

ZBIOROWISKA GRZYBÓW JAKO KRYTERIUM OCENY WPŁYWU ŚRODOWISKA NA CHOROBY ROŚLIN

Karol Mańka

Akademia Rolnicza w Poznaniu

WSTĘP

Każda roślina może lecz nie musi ulegać chorobom. Zależy to, jak wiadomo, od niej samej, od jej patogenów i od wpływów (na roślinę—gospodarza jak i na patogena) środowiska. Badanie wpływu środowiska na choroby roślin było zawsze trudne, to też ograniczano się w nim z reguły do uwzględniania tylko jednego lub kilku czynników, jak temperatury, wilgotności, pH itp. Takie fragmentaryczne badanie wpływu środowiska będzie wprawdzie potrzebne także w przyszłości ale nie będzie ono mogło wystarczyć. Istnieje i wzrasta konieczność coraz bardziej całościowego, a mimo to precyzyjnego, tzn. liczbowo ujmowalnego badania wpływu środowiska rośliny na jej zdrowotność. Konieczność ta jest może szczególnie silnie odczuwana przy badaniu chorób korzeni roślin [4] jakkolwiek, jak zobaczymy później, nie ogranicza się do nich. Łączy się ona zresztą z pilną potrzebą wydzwignięcia na wyższy szczebel całokształtu problematyki zwalczania chorób roślin.

Nowe możliwości badania środowiska rośliny—gospodarza, a tym samym i jego wpływu na tę ostatnią, łączą się z rozwojem mikrobiologii opartej na podstawach ekologicznych i socjologicznych. Stało się rzeczą jasną i niewątpliwą, że świat mikroorganizmów zasiedlający przestrzeń życiową rośliny—gospodarza stanowi precyzyjne odbicie całokształtu czynników ekologicznych występujących w tej przestrzeni oraz równie precyzyjnie, a w dodatku także szybko, reagujący na wszelkie zmiany w niej zachodzące. Wynikający stąd bieg myśli stał się podstawą, na której powstała i rozwinęła się w Polsce metoda szeregów biotycznych, tzn. sposób badania wpływu środowiska na choroby roślin oparty na analizie zbiorowiska mikroorganizmów, głównie grzybów, zasiedlających środowisko rośliny—gospodarza.

IZOLOWANIE ZBIOROWISK GRZYBÓW ZE ŚRODOWISKA
ROŚLINY—GOSPODARZA

Wspomniana metoda szeregów biotycznych bazuje metodycznie na dwóch postulatach. Pierwszym z nich jest wymóg takiego wyizolowania ze środowiska rośliny—gospodarza mikroorganizmów, aby otrzymane zbiorowisko mikroorganizmów pod względem jakościowo-ilościowej struktury wystarczająco wiernie odzwierciedlało rzeczywiste zasiedlenie badanego środowiska przez mikroorganizmy. Drugi zaś postulat ma na celu metodycznie poprawne ustalenie wpływu danego zbiorowiska mikroorganizmów na rozwój wchodzącego w rachubę patogena.

Zatrzymując się na razie przy izolowaniu zbiorowisk mikroorganizmów trzeba zaznaczyć, że jak dotąd, stosując metodę szeregów biotycznych, izolowano ze środowiska rośliny—gospodarza niemal wyłącznie zbiorowiska grzybów, jeden raz tylko [33] promieniowce, co nie znaczy, aby ta metoda była dla innych grup mikroorganizmów niedostępna. Można jednak dodać, że grzyby z wielu względów dobrze reprezentują ogół mikroorganizmów występujących w środowisku roślin, a przy tym będąc stosunkowo łatwe do technicznego opanowania, nadają się lepiej niż inne grupy mikroorganizmów do wykorzystania dla celów omawianej metody. Jeżeli zaś chodzi o „wystarczająco” dokładne wyizolowanie grzybów (dalej już tylko o tej części mikroorganizmów, jako „*pars pro toto*”, będzie mowa) ze środowiska, należy to rozumieć jako dolną granicę dokładności, przy której otrzymane zbiorowisko może jeszcze stanowić podstawę do wnioskowania o rzeczywistym wpływie rozpatrywanego środowiska na daną chorobę rośliny. Autor, a także jego współpracownicy zajmujący się tym zagadnieniem, uzyskiwali informację o stopniu dokładności izolowania zbiorowisk grzybów na drodze doświadczalnej, przez obserwację powtarzalności wyników [21], przez porównywanie obiektów o znacznym zróżnicowaniu w zakresie stopnia porażenia przez choroby [6, 12, 15, 16, 17, 27, 28] i przez odpowiednie dla omawianych celów rozwijanie techniki izolowania zbiorowisk grzybów.

Pojęcie „środowiska rośliny—gospodarza” jest szerokie, trzeba je zatem skonkretyzować dla celów badań fitopatologicznych. Najpierw trzeba je podzielić na środowisko wewnętrzne i środowisko zewnętrzne rośliny. Tutaj chodzi przede wszystkim o to ostatnie, które z kolei wypada podzielić na glebowe i nadglebowe lub nadziemne. W ramach środowiska glebowego autor i jego współpracownicy wyróżniali dotąd następujące fragmenty: poziom mineralny, poziom próchniczny, a w jego ramach glebę pozaryzosferową, ryzosferę, planosferę, korzenie roślin o grubości nie większej niż około 1 mm, wreszcie — gdy chodziło o gleby leśne — dwie warstwy ściółki (luźnej i fermentującej). Osobny problem jako część środowiska glebowego reprezentują mikoryzy. Wśród części nadgle-

bowego środowiska rośliny—gospodarza wyróżniano dotąd: pniaki (wraz z ich wewnętrznym środowiskiem), powierzchnię łodyg, sęki na pniach drzew (także wraz z ich wewnętrznym środowiskiem) i powierzchnię liści. Osobnego potraktowania wymaga środowisko nadglebowe rozumiane jako przestrzeń powietrzna znajdująca się w zasięgu nadziemnej części upraw roślin.

