

Eligia Starzycka, Michał Starzycki, Jan Pszczola*

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Poznaniu

* Hodowla Roślin Strzelce Spółka z o.o., Oddział w Borowie

Rozwój apotecjów grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary w warunkach in vitro

In vitro development of apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Słowa kluczowe: rzepak, *Brassica napus*, zgnilizna twardzikowa, *Sclerotinia sclerotiorum*, rozwój apotecjów in vitro

Key words: oilseed rape, *Brassica napus*, stem rot, *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro apothecium development

Badania zdolności tworzenia apotecjów grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary przeprowadzono w dwóch cyklach w okresie trzech lat. W pierwszym cyklu w badaniach wykorzystano 14 patotypów *S. sclerotiorum* pochodzących z różnych części Europy. Kultury grzyba hodowano in vitro na pożywce PDA w czterech kombinacjach temperaturowo-światlnych przez okres siedmiu miesięcy. Po tym okresie stwierdzono, że apotecja liczniej powstawały w warunkach braku dostępu światła. W drugim cyklu użyto 22 patotypów *S. sclerotiorum* pochodzących z Polski i Chin. Kultury grzyba hodowano także w warunkach in vitro, również w czterech kombinacjach temperaturowo-światlnych przez okres dziewięciu miesięcy. Łącznie w drugim cyklu otrzymano ok. 1100 apotecjów u różnych patotypów *S. sclerotiorum*. Stwierdzono, że najlepszymi stymulatorami powstawania apotecjów były ciemność i chłód.

Investigation on the capacity of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary apothecia formation was conducted during three years in two cycles. 14 pathotypes of *S. sclerotiorum* originating from different parts of Europe were used in the first cycle. Fungus cultures had been grown on PDA medium in four light/temperature combinations for seven months. During the observation period it was observed that apothecia more often came into being in darkness. 22 pathotypes of *S. sclerotiorum* originating from Poland and China were tested in the second cycle. Fungus cultures had been grown on PDA medium in four light/temperature combinations for nine months in the 2-nd experimental cycle. Over 1100 apothecia of different pathotypes of *S. sclerotiorum* were received altogether. The investigation showed that the best conditions for apothecia formation were darkness and cooling.

Wstęp

Większość metod inokulacji grzybem *S. sclerotiorum* stosowanych w celu stwierdzenia odporności lub jej braku u rzepaku, oparta jest na obserwacji plam infekcyjnych na łodygach roślin wywołanych przez strzępki sprawcy. Inokulum najczęściej stanowią przerośnięte grzybnią patogena odpowiednio preparowane

ziarniaki zbóż (Starzycka i Starzycki 1997) aplikowane na roślinę lub doglebowo (CETIOM 1990, Weber 2002). Inne metody oparte są na obserwacji zamierania blaszki liściowej pod wpływem kwasu szczawiowego — naturalnie występującej u *S. sclerotiorum* mikotoksyny (Freyssinet i in. 1995). W literaturze można spotkać także doniesienia, w których inokulum stanowiły agarowe krążki przerośnięte grzybnią patogena, a odporność roślin oceniana była na podstawie szybkości i rozwoju wielkości plam infekcyjnych powstałych na liściach. Opracowań dotyczących wykorzystania zarodników workowych otrzymywanych w warunkach *in vitro* z przeznaczeniem do inokulacji rzepaku nie znaleziono. Z punktu widzenia hodowli odpornościowej ważna jest znajomość polimorfizmu różnych patotypów *S. sclerotiorum* wyrażona między innymi zdolnością do tworzenia kwasu szczawiowego (Starzycka i in. 2002), szybkością przerastania i opanowywania roślin gospodarzy oraz syntetycznych pożywek, zdolność do tworzenia apotecjów przez różne patotypy, a także polimorfizm DNA grzyba, którego w tej pracy nie analizowano. Po wstępnie zaobserwowanym zjawisku powstawania apotecjów na sklerocjach w warunkach laboratoryjnych, próbowano wytworzyć takie warunki fizyczne, które pozwoliłyby na ich optymalne otrzymywanie. W przyszłości, następnym, bardzo ważnym zagadnieniem będzie opracowanie parametrów pozwalających na otrzymanie dużej ilości zarodników workowych.

