawnego Trifolium pratense L. i Dactylis glomerata L. na grzyby patogeniczne dla konicyzny. Acta Mycol., 19 : 47-53 (1983)
4. Gintis B. Ownley, Morgan-Jones G., Rodriguez-Kabana R.: Fungi associated with several developmental stages of Heterodera glycines from an Alabama soyabean field soil. Nematropica, 13 : 181-200 (1983)
5. Godoy G., Rodriguez-Kabana R., Morgan-Jones G.: Parasitism of eggs of Heterodera glycines and Meloidogyne arenaria by fungi isolated from cysts of H. glycines. Nematropica, 12 : 111-119 (1982)
6. Goswami B. K., Rumpfenhorst H. J.: Association of an unknown fungus with potato cyst nematodes, Globodera rostochiensis and G. pallida. Nematologica, 24: 251-256 (1978)
7. Kern H.: Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen Fusarium lycopersici. Phytopath. Zeitschr. 19 : 351-382 (1952)

8. Kerry B. R., Crump D. H.: Observations on fungal parasites of females and eggs of the cereal cyst-nematode, Heterodera avenae, and other cyst nematodes. Nematologica, 23 : 193-201 (1977)
9. Kerry B. R., Crump D. H., Mullen L. A.: Natural control of the cereal cyst nematode, Heterodera avenae Woll., by soil fungi at three sites. Crop Protection, 1 : 99-109 (1982)
10. Mani A., Sethi C. L.: Effect of culture filtrates of Fusarium oxysporum f. sp. ciceri and Fusarium solani on hatching and juvenile mobility of Meloidogyne incognita. Nematropica, 14 : 139-144 (1984)
11. Nigh E. A., Thomason I. J., Van Gundy S. D.: Effect of temperature and moisture on parasitization of Heterodera schachtii eggs by Acremonium strictum and Fusarium oxysporum. Phytopathology, 70 : 889-891 (1980)
12. Tribe H. T.: Pathology of cyst-nematodes. Biol. Rev., 52 : 477-507 (1977)
13. Willcox J., Tribe H. T.: Fungal parasitism in cysts of Heterodera. I. Preliminary investigations. Trans. Br. Mycol. Soc., 62 : 585-594 (1974)
14. Wronkowska H., Janowicz K.: Badania mikoflory cyst Heterodera avenae i Globodera rostochiensis. Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln. 323 (1986)
15. Wronkowska H., Janowicz K.: Investigation of the mycoflora of Globodera rostochiensis cysts isolated from soil. Mater. IXth Meeting of Soil Biology of the Hungarian Society of Soil, Sopron, (1985)

H. Wronkowska, K. Janowicz

INVESTIGATION OF GLOBODERA ROSTOCHIENSIS WOLL. CYSTS INFECTED
WITH SOME STRAINS OF FUSARIUM OXYSPORUM SCHLECHT IN VITRO

S u m m a r y

Effect of 6 strains of F. oxysporum isolated from cysts of H. avenae (H-1) and G. rostochiensis (G-1, G-11, G-12, G-13, G-14) on G. rostochiensis cysts were studied in vitro. Superficially sterilized cysts were placed in a medium (water agar with streptomycin) inoculated with fungi. The culture was kept at 20°C for 3 months. All the F. oxysporum strains were found to parasitize eggs, the weakest being the isolate from H. avenae and strongest (more than 50% parasitized eggs) being strains G-1 and G-11; the latter two were additionally found to have plugged the cyst's natural openings and damaged the cyst's walls.

Х. Вронковска, К. Янович

ИССЛЕДОВАНИЕ КИСТ GLOBODERA ROSTOCHIENSIS WOLL. ЗАРАЖЕННЫХ
НЕСКОЛЬКИМИ ШТАММАМИ FUSARIUM OXYSPORUM SCHLECHT IN VITRO

Р е з ю м е

Исследовано влияние 6 штаммов F. oxysporum, выделенных из кист H. avenae (H-1) и G. rostochiensis (G-1, G-11, G-12, G-13, G-14) на кисты G. rostochiensis. Поверхностно стерилизованные кисты помещали в чашки Петри на среду (водяной агар со стрептомицином), которую инфицировали мицелием. Чашки инкубировали 3 месяца при 20°C. Все штаммы паразитировали на яичках, слабее всех изолят H-1, сильнее всех (свыше 50% заражённых яичек) изоляты G-1 и G-11 которые также спунтовали натуральные отверстия кист и вызвали повреждение их стенок.

Praca złożona w 1985 r.