Przytoczony podział środowiska rośliny—gospodarza wynika z potrzeb badań fitopatologicznych, które muszą mieć na uwadze m. in. tę okoliczność, że pierwotne i większość wtórnych zakażeń roślin przez czynniki chorobotwórcze następuje przez ich wnikanie z zewnątrz do ich wnętrza, co dokonuje się w określonym miejscu powierzchni organizmu roślinnego.

Nagromadzone dotąd doświadczenie pozwala na krytyczną ocenę dotychczas stosowanych technik izolowania zbiorowisk grzybów ze środowiska rośliny—gospodarza, a w związku z tym na określenie technik aktualnie najbardziej korzystnych. Takim zamiarom towarzyszyły przygotowywania opisów kilku z tych technik, które są przedstawione niżej.

1. IZOLOWANIE ZBIOROWISK GRZYBÓW Z GLEBY

Opis ten odnosi się do gleby pozaryzosferowej. Jako wynik szeregu wysiłków zmierzających do precyzyjniejszego ujęcia postępowania Warcupa [32] powstała istotna modyfikacja tego postępowania, które można by nazwać metodą piaskową izolowania zbiorowisk grzybów z gleby. Początki jej rozwoju są uchwycone w pracy Mańki, Błońskiej i Wnętkowskiego [21], dalsze etapy w pracach Johnsona i Mańki [10] i Mańki [12]. Metoda ta obejmuje elementy tradycyjne, jak odpowiedni pobór próbek gleby (autor i współpracownicy pobierali je zwykle z 6 równomiernie rozmieszczonych punktów z możliwie wyrównanego areału, z głębokości 5-15 cm, przy zachowaniu w miarę możliwości warunków aseptyczności) i ich zmieszanie w jedną „próbę” (w laboratorium) oraz szereg wymogów dawniej raczej nie uwzględnianych, które można streścić w następujących punktach:

(a) Do sterylnej płytki Petriego należy przenieść nieco gleby z ogólnej próby (około $\frac{1}{2}$ objętości płytki) i wprowadzić ją w krótkotrwały ruch wirowy. Przy dolnej krawędzi denka płytki gromadzi się w tych warunkach drobnocząsteczkowa gleba, z której odważa się aseptycznie najczęściej 1 g i umieszcza na dnie wydezynfekowanego moździerza, ustawionego przy płomieniu palnika gazowego. Z kolei do moździerza dosypuje się z 500 ml kolby, w której znajduje się 149 g (tzn. 150 minus liczba gramów gleby z „próby”) wysterylizowanego drobnego piasku kwarcowego, niewielką ilość piasku (tym więcej im wilgotniejsza jest gleba) i miesza go przez delikatne ucieranie mieszadłem z glebą aż do zaniknięcia tworów grudkowatych. Tak otrzymaną mieszaninę gleby

z piaskiem wprowadza się do półlitrowej kolby z resztą piasku kwarcowego i przez mieszanie całości (może ono być dokonywane ręcznie lub za pomocą mechanicznej wstrząsarki) otrzymuje się po 10 min właściwą mieszaninę glebowo-piaskową przeznaczoną do wysiewu na płytki. Jest wskazane, aby na każde 10 płytek wysiewać mieszaninę glebowo-piaskową z osobno przygotowanej kolby z tą mieszaniną.

(b) Przeniesienie na płytki Petriego równych ilości mieszaniny glebowo-piaskowej wymaga stosowania mikroczerpaków, np. w postaci pręta mosiężnego o długości 25 cm i grubości 4 mm, na którego końcu jest wyżłobione zagłębienie o średnicy 3 mm i takiej samej głębokości. Pręt ten w chwili pobierania mieszaniny winien być odkazony. Po umieszczeniu porcji mieszaniny na denku płytki nie należy dopuszczać, aby zbyt długo tam leżała (może bowiem zanadto wyschnąć i spowodować przez to zamarcie części związanych z nią grzybów), lecz rozprowadziwszy ją kilkoma łagodnymi ruchami wirowymi po całym denku dążyć do rychłego zalania jej schłodzoną pożywką agarową.

(c) Do zalania mieszaniny glebowo-piaskowej pożywką mogą być użyte różne pożywki [10]. Jedną z najkorzystniejszych okazał się agar peptonowo-dekstrozowy z różem bengalskim o następującym składzie:

Agar	20 g,
KH_2PO_4	1 g,
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g,
pepton	5,0 g,
glukoza	10,0 g,
woda dest.	1000 ml,
róż bengalski	10 ml wodn. roztw. 1:300,
aureomycyna	2 $\mu\text{g}/1$ ml.

Wszystkie składniki oprócz różu bengalskiego i aureomycyny rozpuszcza się w wodzie, a następnie, powoli mieszając, ogrzewa się do chwili zagotowania. Z kolei do całości, po zdjęciu z grzejnika i lekkim ochłodzeniu, należy dodać i zmieszać z nią róż bengalski, a następnie rozlać do kolb (najlepiej w równych porcjach, np. po 400 ml) i po zakorkowaniu tych ostatnich oraz zabezpieczeniu kapturkami z papieru bądź odpowiedniej folii plastikowej wyjałowić w autoklawie (20 min przy 1 atm. nadciśnienia). Po ochłodzeniu agaru do temperatury około 50°C dodaje się do niego roztwór aureomycyny.