Materialy i metody

Badania zdolności tworzenia apotecjów grzyba przeprowadzono w dwóch cyklach w okresie trzech lat. Każdy z patotypów zaszczipiono na trzy płytki Petriego z pożywką PDA (Potato Dextrose Agar). W pierwszym cyklu pilotażowym w badaniach wykorzystano 14 patotypów *S. sclerotiorum* pochodzących z różnych miejsc Polski oraz Europy. Izolaty te oznaczone były następującymi symbolami: S.s.-1, S.s.-2 (pochodzenie — Małyszyn), S.s.-3 (izolat otrzymany z grzybni, pochodzenie — Poznań), S.s.-3 (izolat otrzymany z fragmentów apotecjów, pochodzenie — Poznań), S.s.-4, S.s.-5, S.s.-6, S.s.-7, S.s.-8, S.s.-10 (pochodzenie — Małyszyn), S.s.-329 (pochodzenie — Słowacja), S.s.-110, S.s.-115 (pochodzenie — Węgry), S.s.-05 (izolat otrzymany z Rothamsted — UK).

Kultury grzyba hodowano siedem miesięcy w różnych kombinacjach temperaturowo-światlnych w okresie od sierpnia 2000 do lutego 2001 roku.

Początkowe warunki hodowli grzyba *S. sclerotiorum* były następujące:

- I Pokój hodowlany, temperatura 18°C, ciemność;
- II Fitotron, temperatura ok. 1°C, ciemność;
- III Fitotron, temperatura ok. 1°C, światło — 12 h/12 h;
- IV Naturalny termoperiod (warunki polowe), temperatura minimalna -15°C, maksymalna 8°C, ciemność.

Po siedmiu miesiącach na płytkach Petriego liczono powstające apotecja (suma apotecjów z 3 płytek).

W drugim cyklu użyto 22 patotypy *S. sclerotiorum* pochodzące z Polski i Chin. Izolaty te oznaczone były następującymi symbolami: S.s.-1, S.s.-2 (Małyszyn), S.s.-3 (izolat wyszczepiony z grzybni, Poznań), S.s.-5, S.s.-10 (Małyszyn), S.s.-15 (Borowo), 1Ch – 16 Ch (izolaty z Chin).

Kultury grzyba hodowano także w warunkach *in vitro* (każdy izolat zaszczerpiono na 4 płytki z pożywką PDA), w czterech kombinacjach temperaturowo-światlnych przez okres dziewięciu miesięcy:

- I Pokój hodowlany, temperatura 16°C, ciemność;
- II Pokój hodowlany, temperatura 16°C, kultury wystawione na światło — 12 h fotoperiod;
- III Laboratorium, temperatura około 22°C, światło — 12 h;
- IV Warunki komory chłodniczej, temperatura 5°C, ciemność.

Pierwsze liczenie owocników przeprowadzono 3 tygodnie przed upływem dziewięciu miesięcy. Po upływie dziewięciu miesięcy na płytkach Petriego z patogenem *S. sclerotiorum* powtórnie liczono powstałe owocniki (suma apotecjów z 4 płytek).

Poziom istotności dla poszczególnych kombinacji wyliczono testem t-Studenta.

Wyniki

Wyniki przedstawiono w formie tabel i fotografii, na której utrwalono obraz powstających w warunkach *in vitro* apotecjów grzyba *S. sclerotiorum*.



Fot. 1. Apotecja grzyba *S. sclerotiorum* otrzymane w warunkach *in vitro* — *Apothecia of fungus *S. sclerotiorum* received in *in vitro* conditions*

Tabela 1

Tworzenie w warunkach *in vitro* grzybni, sklerocjów i apotecjów przez różne polskie i europejskie patotypy grzyba *S. sclerotiorum* w zależności od warunków hodowli
In vitro formation of mycelium, sclerotia and apothecia by different pathotypes of fungus S. sclerotiorum depending on initial growing conditions

