

PORÓWNANIE DWÓCH METOD IZOLOWANIA GRZYBÓW ZGORZELOWYCH *RHIZOCTONIA SOLANI* KÜHN I *FUSARIUM OXYSPORUM* SCHLECHT Z PORĄŻONYCH SIEWEK SOSNY ZWYCZAJNEJ

Karol Mańka, Maria Gierczak

Wyższa Szkoła Rolnicza w Poznaniu

Na konferencji przedstawicieli krajów RWPG odbytej na przełomie maja i czerwca 1967 r. w Eberswalde, a poświęconej zagadnieniu zwalczania zgorzelowych chorób drzew leśnych, rozważano m. in. problem hierarchii ważności sprawców tej choroby w zainteresowanych krajach. Gdy dla warunków NRD (E. Kluge) główne znaczenie w tym względzie przypisywano grzybowi *Rhizoctonia solani*, to dla Polski (K. Mańka) i Czechosłowacji (J. Jančařík) na czoło wysuwano grzyb *Fusarium oxysporum*. E. Kluge wysunął przy tej okazji przypuszczenie, że opinie w omawianej sprawie mogą do pewnego stopnia być uzależnione od metody izolowania grzybów zgorzelowych z siewek, sugerując tym samym, że jedne metody mogą bardziej sprzyjać wyosobnieniu — w naszym przypadku — *Fusarium oxysporum*, inne znowu raczej grzyba *Rhizoctonia solani*.

W niniejszej pracy pragniemy przyczynić się do wyjaśnienia problemu zależności wyniku izolacji grzybów zgorzelowych z porażonych roślin od metody izolowania. Sądziliśmy, że w pierwszej z tego typu prac będzie najbardziej celowe przeciwstawić jedną z metod uwzględniających chemiczną dezynfekcję materiału siewkowego jednej z metod zakładających dezynfekcję mechaniczną.

Materiał siewkowy dla badań wyhodowano w laboratorium na początku 1969 r. Zdezynfekowane i podkiełkowane nasiona sosny wprowadzono (po 3 sztuki) do probówek średnicy 25 mm wypełnionych do $\frac{1}{4}$ płynną pożywką Hellera. Wyrosłe po 7 dniach siewki inokulowano czystą kulturą *Fusarium oxysporum* wyizolowaną w 1967 r. z chorych siewek buka lub czystą kulturą *Rhizoctonia solani* wyizolowaną w 1968 r. z chorych siewek sosny. W trzy dni później stwierdzono objawy porażenia siewek przez obydwie patogeny, wobec czego siewki te wprowadzono do próbek sterylnej próchnicznej gleby szklarniowej (w ilości 20 cm³), umieszczonej w probówkach, pragnąc na tej drodze otrzymać silne glebowe inokulum dla późniejszych sztucznych zakażeń.

Z kolei przygotowano dwie serie kolb stożkowych objętości po 300 ml. W jednej z tych serii kolb umieszczono po 200 ml niesterylnej gleby szklarniowej, w drugiej po 200 ml gleby szklarniowej wysterylizowanej przez dwukrotne autoklawowanie pod nadciśnieniem 1 atmosfery przez 30 min. w odstępie jednodobowym. Glebę zawartą w tych kolbach obsiano następnie dezynfekowanymi 7-proc. wodą utlenioną w ciągu 30 min., potem płukanymi w 3 zmianach sterylizowanej wody destylowanej podkielekowanymi na sterylnej pożywce glukozowo-ziemniaczanej zestalonej agarem nasionami sosny. Na każdą z kolb przypadło po 10 takich nasion. Po wyrośnięciu siewek usunięto z każdej z kolb 5 roślin gorzej rozwiniętych. Resztę siewek obsypano u podstawy porcjami (3,5 cm³) uprzednio przygotowanego inokulum glebowego zawierającego grzyb *Rhizoctonia solani* lub *Fusarium oxysporum*, bądź też w równej mierze obydwie grzyby. Łącznie z inokulum wprowadzono do każdej kolby po 10 ml sterylnej wody destylowanej. Zabiegu inokulacji dokonano w 7 dniu po wysianiu nasion. W dwa dni po inokulacji stwierdzono stosunkowo silne objawy porażenia siewek w kolbach zakażanych grzybem *Rhizoctonia solani*, a nieco słabsze objawy porażenia w kolbach zawierających *Fusarium oxysporum* i z inokulum mieszanym (*Rhizoctonia* + *Fusarium*). W dzień później zaznaczyło się również porażenie siewek w kolbach z inokulum *Fusarium oxysporum*. W serii z glebą niesterylną zachorowała również część siewek w kolbach kontrolnych, gdy w serii z glebą sterylną siewki w kolbach kontrolnych były bez wyjątku zdrowe. Każda z serii doświadczalnych zawierała po 10 kolb z *Rhizoctonia solani*, 10 kolb z *Fusarium oxysporum*, 10 kolb z inokulum mieszanym i 10 kolb kontrolnych (bez jakiegokolwiek sztucznie wprowadzonego inokulum).