Z doświadczeń Mańki [13] wynika, że efektywność izolowania grzybów z gleby można zwiększyć dodając do podanej pożywki około 30 ml ekstraktu glebowego przygotowanego w sposób następujący: 0,5 kg badanej gleby rozmieścić w mniej więcej jednakowych porcjach w kilku (np. w ośmiu) kolbach zawierających łącznie 1500 ml wody. Kolby te luźno zabezpieczone kapturkami z papieru przechować przez 12 godz w temperaturze pokojowej, a następnie ich zawartość przefiltrować przez

bibułę i z kolei, przy słabym podciśnieniu, przez filtr Seitza G 5 wmontowany w sterylny układ z kolbą odbierającą. Przy stosowaniu ekstraktu glebowego trzeba glebę do sporządzenia ekstraktu przynieść do laboratorium odpowiednio wcześniej, albo też izolowanie grzybów odłożyć o 12 godz, a próbki gleby do tego przeznaczone przechowywać w tym czasie w lodówce.

Po zalaniu płytek Petriego (zawierających mikroporcje mieszaniny glebowo-piaskowej) cienką warstwą schłodzonej pożywki należy je wprowadzić na krótko w łagodny ruch wirowy, a po zastygnięciu pożywki wstawić na około 1-tygodniowy okres inkubacji do termostatu nastawionego na temperaturę 22-23°C.

(d) Po okresie inkubacji należy kolonie grzybów, które wyrosły na pożywce policzyć, odszczepić i zidentyfikować. Istotne jest, aby tych kolonii na 1 płytkę nie wypadło ani za dużo, ani za mało. Dlatego przy ważniejszych badaniach należy przed przystąpieniem do izolowania grzybów ustalić na podstawie prób stosunek ilościowy gleby do piasku kwarcowego. Waha się on zwykle od 1:149 do 2:148, przy czym za najbardziej zadowalającą liczbę kolonii na 1 płytkę można uważać około 8 do 15 kolonii.

2. IZOLOWANIE ZBIOROWISK GRZYBÓW Z RYZOSFERY I DROBNYCH KORZENI

Na podstawie już wcześniej znanych technik i własnej inwencji powstała metoda izolowania zbiorowisk grzybów z ryzosfery i drobnych korzeni opisana przez autora po raz pierwszy w 1965 r. i następnie stosowana z powodzeniem przez szereg innych badaczy. W myśl tej metody należy najpierw pobrać reprezentatywne dla danego obiektu próbki korzeni. Korzenie drzew leśnych (o grubości do około 1 mm) należy pobrać z 6 mniej więcej równo od siebie oddalonych osobników i umieścić w sterylnych kolbach. W przypadku roślin jednorocznych lepiej jest pobrać bryły gleby zawierające korzenie i dopiero w laboratorium wyjmować z nich korzenie. Z nagromadzonych korzeni odważa się 4 do 6 jednogramowych porcji i każdą z nich, robiąc użytek z zasad techniki Harleya i Waida [7] oraz E. S. Tetter z Akademii Rolniczej im. Timiriazewa w Moskwie (Katedra Mikrobiologii), wytrząsa się ręcznie lub w sposób zmechanizowany po dwie minuty w kolejnych 200-mililitrowych kolbach stożkowych, z których 8 pierwszych zawiera po 70 ml sterylnej wody, dziesiąta 30 g sterylnego drobnego piasku kwarcowego, a dziesiąta tylko 70 ml sterylnej wody. Po wyjęciu korzeni z ostatniej płuczki (kolby) wysusza się je za pomocą sterylnej bibuły, tnie aseptycznie na fragmenty o długości 0,5 cm i zaszczepia na agar glukozowo-ziemniaczany wg Rikerów [31]. W ten sposób można otrzymać grzyby związane anatomicznie z korzeniami.

W celu wyizolowania zbiorowisk grzybów z ryzosfery (i planosfery)

należy z poszczególnych kolb, w których odbywało się płukanie, czyli z każdej „płuczki” pobierać krople „opłuczyn” o objętości około 1/20 ml i umieszczać po jednej na agarze peptonowo-dekstrozowym z różem bengalskim Martina-Johnsona, zastygniętym na płytkach Petriego; następnie rozprowadzać je za pomocą lekko odchylonej i ukształtowanej na wzór greckiej litery delta końcowej części pręta szklanego po powierzchni pożywki. Przy tej czynności należy denko płytki z pożywką trzymać jedną ręką (zwykle lewą) w pozycji pionowej, możliwie blisko płomienia, drugą zaś rozprowadzać za pomocą „delty” tak długo, aż powierzchnia pożywki wyschnie (technika zademonstrowana autorowi w 1960 r. przez wspomnianą doc. E. Tetter, podobnie jak zalecenie dodania do dziewiątej płuczki piasku). Kolonie grzybów otrzymane z pierwszej płuczki można uważać za grzyby ryzosferowe, kolonie z dalszych płuczek — za grzyby coraz ściślej planosferowe. Niekiedy z pierwszej płuczki otrzymuje się za dużo kolonii grzybów, dlatego dobrze jest przed przystąpieniem do izolowania z niej grzybów rozdzielić jej zawartość na dwie lub trzy części (do osobnych sterylnych kolb); pierwszą z nich pozostawić bez zmiany, a następne rozcieńczyć wzrastającymi, lecz odmierzonymi ilościami sterylnej wody, po czym izolować z nich zbiorowiska grzybów i po inkubacji wybrać wersję najkorzystniejszą.

