

KATARZYNA REDLAK, HANNA DAHM

Wpływ grzybów ektendomikoryzowych i bakterii dwuazotoficznych na siewki sosny (*Pinus sylvestris* L.) – in vitro

The effect of ectendomycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria
on pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.) in vitro

Abstract. Ectendomycorrhizal fungi influenced on various ways on shoots and roots of pine seedlings, most often however it was an inhibiting action. *Bacillus polymyxa* stimulated the length of shoots in seedlings inoculated earlier with the *Wilcoxina* sp. Z 30362K fungus. No impact of *Azospirillum brasilense* on pine seedlings was observed.

Wstęp

Ektendomikoryzy mają cechy zarówno ektomikoryz (mufka grzybniowa, sieć Hartiga) jak i endomikoryz (wewnątrzkomórkowa penetracja komórek epidermalnych i mięsisku korowego). Ektendomikoryza rozwija się często w środowiskach zdegradowanych przez przemysł, o znacznej zawartości metali toksycznych (24). Ten typ mikoryz charakterystyczny jest też dla szkółek leśnych, często przenawożonych azotem (25). Ektendomikoryzy wykrywano na korzeniach siewek w procesach naturalnej regeneracji lasów sosnowych i czasami na korzeniach drzew starszych (11). Mikola i in. (18) stwierdzili obecność grzyba ektendomikoryzowego *Wilcoxina mikolae* jako pierwszego mikoryzowego kolonizatora siewek sosny na obszarach popożarowych. Wszystkie te obserwacje wskazują na to, że grzyby ektendomikoryzowe mogą powszechnie występować w glebach leśnych, chociaż ich konkurencyjne możliwości z grzybami ektomikoryzowymi wydają się słabe.

Dostępność azotu w glebie może być ważnym czynnikiem naturalnej selekcji symbiontów mikoryzowych – rośliny i grzyba. Z licznych badań wynika, że mikoryzom utworzonym przez różne grzyby towarzyszą bakterie dwuazotoficzne (13, 15, 23). Potencjalny korzystny wpływ bakterii dwuazotoficznych, wolnożyjących lub symbiotycznych, na grzyby mikoryzowe i/lub na roślinę gospodarza nie ogranicza się tylko do zaopatrywania mikoryzowych partnerów w azot, w ubogich glebach leśnych. Organizmy te mogą również wytwarzać witaminy z grupy B, aminokwasy, hormony wzrostu i inne biologicznie czynne substancje (14, 16, 8, 6, 22, 3, 7).

Materiał i metody

Pochodzenie grzybów i bakterii

Grzyby ektendomikoryzowe:

Wilcoxina mikolae Yang i Korf var. *mikolae* (ATCC 52685), wyizolowany z korzeni *Pinus resinosa* (Red pine) w Oregonie, USA; *Wilcoxina* sp. BG 30335K, wyizolowany z korzeni mikoryzowych siewek sosny zwyczajnej (*P. sylvestris* L.) w szkółce leśnej Barwałd, Nadleśnictwo Andrychów; *Wilcoxina* sp. Z 30362K, wyizolowany z korzeni mikoryzowych siewek sosny zwyczajnej (*P. sylvestris* L.) w szkółce leśnej Zabrzeg, Nadleśnictwo Bielsko-Biała.

Bakterie diazotroficzne towarzyszące mikoryzom:

Azospirillum brasilense Cd (ATCC 29710), wyizolowany z korzeni cynodonu palczastego (*Cynodon dactylon* (L.) Pers); *Bacillus polymyxa*, wyizolowany z wnętrza ektendomikoryzy *Pinus sylvestris* L. utworzonej przez grzyba Mrg X.

Hodowla grzybów i bakterii

Grzyby ektendomikoryzowe hodowano na skosach sporządzonych z Potato Dextrose Agar (PDA, Difco), w temperaturze 24°C przez okres 10-14 dni. Bakterie hodowano na skosach agarowych z pożywką Rennie (20), inkubowano w temperaturze 26°C.

Pochodzenie nasion sosny zwyczajnej

Nasiona sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) pochodziły z wyluszczeni w Klosnowie pod Chojnicami, Nadleśnictwo Rytel.