Patotyp <i>Pathotype</i>	Warunki hodowli <i>S. sclerotiorum</i> — <i>Growing conditions for S. sclerotiorum</i>			
	I — 18°C ciemność <i>darkness</i>	II — 1°C ciemność <i>darkness</i>	III — 1°C światło <i>light</i>	IV warunki polowe <i>field conditions</i>
S.s.-1 (Małyszyn)	2 apotecja, sklerocja	1 apotecjum, sklerocja	sklerocja	sklerocja
S.s.-2 (Małyszyn)	sklerocja	grzybnia, sklerocja	sklerocja, grzybnia	grzybnia
S.s.-3 (Poznań) z grzybni <i>from mycelium</i>	sklerocja, grzybnia	sklerocja	1 apotecjum, sklerocja, grzybnia	sklerocja
S.s.-3 (Poznań) z apotecjów <i>from apothecia</i>	1 apotecjum, sklerocja	sklerocja	sklerocja	sklerocja
S.s.-4 (Małyszyn)	grzybnia	grzybnia	grzybnia	grzybnia, sklerocja
S.s.-5 (Małyszyn)	14 apotecjów*, sklerocja	sklerocja	sklerocja	sklerocja
S.s.-6 (Małyszyn)	grzybnia	grzybnia	grzybnia, sklerocja	grzybnia
S.s.-7 (Małyszyn)	sklerocja	sklerocja	sklerocja	sklerocja
S.s.-8 (Małyszyn)	sklerocja	sklerocja, grzybnia	grzybnia	sklerocja
S.s.-10 (Małyszyn)	sklerocja	17 apotecjów, sklerocja, grzybnia	grzybnia, sklerocja	1 apotecjum, sklerocja
S.s.-329 (Słowacja)	sklerocja	sklerocja	sklerocja	sklerocja
S.s.-110 (Węgry)	sklerocja	sklerocja	sklerocja, grzybnia	sklerocja
S.s.-115 (Węgry)	sklerocja	sklerocja	sklerocja	sklerocja
S.s.-05 (Rothamsted, UK)	grzybnia	sklerocja, grzybnia	grzybnia	grzybnia

* Liczba powstałych owocników — *The number of arised apothecia*

Tendencja do tworzenia sklerocjów lub grzybni przez poszczególne patotypy
Individual pathotypes tendency to mycelium and sclerotia arising

Zaobserwowano, że apotecja częściej powstawały w warunkach braku dostępu światła.

Tabela 2

Tworzenie w warunkach in vitro grzybni, sklerocjów i apotecjów przez różne polskie i chińskie patotypy grzyba *S. sclerotiorum* w zależności od warunków hodowli
In vitro formation of mycelium, sclerotia and apothecia by different Polish and Chinese pathotypes of fungus S. sclerotiorum depending on initial growing conditions

Patotyp <i>Pathotype</i>	Warunki hodowli <i>S. sclerotiorum</i> — <i>Growing conditions for S. sclerotiorum</i>			
	I — 16°C ciemność <i>darkness</i>	II — 16°C światło <i>light</i>	III — 22°C światło <i>light</i>	IV — 5°C ciemność <i>darkness</i>
S.s.-1 (Małyszyn)	grzybnia	grzybnia	grzybnia	sklerocja, grzybnia
S.s.-2 (Małyszyn)	grzybnia, sklerocja	4 apotecja, grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	pierwsze liczenie – 44 drugie liczenie – ok. 150 apotecjów, grzybnia, sklerocja
S.s.-3 (Poznań)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	pierwsze liczenie – 32 drugie liczenie – ok. 300 apotecjów, grzybnia, sklerocja
S.s.-5 (Małyszyn)	10 apotecjów, grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	25 apotecjów grzybnia, sklerocja
S.s.-10 (Małyszyn)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja
S.s.-15 (Borowo)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja
1Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	15 apotecjów, grzybnia, sklerocja
2Ch (Chiny)	19 apotecjów, grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	ok. 50 apotecjów, grzybnia, sklerocja
3Ch (Chiny)	10 apotecjów, grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja
4Ch (Chiny)	pierwsze liczenie – 31 drugie liczenie – 210 apotecjów, grzybnia, sklerocja	18 apotecjów, grzybnia, sklerocja,	grzybnia, sklerocja	10 apotecjów, sklerocja
5Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja
6Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	2 apotecja, grzybnia, sklerocja
7Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	pierwsze liczenie – 10 drugie liczenie – 26 apotecjów, grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	24 apotecja, grzybnia, sklerocja

ciąg dalszy tabeli 2

8Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja
9Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	10 apotecjów, grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja
10Ch (Chiny)	32 apotecja, grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	32 apotecja, grzybnia, sklerocja
11Ch (Chiny)	pierwsze liczenie – 20 drugie liczenie – 130 apotecjów, grzybnia, sklerocja	23 apotecja, grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	8 apotecjów, grzybnia, sklerocja
12Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	5 apotecjów grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja
13Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja
14Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja
15Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja
16Ch (Chiny)	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	grzybnia, sklerocja	4 apotecja, grzybnia, sklerocja
Poziom istotności test t-Studenta Kombinacja I z II 0,0482* Kombinacja I z IV 0,0401* Kombinacja II z IV 0,0021**				

Objaśnienia jak w tabeli 1 — Explanations as in Table 1

Łącznie po dziewięciu miesiącach hodowli *in vitro* otrzymano około 1100 apotecjów z różnych patotypów *S. sclerotiorum* i stwierdzono, że najlepszymi stymulatorami powstawania apotecjów są: ciemność (podobnie jak w pierwszym cyklu badawczym) i chłód.