3. IZOLOWANIE ZBIOROWISK GRZYBÓW ZE ŚCIOŁKI LEŚNEJ

Sześć próbek ściółki pobranych do sterylnych kolb miesza się w laboratorium w odpowiednio dużym, zamkniętym i wydezynfekowanym pojemniku przez około 5 min, po czym odpowiednie ilości tej mieszanej próby umieszcza się w kolbie zawierającej 150 g drobnego piasku kwarcowego, oczywiście sterylnego, i po ponownym zakorkowaniu wytrząsa się całość ręcznie w sposób umiarkowanie silny przez 10 min. Piasek skontaminowany przez to grzybami występującymi w ściółce przenosi się w odmierzonych ilościach za pomocą mikroczerpaka na sterylne płytki Petriego, po czym postępuje się tak, jak przy izolowaniu zbiorowisk grzybów z gleby. Na każde 10 powtórzeń płytkowych wskazane jest przeznaczyć osobną kolbę ze skontaminowanym piaskiem. Ogółem robi się 30 do 50 powtórzeń płytkowych.

Z pracy Mańki i Gierczak [23] wynika, że ilość ściółki przeznaczona do wymieszania ze 150 g piasku winna być zróżnicowana w zależności od typu siedliskowego lasu i poziomu profilu glebowego. Na przykład na jedną kolbę z piaskiem bierze się 4-5 g ściółki sosonowej z poziomu A₀L, jeżeli pochodzi ona z siedliska lasu mieszanego, a tylko 3 g, jeżeli z siedliska boru świeżego; lub 2 g ściółki sosonowej z poziomu A₀F, jeżeli pochodzi z siedliska lasu mieszanego, i tylko 1 g — jeżeli z siedliska boru świeżego (tym więcej, im lepsze siedlisko, oraz więcej z poziomu A₀L niż z poziomu A₀F). Nie przestrzeganie tych zasad może spowodować otrzy-

manie niedogodnej liczby kolonii grzybów na jedną płytkę (znacznie większej lub znacznie mniejszej niż około 8-15). Najlepiej jest ustalić ilość ściółki jaką należy zmieszać z piaskiem na drodze prób.

4. IZOLOWANIE ZBIOROWISK GRZYBÓW Z NADZIEMNYCH CZĘŚCI ROŚLIN

Może tu chodzić o izolowanie zbiorowisk grzybów np. z pniaków drzew, z powierzchni ich pni, liści, z sęków wystających z pni, z przestrzeni powietrznej zajmowanej przez uprawy roślin itd. Nie można tutaj omawianych technik przedstawiać szczegółowo, można co najwyżej zwrócić uwagę na pewne zasady postępowania i przytoczyć przykłady. Ogólnie można powiedzieć, że należy tak postępować, aby wyizolowane zbiorowiska grzybów możliwie dokładnie reprezentowały rzeczywiste zasiedlenie przez grzyby badanego fragmentu środowiska nadziemnej części rośliny. Jako raczej udane przykłady badania zbiorowisk grzybów z zewnętrznego środowiska nadziemnych części roślin można przytoczyć pracę Burkot-Klonowej [1] o mikroflorze sęków sosny zwyczajnej jako czynnika regulującym porażenie tego drzewa przez grzyb *Phellinus pini*; prace Mańki i Przezbórskiego [26], Przezbórskiego [28] o mikroflorze pniaków sosny zwyczajnej i jej związku z występowaniem huby korzeni; pracę Mańki i Fruzińskiej o zbiorowiskach grzybów występujących na powierzchni pni sosnowych w powiązaniu z problemem infekcji tych pni przez grzyb *Fomes annosus*, i niektóre inne.

BADANIE WPŁYWU ZBIOROWISK GRZYBÓW NA ORGANIZMY FITOPATOGENICZNE

Przytoczone wyżej sposoby izolowania zbiorowisk grzybów pozwalają na poznanie ich rzeczywistej struktury, a tym samym stwarzają podstawy do badania funkcji jaką te zbiorowiska spełniają w środowisku, z którego pochodzą. Jak na razie bada się tylko określone oddziaływania cząstkowe zbiorowisk grzybów, np. wpływ na rozwój jakiegoś jednego grzyba fitopatogenicznego. Każdy z takich wpływów bądź każdą z takich funkcji trzeba badać osobno. Przykłady podano w tabeli 1, w której przedstawiono postępowanie według metody szeregów biotycznych [14, 17]. Liczby dodatnie w tabeli 1 oznaczają ograniczający wpływ na rozwój grzyba *Rhizoctonia solani*, liczby ujemne natomiast wpływ sprzyjający temu rozwojowi, wpływ tym większy (lub mniejszy), im większa (lub mniejsza) jest bezwzględna wartość tych liczb. Wpływ jednego grzyba, będącego komponentem zbiorowiska, na grzyb *Rhizoctonia solani* jest nazywany „indywidualnym efektem biotycznym”; wpływ ten pomnożony przez wielokrotność występowania komponenta w zbiorowisku — „ogólnym efektem biotycznym”, a suma algebraiczna ogólnych efektów biotycznych (która z założenia jest traktowana jako odzwierciedlenie wpływu całego zbiorowiska, a tym samym także środowiska, z którego to zbiorowisko

zostało wyizolowane) — „sumarycznym efektem biotycznym”. Ten ostatni wskazuje w tabeli 1 na dość wyraźnie sprzyjający wpływ środowiska na rozwój patogena.