Hodowla siewek sosny

Nasiona sosny sterylizowano powierzchniowo wstrząsając przez 20 minut w 30% wodzie utlenionej (H₂O₂), po czym przepłukiwano kilkakrotnie sterylną wodą destylowaną. Osuszone nasiona wykładano na szalki Petriego z pożywką o składzie: peptobak – 10,0 g, agar – 15,0 g (na litr pożywki). Nasiona inkubowano w temperaturze pokojowej przy oświetleniu ciągłym. Po 5-7 dniach hodowli skielkowane nasiona sosny o równej długości korzonka, przenoszono aseptycznie do plastikowych kubków (o pojemności 0,3 l) po 4 do każdego. Podłoże hodowlane stanowiła mieszanina gleby spod sosny oraz wermikulitu i torfu (1:1:1). Połowę mieszaniny wyjałowiono przez trzykrotną sterylizację, przez 30 minut w temperaturze 100°C, w odstępach 7-dniowych. Hodowle siewek prowadzono w klimatyzowanej komorze hodowlanej o fotoperiodzie: 16 godzin oświetlenia około 43-48 μmol x m⁻² x s⁻¹ przy temperaturze 20-24°C i 8 godzin ciemności przy temperaturze 18-20°C. Do podlewania siewek zastosowano rozcieńczoną (1:10) pożywkę mineralną Ingestada (9) [przed zaszczepieniem siewek grzybem oraz dwa tygodnie po zaszczepieniu grzybem siewki podlewano pożywką Ingestada pozbawioną związków fosforu (NaH₂PO₄ x 2H₂O, KH₂PO₄)].

Szczepienie siewek

Grzyby ektendomikoryzowe wyrosłe na skosach agarowych PDA, zmywano pożywką Ingestada z dodatkiem glukozy (2 g/l), pozbawioną związków fosforu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4). Bakterie ze skosów agarowych z pożywką Rennie zmywano taką samą pożywką Ingestada. Każdą siewkę zaszczipiano 2 ml zawiesiny grzybowej i 400 μl zawiesiny bakteryjnej.

Wykonano następujące warianty doświadczalne:

- kontrola: siewki nie zaszczipione,
- siewki zaszczipione grzybem ektendomikoryzowym,
- siewki zaszczipione grzybem ektendomikoryzowym i bakterią jednocześnie,
- siewki zaszczipione bakterią po 7 dniach od zaszczipienia grzybem.

Wymienione warianty prowadzono w podłożu hodowlanym sterylnym i niesterylnym dla trzech grzybów ektendomikoryzowych: *Wilcoxina* sp. (BG 30335 i Z 30362) oraz *Wilcoxina nikolae*, z bakteriami: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus polymyxa*. Dla każdego wariantu prowadzono hodowle w 10 powtórzeniach. Siewki hodowano przez okres 3 miesięcy od momentu zaszczipienia grzybem.

Parametry siewek

Po upływie czasu hodowli, obserwowano rozwój mikoryz na korzeniach i dokonano pomiaru długości oraz suchej masy pędów i korzeni siewek. Przed pomiarem wymienionych parametrów oceniano wizualnie podobieństwa i różnice w wyglądzie siewek w różnych wariantach doświadczalnych.

Analiza statystyczna wyników

Wyniki badań poddano analizie statystycznej stosując test Studenta, trójczynnikową analizę wariancji (ANOVA 3) oraz test wielokrotnego rozstępu Newmana-Keula.

Wyniki

Wyniki badań przedstawiono w tabelach 1-4 oraz na fotografii. Użyte do badań 3 szczepy grzybów ektendomikoryzowych w różny sposób wpływały na długość i suchą masę pędów i korzeni siewek sosny. Najczęściej jednak było to oddziaływanie hamujące. Szczep *Wilcoxina* sp. BG 30335K hamował wzrost korzeni i pędów siewek zarówno w podłożu hodowlanym sterylnym jak i niesterylnym (tab. 1). Drugi grzyb ektendomikoryzowy, *Wilcoxina* sp. Z 30362K, w podłożu hodowlanym sterylnym zmniejszał suchą masę korzeni i pędów nie wpływając na ich długość. W podłożu niesterylnym zanotowano stymulujący wpływ tego grzyba na długość pędów (tab. 1). Wzorcowy grzyb ektendomikoryzowy, *Wilcoxina nikolae*, nie oddziaływał na korzenie i pędy siewek w podłożu hodowlanym sterylnym, natomiast w podłożu niesterylnym hamował wzrost korzeni na długość i stymulował wydłużanie się pędów siewek (tab. 1).