Z chorych siewek izolowano patogena dwoma metodami, które w bardziej szczegółowym ujęciu przedstawiały się następująco.

Metoda 1 (płuczkowa). Zawiera ona elementy metody Harleya i Waida* i E. S. Tetter (Akademia Rolnicza im. Timiriazewa w Moskwie). Porażone siewki opłukiwano (kąpano) w destylowano-sterylnych wodach umieszczonych w ilości po 70 ml w dziesięciu kolbach stożkowych 200 ml; w ostaniej z nich mieściło się 30 g drobnego sterylne go piasku kwarcowego. W każdej z kolb opłukiwano siewki przez 2 minuty, a po wyjęciu ich z ostatniej oczyszczano z ziarenek piasku (za pomocą jeszcze jednej kąpieli w sterylnej wodzie), obsuszano powierzchniowo sterylną bibułą, dzielono na fragmenty (korzeń, szyja korzeniowa, dolna część łodygi, środkowa część łodygi, wierzchołek łodygi i igły) i wykładano na pożywkę glukozowo-ziemniaczaną. Inkubacja odbywała się przy temperaturze 22°C.

Metoda 2 (sublimatowa). Jest to w warunkach naszego la-

* Harley J. L., Waid J. S. — 1955, Arans. Brit. Mycol. Soc. 38 (2).

boratorium metoda bardzo często stosowana do izolowania czynnika patogenicznego z materiału roślinnego. Porażone siewki po opłukaniu pod wodą wodociągową (bieżącą) wprowadzono na 5 sek. do 96-proc. etanolu, z kolei na 10 sek. do 0,1-proc. sublimatu i wreszcie kąpano kolejno w 3 zmianach wody destylowanej i sterylnej co najmniej przez 10 minut. Po wyjęciu z ostatniej wody suszono je za pomocą sterylnej bibuły, rozdzielano na 6 fragmentów (korzeń, szyja korzeniowa, dolna część łodygi, środkowa część łodygi, wierzchołek łodygi i igły) i wkładano je w odpowiedniej kolejności na rozlaną na płytce Petriego pożywkę glukozowo-ziemniaczaną (wywar z 500 g ziemniaków, 20 g glukozy, 20 g agaru dopełniono do 1000 ml wodą destylowaną, pH ok. 6). Inkubacja odbywała się w tych samych warunkach co przy metodzie płuczkowej.

Wyniki pracy są zebrane w tabelach 1, 2, i 3.

Tabela 1

Przebieg porażenia siewek przez badane patogeny

Liczba dni po inokulacji	Liczba porażonych siewek w kombinacji inokulacyjnej					
	<i>F. oxysporum</i>		<i>R. solani</i>		F+R	
	N	S	N	S	N	S
3	6	4	18	14	4	3
4	18	11	36	32	5	5
6	27	24	47	45	26	33
14	41	40	47	46	43	44

N — dla niesterylnej gleby.

S — dla sterylnej gleby.

Z tabeli 1 widać, że już w trzecim dniu po inokulacji zaznaczyło się porażenie siewek, ze szczególną siłą w kombinacji inokulacyjnej z *R. solani* (w tym przypadku objawy porażenia były stwierdzone już jeden dzień wcześniej), znacznie słabiej w przypadku zakażenia grzybem *F. oxysporum* i mieszanym inokulum. Dynamika porażenia we wszystkich trzech kombinacjach inokulacyjnych była różna. Porażenie przez *R. solani* było od najmłodszego stadium siewki bardzo silne, lecz osiągnęło swe maksimum już po upływie jednego tygodnia po inokulacji. Porażenie przez *F. oxysporum* zaczęło się od stosunkowo małych wartości, lecz wnet zaczęło się pokaźnie zwiększać i do końca drugiego tygodnia po inokulacji jednostajnie wzrastało. W przypadku zakażenia mieszanym materiałem zakaźnym początkowe wartości porażenia były najmniejsze i zrazu słabo przyrastały, aby następnie od szóstego dnia po inokulacji nagle skokowo się zwiększyć i stopniowo doganiać, a nawet prześcignąć wartości osiągnięte przez każdego z dwóch patogenów z osobna. Wartości porażenia na glebie sterylnej były na ogół mniejsze

niż na glebie niesterylnej, w miarę jednak upływu czasu coraz bardziej się wyrównywały.