Tabela 1

Wpływ zbiorowiska grzybów ze ściółki sosnowej z poziomu A₀F (nadleśnictwo Swierklaniec, oddz. 129b) na rozwój *Rhizoctonia solani*

Effect of the fungal community from pine litter from the horizon A₀F (Forest Swierklaniec, sect. 129b) on the development of *Rhizoctonia solani*

Nazwa grzyba Name of the fungus	Wielokrot- ność występowania Frequency	Jednostkowy efekt biotyczny Individual biotic effect	Ogólny efekt biotyczny Joint biotic effect
<i>Trichoderma lignorum</i>	96	+3	+288
<i>Coniothyrium fuckeli</i>	48	-7	-336
<i>Botrytis terrestris</i>	21	-6	-126
<i>Penicillium decumbens</i>	17	-7	-119
<i>Trichoderma glaucum</i>	13	+5	+65
<i>Penicillium adametzi</i>	12	-7	-84
<i>Penicillium terlikowskii</i>	11	-6	-66
<i>Penicillium paxilli</i>	11	-6	-66
<i>Penicillium canescens</i>	10	-6	-60
<i>Absidia spinosa</i>	9	-5	-45
<i>Penicillium corylophilum</i>	8	-5	-40
<i>Penicillium islandicum</i>	8	-5	-40
<i>Cladobotryum</i> sp.	6	-7	-42
<i>Mortierella jenkini</i>	5	-4	-20
Sumaryczny efekt biotyczny: Summary biotic effect			-739

Indywidualny efekt biotyczny określa się na podstawie wyników testów płytkowych. Na płytce Petriego wylewa się agar glukozowo-ziemniaczany, na który z kolei zaszczepia się w części środkowej, w odległości 2 cm od siebie, dwa grzyby, mianowicie: jeden z grzybów należących do zbiorowiska (grzyb testowy) i grzyb patogeniczny (grzyb testowany, tutaj *Rhizoctonia solani*). W dalszych testach, które wykonuje się w 4 powtórzeniach, zmieniają się grzyby testowe, a zostaje grzyb testowy. Ponadto, w dwóch powtórzeniach, zaszczepia się osobno grzyby testowe i osobno grzyb testowany. Po około 10 dniach inkubacji w temperaturze pokojowej (lepiej w stałej, wynoszącej 22-23°C) wytwarza się na płytce z hodowlą dwuorganizmową sytuacja, na podstawie której ustala się „indywidualny efekt biotyczny”, posługując się podaną skalą ocen.

Skala ocen potrzebna do ustalenia indywidualnego efektu biotycznego

Opis sytuacji na płytce Petriego	Ocena
Obydwie kolonie grzybów stykają się wzdłuż linii prostej	0
Kolonia C (komponenta zbiorowiska) styka się z kolonią P (patogena) wzdłuż linii lekko krzywej tak, że otacza mniej niż $\frac{1}{3}$ kolonii P	+1
Kolonia C styka się z kolonią P wzdłuż linii krzywej tak, że otacza co najmniej $\frac{1}{3}$, lecz mniej niż $\frac{1}{2}$ kolonii P	+2
Kolonia C styka się z kolonią P wzdłuż linii krzywej tak, że otacza co najmniej $\frac{1}{2}$, lecz mniej niż $\frac{2}{3}$ kolonii P	+3
Kolonia C styka się z kolonią P wzdłuż linii krzywej tak, że otacza $\frac{2}{3}$ lub więcej kolonii P	+4
Każdy mm strefy inhibicyjnej między obydwoma koloniami spowodowany przez kolonię C	+1
Kolonia P co najmniej o $\frac{1}{3}$, lecz mniej niż o $\frac{1}{2}$, mniejsza niż jej kolonia kontrolna wyrosła indywidualnie na innej płytce	+1
Kolonia P co najmniej o $\frac{1}{2}$, lecz mniej niż o $\frac{2}{3}$, mniejsza od jej kolonii kontrolnej	+2
Kolonia P co najmniej o $\frac{2}{3}$ mniejsza niż jej kolonia kontrolna, lecz przynajmniej częściowo rozwinięta	+3
Kolonia P zupełnie nierozwinięta	+4

Przez algebraiczne zsumowanie wszystkich możliwych według przytoczonej skali ocen (wyrażonych w postaci punktów) otrzymuje się liczbowy wyraz indywidualnego efektu biotycznego danego grzyba testowego w stosunku do grzyba testowanego. Jeżeli sytuacja na płytce Petriego układa się odwrotnie niż to wynika z powyższej skali ocen (kolonia grzyba C zajmuje miejsce kolonii grzyba P i na odwrót), to indywidualny efekt biotyczny przybiera taką samą wartość bezwzględną, lecz o znaku przeciwnym, mianowicie minusowym, i oznacza też przeciwność, tzn. wpływ sprzyjający kolonii C na rozwój kolonii P o wielkości wyrażonej bezwzględną wartością odnośnej liczby. Wynik oceny poszczególnych elementów (średnicy kolonii, szerokość strefy inhibicyjnej itd.) danej sytuacji na powtórzeniach płytkowych należy ustalać jako średnią arytmetyczną.

DYSKUSJA

Autor pragnie tu poruszyć głównie trzy zagadnienia, mianowicie, przydatności przedstawionych w pracy metod izolowania zbiorowisk grzybów, stopnia ścisłości metody szeregów biotycznych i perspektyw tej metody.

Co do metod izolowania zbiorowisk grzybów można stwierdzić, że jakkolwiek przedstawione tu metody można i trzeba dalej rozwijać i udoskonalać, są one na razie stosunkowo najbardziej przydatne. Warto by ustalić, które z wyizolowanych grzybów pochodzą od elementów aktywnych,

a które od biernych, ale na pewno lepiej jest znać ogół grzybów występujących w danym środowisku, niezależnie od formy ich aktywności, aniżeli tylko grzyby aktualnie aktywne lub tylko aktualnie bierne, gdyż elementy aktywne w innym czasie mogą być biernymi i na odwrót. Z fitopatologicznego punktu widzenia jest jak najbardziej istotne, aby zbiorowiska grzybów izolować z części środowiska, w których znajdują się miejsca na roślinie—gospodarzu, poprzez które następuje infekcja czynnikiem chorobotwórczym, oraz aby to izolowanie odbywało się o ile możliwości w porze, kiedy infekcja ta zachodzi w naturze. Ponadto warto wspomnieć, że problem aktualnej formy aktywności izolowanych grzybów może mieć różne znaczenie w zależności od typu środowiska, z którego one są izolowane. Najwięcej trudności pod tym względem następuje gleba pozaryzosferowa, powierzchnia nadziemnych części roślin; mniej ściółka leśna, jeszcze mniej ryzosfera, planosfera, pniaki drzew itp.