TABELA I
Wpływ grzybów ektendomikoryzowych na pędy i korzenie siewek sosny (*Pinus sylvestris* L.)

	Podłoże sterylne				Podłoże niesterylne			
	KORZEN		PEŁ		KORZEN		KORZEN	
	Długość (cm)	Sucha masa (g)	Długość (cm)	Sucha masa (g)	Długość (cm)	Sucha masa (g)	Długość (cm)	Sucha masa (g)
Kontrola	5,7300±0,4183	0,0968±0,0136	7,8800±1,4381	0,0103±0,0037	5,5200±0,3641	0,0680±0,0084	12,3800±1,6541	0,0091±0,0068
<i>Wilcoxina</i> sp. BG 30335 K	4,0000± 0,7906 *H	0,0877±0,0449	5,6000± 0,9618 *H	0,0161±0,0132	4,2000± 0,7583 *H	0,0983±0,0349	6,9000± 1,1937 *H	0,0114±0,0080
<i>Wilcoxina</i> sp. Z 30362 K	5,0000±0,7906	0,0242± 0,0079 *H	9,1000±2,4083	0,0058± 0,0023 *H	6,8760± 1,0232 *S	0,0572±0,0223	11,8760±4,8265	0,0106±0,0020
<i>Wilcoxina mikolae</i> ATCC 52685	5,2400±0,4336	0,0851±0,0238	5,6200±1,9804	0,0175±0,0171	6,2000± 0,2739 *S	0,0690±0,0421	8,7000± 2,0494 *H	0,0058±0,0047

TABELA 2

Trójczynnikowa analiza wariancji porównująca wpływ: (1) podłoża hodowlanego, (2) czasu szczepienia bakterią i (3) różnych szczepów bakterii na długość (a) i suchą masę (b) korzeni siewek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) zaszczypanych grzybem ektendomikoryzowym *Wilcoxina* sp. BG30335K

Źródło zmienności	Długość pędów		Sucha masa pędów		Długość korzeni		Sucha masa korzeni					
	df	parametr F	poziom istotności	df	parametr F	poziom istotności	df	parametr F	poziom istotności			
(1) podłoże hodowlane	1	8,3307	0,00693*	1	15,5910	0,00041*	1	13,3449	0,00092*	1	3,4140	0,07391
(2) czas szczepienia bakterią	1	0,1417	0,70905	1	6,6206	0,01492*	1	0,2886	0,59484	1	3,2226	0,08208
(3) bakterie	1	0,1417	0,70905	1	0,6620	0,42185	1	0,1847	0,67024	1	2,2847	0,14047
1 x 2 interakcja	1	2,6614	0,11261	1	0,0073	0,93230	1	0,1544	0,29067	1	6,0758	0,01926*
1 x 3 interakcja	1	0,0157	0,90092	1	1,3982	0,24574	1	1,9509	0,17210	1	6,3375	0,01702*
2 x 3 interakcja	1	1,2756	0,26712	1	1,0939	0,30345	1	3,7403	0,06200	1	2,3728	0,13329
1 x 2 x 3 interakcja	1	1,2756	0,26712	1	1,1163	0,29864	1	1,9510	0,17210	1	4,8615	0,03477*
błąd	32	-	-	32	-	-	32	-	-	32	-	-