Dyskusja

Zarodniki workowe grzyba *Sclerotinia sclerotiorum* są główną przyczyną infekcji roślin w warunkach naturalnych. Tak więc otrzymywanie ich w warunkach *in vitro* z przeznaczeniem do inokulacji może pomóc w selekcji form rzepaku odpornych na zgniliznę twardzikową.

W warunkach naturalnych największe stężenie zarodników workowych obserwuje się na przełomie maja i czerwca (Sansford 1995), a więc w okresie,

w którym rzepak znajduje się w fazie pełni kwitnienia. Przeprowadzone badania pozwoliły na stwierdzenie, że synchronizacja powstawania apotecjów, a następnie zarodników workowych w warunkach *in vitro* (fot. 1) z odpowiednią fazą rozwoju roślin jest realnie możliwa.

Do obliczeń statystycznych dla otrzymanych wyników użyto testu t-Studenta. Różnice istotne otrzymano tylko dla liczby apotecjów otrzymanych na początku prowadzonych obserwacji, tj. 3 tygodnie przed końcem doświadczenia. Pod koniec eksperymentu wartości te uległy zmianie ze względu na dużą liczbę powstających nowych owocników.

Dyskusyjne są wyniki otrzymane z kombinacji II (tab. 2), w której szalki z grzybnią przetrzymywano na świetle w umiarkowanej temperaturze. Prawdopodobnie ich rozbieżność wynika z niezbyt precyzyjnego dotrzymania parametrów fizycznych pod koniec hodowli patotypów *S. sclerotiorum*. Ze względu na konieczność przeniesienia kultur do innego pomieszczenia, wszystkie płytki umieszczono w ciemnym i chłodnym (ok. 12°C) laboratorium. Podczas sprawdzania ich stanu, przed przeniesieniem, nie stwierdzono żadnego apotecjum, jednak okres 10 dni okazał się wystarczający dla niektórych izolatów do inicjacji ich powstawania, a szok temperaturowo-świetlny zapewne był tego przyczyną.

Podsumowanie

- W pierwszym pilotażowym cyklu badań, po siedmiomiesięcznym okresie obserwacji stwierdzono, że apotecja częściej powstawały w warunkach braku dostępu światła.
- W drugim cyklu, po dziewięciu miesiącach hodowli sklerocjów *in vitro* otrzymano około 1100 apotecjów z różnych patotypów *S. sclerotiorum*. Potwierdzono, że najlepszymi stymulatorami powstawania apotecjów są: ciemność (podobnie jak w pierwszym cyklu) i obniżona temperatura (5–15°C).

Conclusions

- During the first cycle of experiments it was observed that apothecia more often came into being in darkness.
- During the second cycle of *in vitro* growing of different pathotypes of *S. sclerotiorum* over 1100 apothecia were formed. It was confirmed that darkness and cooling (5–15°C) were the best conditions for apothecia formation.

Literatura

- CETIOM 1990. Techniques for the artificial contamination of oilseed rape in trial plots. *Sclerotinia sclerotiorum* stem rot. 27-33.
- Freyssinet M., Dumas B., Sailland A., Pepin R., Freyssinet G., Pallet K. 1995. Transgenic crops expressing oxalate oxidase as a way to increase resistance to oxalate – producing pathogenes. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, vol. 4: 1278-1279.
- Sansford C. 1995. Oilseed rape: an aid to *Sclerotinia* risk forecasting. Rapeseed today and tomorrow, 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, 4-7 July 1995, vol. 3: 1007-1009.
- Starzycka E., Starzycki M. 1997. Nowa metoda inokulacji roślin rzepaku ozimego patogenem *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XVIII (2): 315-320.
- Starzycka E., Kachlicki P., Starzycki M. 2002. Zróżnicowanie polskich i chińskich izolatów *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary pod względem zdolności do wytwarzania kwasu szczawiowego. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXIII (2): 385-390.
- Weber Z. 2002. Skuteczność biopreparatu Contans WG (*Coniothyrium minitans* Campb.) w ochronie rzepaku ozimego przed *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXIII (1): 151-156.