Z każdej kombinacji inokulacyjnej (z wyjątkiem kontrolnych, w których albo wszystkie siewki były zdrowe, jak w serii z glebą sterylną, albo tylko bardzo nieliczne uległy zakażeniu, jak w serii z glebą niesterylną) pobrano po 20 porażonych siewek i dokonano z nich izolacji patogenów wspomnianymi już dwoma metodami. Wyniki tych izolacji przedstawiają tabele 2 i 3.

Tabela 2

Wyniki izolowania dwiema metodami (M1 i M2) sprawców zgorzeli z siewek wyrosłych na glebie nie sterylizowanej

Część siewki		Liczba izolatów <i>Fusarium</i> (F), bądź <i>Rhizoctonia</i> (R) otrzymana z siewek z kombinacji inokulacyjnej z		
		<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	F+R
Korzeń	M1	16	17	14R, 10F
	M2	14	19	16R, 9F
Szyja korzeniowa	M1	16	17	14R, 17F
	M2	13	17	15R, 7F
Dolna część łodygi	M1	15	7	3R, 18F
	M2	4	8	9R, —
Środkowa część łodygi	M1	13	—	— 15F
	M2	2	—	— —
Wierzchołek łodygi	M1	9	—	— 3F
	M2	2	—	— —
Igły	M1	3	—	— —
	M2	1	—	— —

M1—metoda płuczkowa.

M2—metoda sublimatowa.

Z tabel 2 i 3 wynika, że na ogół więcej izolatów (niezależnie od metody izolowania) otrzymano z porażonych siewek wyrosłych na glebie sterylnej (seria II), a mniej z siewek wyrosłych na glebie niesterylnej. Jedynie w kombinacji inokulacyjnej z mieszaniną patogenów (*R.* + *F.*) i w stosunku do samego tylko grzyba *Rhizoctonia solani* w tej mieszaninie było odwrotnie. Metoda 1 (płuczkowa) wydaje się bardziej przydatna do izolowania grzyba *Fusarium oxysporum* niż metoda 2 (sublimatowa), gdy do izolowania grzyba *Rhizoctonia solani* lepiej wydaje się nadawać metoda 2. Grzyb *Fusarium oxysporum* przejawiał tendencję do systemicznego przenikania całych siewek, natomiast grzyb *Rhizoctonia solani* w zasadzie ograniczał penetrację do korzeni i dolnej części łodygi.

Omawiając otrzymane wyniki warto, być może, poruszyć zagadnienie aktywności rozpatrywanych patogenów w glebie sterylnej i niesterylnej oraz spróbować wyjaśnić zróżnicowanie wyników izolacji otrzymanych dwoma zastosowanymi metodami. Z jednej strony wyniki te potwierdzają znane już zjawisko, w myśl którego w glebie pozbawionej mikroflory organizmy patogeniczne (jeżeli je wprowadzić do takiego środowiska) rozwijają się i działają znacznie silniej niż w glebie zawierającej mikroflorę saprofityczną. Z drugiej strony jednak rozpatrywa-

Tabela 3

Wyniki izolowania dwiema metodami (M1 i M2) sprawców zgorzeli z siewek wyrosłych na glebie sterylnej

Część siewki		Liczba izolatów <i>Fusarium</i> (F), bądź <i>Rhizoctonia</i> (R) otrzymana z siewek z kombinacji inokulacyjnej z		
		<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	F+R
Korzeń	M1	20	18	3R, 19F
	M2	20	19	8R, 18F
Szyja korzeniowa	M1	20	20	2R, 20F
	M2	13	19	6R, 11F
Dolna część łodygi	M1	18	7	1R, 20F
	M2	5	3	2R, 4F
Środkowa część łodygi	M1	13	2	— 7F
	M2	2	2	2R, —
Wierzchołek łodygi	M1	10	—	— 2F
	M2	—	—	— —
Igły	M1	6	—	— 1F
	M2	—	—	— —

Objaśnienia jak w tabeli 2.