Ściśle rzecz biorąc metodą szeregów biotycznych należałoby badać zbiorowiska grzybów o pełnym składzie. Wówczas jednak w wielu wypadkach wysiłek z tym związany byłby nieproporcjonalnie wielki w stosunku do stopnia zwiększenia dokładności otrzymywanych wyników. Z jednej strony dlatego, że często zbiorowiska grzybów są zrównoważone, tzn. takie w których gatunki grzybów o dodatnim indywidualnym efekcie biotycznym występują na przemian z gatunkami o ujemnym indywidualnym efekcie biotycznym, tak że niezależnie od liczby wyrazów, czyli gatunków grzybów uwzględnianych w szeregu biotycznym (zaczynając od pewnego minimum, które wynosi zwykle około 15), wielkość sumarycznego efektu biotycznego utrzymuje się na mniej więcej jednakowym poziomie. Z drugiej zaś strony, nawet gdy zbiorowiska grzybów nie są zrównoważone, tzn. gdy przeważają w nich lub występują wyłącznie gatunki grzybów o jednoznakowym (plusowym lub minusowym) indywidualnym efekcie biotycznym, zwykle o wysokości sumarycznego efektu biotycznego decyduje kilkanaście najliczniej w zbiorowisku reprezentowanych gatunków grzybów. Zebrane dotąd doświadczenie poucza, że 15 najliczniej w zbiorowisku reprezentowanych gatunków obejmuje zwykle 70-80% izolatów grzybów danego zbiorowiska. Większość prac, w których znalazła zastosowanie metoda szeregów biotycznych, uwzględnia więc tylko 15 najliczniejszych przedstawicieli zbiorowiska grzybów, co ma również znaczenie dla porównywalności wyników otrzymywanych z funkcjonalnej analizy różnych zbiorowisk. W celu ilustracji tego zagadnienia podano przykłady w tabelach 2 i 3.

Tabele 2 i 3 zostały opracowane na podstawie materiałów z pracy doktorskiej Przezbórskiego [29] wykonanej pod promotorstwem autora niniejszej pracy. W rzeczywistości zbiorowisko grzybów pochodzące z nadleśnictwa Zielonka (tab. 2) składało się z 78 gatunków, a zbiorowisko z nadleśnictwa Klęska z 66 gatunków. Okazało się, że gdyby szeregi

Tabela 2

Wpływ zbiorowiska grzybów z pniaków drzewostanu sosnowego z nadleśnictwa Zielonka (oddz. 39d, wiek około 30 lat, siedlisko boru świeżego) na rozwój grzybów *Fomes annosus* i *Peniophora gigantea*
 The effect of the community of stump fungi from a 30 years old *Pinus sylvestris* stand (Forest Zielonka, section 39d, moderately good site) on *Fomes annosus* and on *Peniophora gigantea*

Gatunek grzyba Species of fungus	Często- tliwość Frequency of occurrence	<i>Fomes annosus</i>		<i>Peniophora gigantea</i>	
		Efekt biotyczny Biotic effect		Efekt biotyczny Biotic effect	
		indywi- dualny	ogólny	indywi- dualny	ogólny
		individual	joint	individual	joint
<i>Peniophora gigantea</i>	828	+6	+4968	0	0
<i>Leptographium lundbergii</i>	622	+5	+3110	-1	-622
<i>Discula pinicola</i>	246	-2	-492	-5	-1230
<i>Ceratocystis pilifera</i>	221	-2	-442	-3	-663
<i>Basidiomycetes</i> sp. 1	199	0	0	-6	-1194
<i>Sclerophoma pityophila</i>	151	-1	-151	-4	-604
<i>Stilbella subinconspicua</i>	144	-1	-144	-5	-720
<i>Dendrophoma eumorpha</i>	143	+4	+572	-4	-572
<i>Trichoderma lignorum</i>	128	+8	+1024	+8	+1024
<i>Basidiomycetes</i> sp. 2	111	0	0	-6	-666
Nie zarodnikujący	108	+4	+432	+2	+216
<i>Cephalosporium acremonium</i>	83	-4	-332	-6	-498
<i>Hirschioporus abietinus</i>	81	-3	-243	-7	-567
<i>Leptographium serpens</i>	79	-2	-158	-5	-395
<i>Botrytis cinerea</i>	72	+6	+432	0	0
Sumaryczny efekt biotyczny Summary biotic effect			+8576		-6491

biotyczne przedstawione w tabelach 2 i 3 składały się z wszystkich gatunków grzybów wchodzących w skład rozpatrywanych zbiorowisk grzybów (zrobił to właśnie Przezbórski we wspomnianej pracy), wówczas sumaryczne efekty biotyczne byłyby następujące: w przypadku nadleśnictwa Zielonka w stosunku do *Fomes annosus* +8882, a w stosunku do *Peniophora gigantea* -8714, w przypadku zaś nadleśnictwa Klęka w stosunku do *Fomes annosus* +1522, a w stosunku do *Peniophora gigantea* -3988. Widać z tego, że różnice są przeważnie bardzo nieznaczne, w każdym razie nie takie, aby prowadziły do innych wniosków niż przy wynikach z szeregów biotycznych obejmujących tylko po 15 gatunków grzybów. Tymczasem czasochłonność operacji potrzebnych przy stosowaniu metody szeregów biotycznych w stosunku do ograniczonej (w tym wypadku do 15) liczby gatunków zbiorowiska jest około 4 do 5 razy mniejsza. Przy okazji można zwrócić uwagę na to, że tabele 2 i 3 wiernie od-