Test wielokrotnego rozstępu NEWMANA-Keula**		
1. Podłoże hodowlane	1. Podłoże hodowlane	1. Podłoże hodowlane
sterylne	4,8250 b	sterylne
niesterylne	4,2500 a	niesterylne
2. Czas szczepienia bakterią	2. Czas szczepienia bakterią	2. Czas szczepienia bakterią
jednocześnie	4,5750 a	jednocześnie
po tygodniu	4,5000 a	po tygodniu
3 Bakteria	3 Bakteria	3 Bakteria
<i>A. brasilense</i>	4,5000 a	<i>A. brasilense</i>
<i>B. polymyxa</i>	4,5750 a	<i>B. polymyxa</i>
1. Podłoże hodowlane	1. Podłoże hodowlane	1. Podłoże hodowlane
sterylne	0,1697 b	sterylne
niesterylne	0,0992 a	niesterylne
2. Czas szczepienia bakterią	2. Czas szczepienia bakterią	2. Czas szczepienia bakterią
jednocześnie	0,1574 b	jednocześnie
po tygodniu	0,1115 a	po tygodniu
3 Bakteria	3 Bakteria	3 Bakteria
<i>A. brasilense</i>	0,1417 a	<i>A. brasilense</i>
<i>B. polymyxa</i>	0,1272 a	<i>B. polymyxa</i>
1. Podłoże hodowlane	1. Podłoże hodowlane	1. Podłoże hodowlane
sterylne	7,4250 b	sterylne
niesterylne	5,7250 a	niesterylne
2. Czas szczepienia bakterią	2. Czas szczepienia bakterią	2. Czas szczepienia bakterią
jednocześnie	6,4500 a	jednocześnie
po tygodniu	6,7000 a	po tygodniu
3 Bakteria	3 Bakteria	3 Bakteria
<i>A. brasilense</i>	6,4750 a	<i>A. brasilense</i>
<i>B. polymyxa</i>	6,6750 a	<i>B. polymyxa</i>

Objaśnienia:

* – wpływ istotny; ** – wartości średnie oznaczone w danej kolumnie (dla poszczególnych wariantów) taką samą literą nie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

TABELA 3

Trójczynnikowa analiza wariancji porównująca wpływ: (1) podłoża hodowlanego, (2) czasu szczepienia bakterii i (3) różnych szczepów bakterii na długość (a) i suchą masę (b) korzeni siewek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) zaszczipionych grzybem ektendomikoryzowym *Wilcoxina* sp. Z 30362 K

Źródło zmienności	Długość pędów		Sucha masa pędów		Długość korzeni		Sucha masa korzeni	
	df	parametr F	df	parametr F	df	parametr F	df	parametr F
(1) podłoże hodowlane	1	3,4063	1	0,7166	1	2,0294	1	1,5922
(2) czas szczepienia	1	8,9147	1	2,3365	1	0,0021	1	2,5546
bakterią								
(3) bakterie	1	7,7630	1	0,9649	1	0,5906	1	0,2691
1 x 2 interakcja	1	0,0005	1	0,6075	1	0,9286	1	0,0826
1 x 3 interakcja	1	0,0041	1	0,1421	1	1,1332	1	0,7435
2 x 3 interakcja	1	3,1483	1	0,3001	1	0,5960	1	0,1950
1 x 2 x 3 interakcja	1	2,7096	1	0,0845	1	0,1166	1	0,7802
błąd	32	-	32	-	32	-	32	-

Test wielokrotnego rozstępu NEWMANA-Keula**

1. Podłoże hodowlane		1. Podłoże hodowlane		1. Podłoże hodowlane	
sterylne	7,6250 a	sterylne	0,0601 b	sterylne	19,6690 a
niesterylne	6,9775 a	niesterylne	0,0548 a	niesterylne	14,3700 a
2. Czas szczepienia bakterią		2. Czas szczepienia bakterią		2. Czas szczepienia bakterią	
jednocześnie	6,7775 a	jednocześnie	0,0526 b	jednocześnie	16,9375 a
po tygodniu	7,8250 a	po tygodniu	0,0622 a	po tygodniu	17,1065 a
3 Bakteria		3 Bakteria		3 Bakteria	
<i>A. brasilense</i>	6,8125 a	<i>A. brasilense</i>	0,0544 a	<i>A. brasilense</i>	18,4500 a
<i>B. polymyxa</i>	7,7900 b	<i>B. polymyxa</i>	0,0605 a	<i>B. polymyxa</i>	15,5940 a
				2. Czas szczepienia bakterią	
				jednocześnie	
				po tygodniu	
				3 Bakteria	
				<i>A. brasilense</i>	
				<i>B. polymyxa</i>	
				0,0106 a	
				0,0124 a	
				0,0104 a	
				0,0126 a	
				0,0111 a	
				0,0119 a	