ne patogeny w obydwu warunkach glebowych zachowują specyficzny dla nich typ działania. W obydwu glebach *Fusarium oxysporum* początkowo rozwijało słabą aktywność chorobotwórczą, potem stopniowo i dość znacznie a równomiernie ją rozwijało, *Rhizoctonia solani* zaś w najmłodszym stadium rozwojowym siewek zadziałała wybitnie niszczytel-sko, by po jednym już tygodniu wejść w fazę stagnacji patogenicznej; wreszcie łączne działanie obydwu patogenów było dłużej niż w przypadku samego *Fusarium oxysporum* słabe, lecz później skokowo znacznie się nasiliło i potem już równomiernie i stale (do końca okresu obserwacji, wynoszącego 2 tygodnie) intensywnie wzrastało. Wynikają stąd implikacje dla dalszych badań nad ekologią i wzajemnymi na sie-

bie wpływami fitopatogenicznych grzybów glebowych na tle zbiorowisk saprofitycznych mikroorganizmów bytujących w glebie.

Co do różnicowania dwóch metod izolowania zastosowanych w niniejszej pracy nasuwają się dwie możliwości wyjaśnienia tego zjawiska. Najpierw wydaje się więc, że grzyb *Rhizoctonia solani* przenika swymi strzępkami do najgłębszych tkanek korzenia i łodygi siewek, gdy grzyb *Fusarium oxysporum* opanowuje raczej tylko bardziej zewnętrzne partie tych tkanek. W takiej sytuacji byłoby łatwo zrozumiałe, że przy stosowaniu metody izolowania z dezynfekcją alkoholowo-sublimatową grzybnia *Fusarium oxysporum* może ulec całkowitej likwidacji, gdy głębiej leżąca grzybnia *Rhizoctonia solani* może się zachować i zapewnić pozytywny wynik izolacji. Druga możliwość wyjaśnienia opiera się na antycypacji poglądu, że grzybnia *Rhizoctonia solani* jest odporniejsza na działanie sublimatu niż grzybnia *Fusarium oxysporum*. Jest oczywiście możliwe także wyjaśnienie pośrednie, uwzględniające zarówno moment głębszego usytuowania grzybni *Rhizoctonia solani* w siewce, jak i moment większej odporności tego patogena na sublimat. Właściwe rozstrzygnięcie mogą przynieść odpowiednie badania.

Reasumując przedstawioną pracę pozwalamy sobie dokonać zestawienia głównych jej wyników.

1. Sztuczne zakażenie siewek sosny wyrosłych na glebie niesterylnej grzybami *Fusarium oxysporum* i *Rhizoctonia solani* doprowadziło na ogół do silniejszego porażenia niż sztuczne zakażenie tymi samymi grzybami siewek wyrosłych na glebie sterylnej.

2. Każdy z badanych patogenów powodował niezależnie od warunków glebowych specyficzny dla siebie przebieg choroby siewek sosnowych. Grzyb *Rhizoctonia solani* atakował siewki silniej w pierwszym tygodniu ich rozwoju, natomiast grzyb *Fusarium oxysporum* raczej w drugim. Wynika stąd istotność terminu izolacji dla oceny znaczenia badanych patogenów jako sprawców zgorzeli siewek.

3. Zastosowanie mieszanego materiału zakaźnego (*Fusarium oxysporum* + *Rhizoctonia solani*) wywołało w pierwszym okresie bardzo słabe porażenie siewek, w następnym (drugi tydzień) natomiast bardzo silne i stale wzrastające.

4. Płuczkowa metoda izolowania patogena z chorych siewek była bardziej czuła w stosunku do *Fusarium oxysporum*, natomiast metoda sublimatowa była lepsza w stosunku do *Rhizoctonia solani*.

5. Przyczyny różnej przydatności zastosowanych metod izolowania grzybów zgorzelowych z chorych siewek można się dopatrywać albo w głębszym ulokowaniu w siewce grzybni *Rhizoctonia solani* a płytszym *Fusarium oxysporum*, albo w większej odporności pierwszego z nich na sublimat, albo i w jednym, i drugim; rozwiązanie tego problemu można osiągnąć tylko na drodze odpowiednich badań.

Кароль Манька, Мария Герчак,

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ДВУХ МЕТОДОВ ВЫДЕЛЕНИЯ ГРИБОВ
RHIZOCTONIA SOLANI KÜHN И *FUSARIUM OXYSPOURUM* SCHLECHT,
ВЫЗЫВАЮЩИХ ПОЛЕГАНИЕ, ИЗ ПОРАЖЕННЫХ СЕЯНЦЕВ СОСНЫ
ОБЫКНОВЕННОЙ

Краткое содержание

Работа была сосредоточена на выяснении вопроса, может ли метод выделения из больного растения грибов, вызывающих полегание, оказать влияние на результат выделения в тех случаях, когда необходимо выделить несколько патогенов.