Tabela 3

Wpływ zbiorowiska grzybów z pniaków drzewostanu sosnowego z nadleśnictwa Laski (oddz. 17d, wiek około 30 lat, siedlisko boru świeżego) na rozwój grzybów *Fomes annosus* i *Peniophora gigantea*
 The effect of the community of stump fungi from a 30 years old *Pinus sylvestris* stand (Forest Laski section 17 d, moderately good site) on *Fomes annosus* and on *Peniophora gigantea*

Gatunek grzyba Species of fungus	Często- tliwość Frequency of occurrence	<i>Fomes annosus</i>		<i>Peniophora gigantea</i>	
		Efekt biotyczny Biotic effect		Efekt biotyczny Biotic effect	
		indywi- dualny individual	ogólny joint	indywi- dualny individual	ogólny joint
<i>Peniophora gigantea</i>	629	+4	+2516	0	0
<i>Fomes annosus</i>	358	0	0	-4	-1432
<i>Basidiomycetes</i> sp.	341	-2	-682	-4	-1364
<i>Ceratocystis minor</i>	317	-2	-634	+3	+951
<i>Leptographium lundbergii</i>	165	+2	+330	0	0
<i>Sclerophoma pityophila</i>	145	-1	-145	-4	-580
<i>Cephalosporium acremonium</i>	105	-4	-420	-6	-630
<i>Trichoderma lignorum</i>	99	+8	+792	+8	+792
Nie zarodnikujący	76	+1	+76	0	0
<i>Mortierella isabellina</i>	61	-1	-61	-3	-183
<i>Paecilomyces elegans</i>	61	-3	-183	-3	-183
<i>Penicillium spinulosum</i>	53	+2	+106	-3	-159
<i>Discula brunneo-tingens</i>	50	-1	-50	-1	-50
<i>Aposphaeria fuscomaculans</i>	44	-5	-220	-4	-176
<i>Ceratocystis piceae</i>	36	-3	-108	-5	-180
Sumaryczny efekt biotyczny Summary biotic effect			+1317		-3194

bijają znany z doświadczenia gospodarczego fakt, że drzewostany sosnowe w nadleśnictwie Laski są znacznie bardziej zagrożone przez grzyb *Fomes annosus* niż drzewostany sosnowe w nadleśnictwie Zielonka. W ten sposób zostało liczbowo uchwycone różnicowane oddziaływanie siedlisk na stopień zagrożenia wchodzących w rachubę drzewostanów przez hubę korzeni.

Perspektywy rozwoju i zastosowania metody szeregów biotycznych zależą przede wszystkim od potrzeb, które za jej pomocą można będzie zaspokoić, a wydaje się, że potrzeby te są dość liczne i będą wzrastać. W Polsce zdołano za pomocą tej metody posunąć istotnie naprzód rozpoznanie przyczyny zamierania nalotu cisa w rezerwacie wierzchlaskim [24, 25], rzucić nowe światło na zagadnienie zgorzeli siewek sosny zwyczajnej [5, 27] i w nowy sposób wyrazić różnice siedliskowe w powiązaniu

z zagadnieniem zagrożenia chorobowego roślin leśnych [1, 6, 11, 12, 14, 15, 16, 28] i rolniczych [2, 8, 30].

Wreszcie wydaje się, że przytoczone w tej pracy sposoby izolowania grzybów środowiskowych i związana z nimi metoda szeregów biotycznych, mogą też mieć znaczenie dla śledzenia zmian zachodzących w szeroko pojętym środowisku przyrodniczym.

LITERATURA

1. Burkot-Klonowa L.: 1974, Zesz. probl. Post. Nauk rol., s. 160.
2. Czaplińska S.: 1971, Studia nad chorobami lucerny powodowanymi przez grzyby. Praca habilitacyjna (maszynopis) AR we Wrocławiu.
3. Dorenda M.: 1974, Zesz. probl. Post. Nauk rol., z. 160.
4. Garrett S. D.: 1970, Pathogenic root-infecting fungi, Cambridge, University Press.
5. Gierczak M.: 1967, Acta myc., 3, 3-49.
6. Gierczak M.: 1972, Pr. Komis. Nauk Rol. Leś. PTPN, 34, 13-59.
7. Harley J. L., Waid J. S.: 1955, Trans. Brit. Mycol. Soc., 38, 2, 104-118.
8. Jeziorska Z.: 1972, Mikoflora ryzosferowa wybranych gatunków roślin uprawnych i jej oddziaływanie na fitopatogena *Thielaviopsis basicola*. Praca doktorska (maszynopis), IUNG, Puławy.
9. Johnson L. F.: 1957, Phytopath., 47, 630-631.
10. Johnson L. F., Mańka K.: 1961, Soil Sci., 92, 79-84.
11. Kowalski S.: 1972, Badania nad składem gatunkowym grzybowych komponentów mikoryz sosny zwyczajnej na tle mikrobiologicznego środowiska glebowego. Praca doktorska (maszynopis) AR Poznań.
12. Mańka K.: 1961, Roczn. WSR Pozn., 10, 21-74.
13. Mańka K.: 1964, Pr. Komis. Nauk Rol. Leś., PTPN, 17, 29-45.
14. Mańka K.: 1965, Saprophytic soil fungi as a factor determining the development of phytopathogenic fungi living in the soil. (Materiały powielone) Poznań.
15. Mańka K.: 1967, Konferencja poświęcona badaniom nad świerkiem pospolitym w Polsce. PWN, Poznań, 97-104.
16. Mańka K.: 1970, Zbl. Bakt. Abt. II Bd. 124, 450-459.
17. Mańka K.: 1970, W: C. S. Hodges, J. Rishbeth, A. Yde-Andersen (ed.). Proceedings of the third international conference on *Fomes annosus* (1968) IUFRO, U.S. Dep. Agr., Forest Serv., Washington, D.C. 82-90.
18. Mańka K.: 1973, W: Ochrona środowiska przyrodniczego w Wielkopolsce. PTPN i AR Poznań, 14-18.
19. Mańka K.: 1973, Post. Nauk rol., 2/73, 93-101.
20. Mańka K.: 1973, A new microbiologic method for investigating the forest environment. W materiałach VII Światowego Kongresu Leśnictwa, Buenos Aires (Argentyna) 4-18 października 1972.
21. Mańka K., Błońska A., Wnękowski S.: 1961, Pr. nauk. Inst. Ochr. Rośl., 3 (2), 145-231.
22. Mańka K., Fruzińska: 1971. Wpływ zbiorowisk grzybów z powierzchni pni sosnowych na grzyb *Fomes annosus* (Fr.) Cke. (Materiały powielone) AR w Poznaniu.
23. Mańka K., Gierczak M.: 1968, Pr. Komis. Nauk Rol. Leś., PTPN, 25, 159-161.