На стерилизованной и нестерилизованной почве были посеяны прорастающие незараженные (т.е. дезинфицированные и выращенные на стерильном агаре) семена сосны обыкновенной. Выросшие сеянцы были искусственным образом (путем рассыпки по поверхности опытной почвы небольшого количества почвы, содержащей проросший патоген) заражены или грибом *Fusarium oxysporum*, или грибом *Rhizoctonia solani*, или обоими грибами одновременно. Из больных сеянцев были выделены патогены с помощью двух методов: метода „полоскания” (разработанного в основном Харлеем и Вайдом и дополненного техникой Е. С. Теттер из Сельскохозяйственной академии им. Тимирязева в Москве) и „сулемного” метода (состоящего в дезинфекции препаратов алко-голем и сулемой, полоскании в стерилизованной воде и в прививке фрагментов растения на агаровой питательной среде). Были получены следующие результаты: 1) в отношении *Fusarium oxysporum* более чувствительным оказался метод выделения патогена из больных сеянцев путем полоскания, а по отношению к *Rhizoctonia solani* более эффективным был сулемной метод, 2) Как на стерилизованной (характеризовавшейся большей степенью поражения), так и на нестерилизованной почве каждый из исследовавшихся патогенов вызвал характерный для себя процесс заболевания сеянцев. Гриб *Rhizoctonia solani* поражал сеянцы сильнее уже в течении первой недели их развития, а гриб *Fusarium oxysporum* скорее впродолжение второй недели. Это обстоятельство подчеркивает роль срока изоляции при оценке значения патогенов, как возбудителей полегания. 3) Применение смешанного инфекционного материала (*Fusarium oxysporum* + *Rhizoctonia solani*) характеризовалось сначала очень слабым поражением сеянцев, а потом (на второй неделе после всхода) очень интенсивным и непрерывно усиливающимся. 4) Гриб *Fusarium oxysporum* отличается склонностью к систематическому проникновению во весь сеянец; распространение же гриба *Rhizoctonia solani* ограничивается в основном зоной корней и нижней части ствола.

Karol Mańka, Maria Gierczak

COMPARISON OF TWO METHODS FOR ISOLATING THE FUNGI *RHIZOCTONIA SOLANI* KÜHN AND *FUSARIUM OXYSPOURUM* SCHLECHT FROM SCOTS PINE SEEDLINGS ATTACKED BY DAMPING-OFF

Summary

It was attempted to ascertain the effect of methods of damping-off producing fungi isolation from sick plants, on the result of isolation if more than one pathogen is taken into consideration. Pregerminated and free from infection. Scots

Pine seeds were sown on sterile and non-sterile soil. After seedlings were developed, they were artificially infected (by strewing small amount of pathogen containing soil onto the surface of experimental soil) by *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, or a mixture of these fungi. Pathogens were then isolated from sick seedlings by means of two methods viz. the „rinsing method” (developed originally by Harley and Waid, but supplemented by E. S. Tetter from Timiriazeff Agriculture Academy, Moscow), and „sublimate method” (disinfection with alcohol and sublimate, rinsing with sterile water, grafting plant fragments on agar substrate). Results can be summarized as follows:

1. Rinsing method of pathogen isolation from sick seedlings proved to be more sensitive in relation to *Fusarium oxysporum*, whereas sublimate method was better in relation to *Rhizoctonia solani*.

2. Both on non-sterile soil (where the infestation was generally more severe) as on sterile one, each investigated pathogen caused specific for itself course of disease in seedlings. *Rhizoctonia solani* fungus attacked seedlings more intensively in the first week of their growth, while *Fusarium oxysporum* was more active rather in the second week. This means that the time of isolation is an important factor for the assessment of pathogens as damping-off perpetrators.

3. Application of mixed infecting material (*Fusarium oxysporum* plus *Rhizoctonia solani*) resulted, in the first period, in very slight infestation of seedlings, in the second period (the second week after shooting up), however, the infestation was high and steadily increasing in intensity.

4. *Fusarium oxysporum* fungus featured the tendency to penetration of the whole seedling whereas *Rhizoctonia solani* was characteristic by limiting penetration to roots and lower part of seedling stem.