24. Mańka K., Gierczak M., Prusinkiewicz Z.: 1968, Pr. Komis. Nauk Rol. Leś., PTPN, 25, 177-195.
25. Mańka K., Gierczak M., Strzelczyk A., Szajer C.: 1968, Pr. Komis. Nauk Rol. Leś., PTPN, 25, 165-175.
26. Mańka K., Przezbórski A.: 1973. *Fomes annosus* (Fr.) Cooke, *Peniophora gigantea* (Fr.) Masee, and other fungi colonising stumps of *Pinus sylvestris* L. W materiałach Forth International Conference on *Fomes annosus* (sierpień 1973, USA).
27. Mańka K., Kowalski S.: 1968, Pr. Komis. Nauk Rol. Leś. PTPN, 25, 197-205.
28. Przezbórski A.: 1974, Zesz. probl. Post. Nauk rol., z. 160.
29. Przezbórski A.: 1972, Mikoflora pniaków sosny zwyczajnej w określonych środowiskach leśnych jako czynnik regulujący występowanie i przebieg porażenia drzew przez hubę korzeni. Maszynopis pracy doktorskiej, AR Poznań.
30. Pudełko Z.: 1969, Próba ustalenia niektórych przyczyn dużego nasilenia chorób uwiądu pomidorów w szklarniach i poszukiwanie środków zaradczych. Maszynopis pracy doktorskiej. AR Wrocław.
31. Riker A. J., Riker R. S.: 1936, Introduction to research on Plant Diseases, John S. Swift Co., St. Louis—Chicago—New York, Cincinnati-Cleveland (USA).
32. Warcup J. H.: 1950, Nature, Lond. 166, 117.
33. Wnękowski S.: 1966, Pr. nauk. Inst. Ochr. Rośl. 8 (2), 71-146.

Кароль Манька

СООБЩЕСТВА ГРИБОВ КАК КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ НА БОЛЕЗНИ РАСТЕНИЙ

Резюме

Сообщества грибов при их достаточном изолировании из среды обитания данного растения, могут рассматриваться как отражающие определенным образом совокупность экологических факторов данной среды. Таким образом можно принять, что изучение структуры данного сообщества грибов создает основу для исследования его влияния на развитие отдельных патогенов растений и для рассматривания результатов этого изучения как отражающих влияние исследуемой среды. Однако полезность такой процедуры обусловлена применяемыми исследовательскими методами.

В данном случае дело касается двух групп методов, в частности метода изолирования сообществ грибов из среды обитания растения-хозяина и метода используемого для определения влияния сообществ грибов на развитие отдельных патогенов, в данном случае исключительно грибных патогенов.

На основании накопленного до настоящего времени опыта, автор представляет специальные методы для изолирования сообществ грибов из почвы, корнеобитаемого слоя, планосферы, корней, подстилки, пней и т.п., цитируя по мере возможности доступную литературу в давней области. Затем автор описывает и рассматривает на базе примеров (табл. 1-3) т. наз. метод биотических серий, используемый в исследованиях влияния целого сообщества грибов на патогенные грибы.

В заключение рассматриваются результаты полученные при использовании вышеуказанных методов, а также обсуждается вопрос пригодности этих методов для будущих исследований.

Karol Mańka

FUNGAL COMMUNITIES AS A CRITERION FOR ESTIMATING THE EFFECT
OF THE ENVIRONMENT ON PLANT DISEASES

S u m m a r y

Communities of fungi, if sufficiently exactly isolated from the plant environment, may be concerned as being representative in any way for the complex of ecological factors occurring in the environment. In turn it may be assumed that as far as the structure of a given fungal community is known, there is created the base for investigating the influence of it on the development of particular plant pathogens, and that the result obtained may be considered as representing the effect of the environment which from the fungal community studied derives. However the usefulness of such a procedure depends on the methods used.

There are two groups of methods involved here, namely methods for isolating fungal communities from the environment of the host plant, and methods for settling of the effect of fungal communities on the development of particular pathogens, here only of fungal pathogens.

Basing on the experience gathered up to this day the author presents the special methods for isolating fungal communities from the soil, rhizosphere, planosphere, roots, litter, stumps, etc., quoting, so far as possible, yet accessible literature. Then the so called biotic series method, destined for investigating the effect of whole communities of environmental fungi on pathogenic fungi, is described and exemplified (Tables 1 to 3).

Finally the up to this day obtained results, based on the methods mentioned, as well as the problem of the usefulness of those methods for the future research needs, are discussed.