Objaśnienia:

* – wpływ istotny; ** – wartości średnie oznaczone w danej kolumnie (dla poszczególnych wariantów) taką samą literą nie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$

TABELA 4

Trójczynnikowa analiza wariancji porównująca wpływ: (1) podłoża hodowlanego, (2) czasu szczepienia bakterią i (3) różnych szczepów bakterii na długość (a) i suchą masę (b) korzeni siewek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) zaszczepionych grzybem ekotendomikoryzowym *Wilcoxina mikolae*

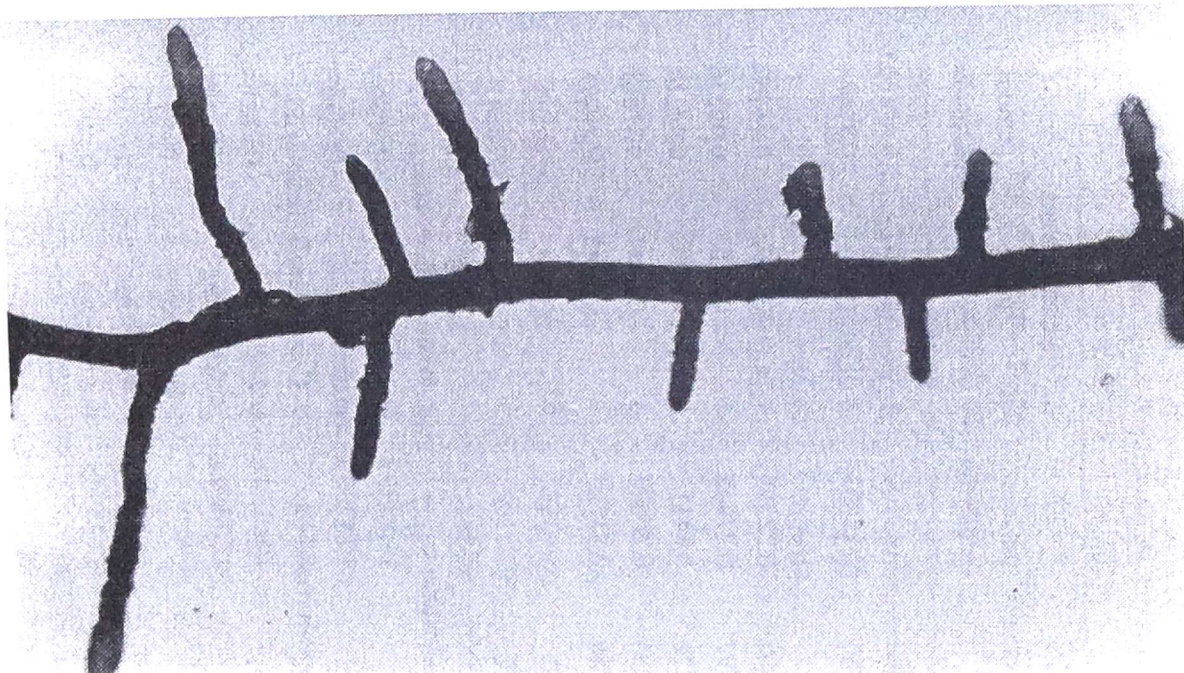
Źródło zmienności	Długość pędów		Sucha masa pędów		Długość korzeni		Sucha masa korzeni				
	df	parametr F	poziom istotności	df	parametr F	poziom istotności	df	parametr F	poziom istotności		
(1) podłoże hodowlane	1	1,4587	0,23599	1	3,4635	0,07195	1	0,6880	1	7,1667	0,01162*
(2) czas szczepienia bakterią	1	0,0065	0,93633	1	2,8171	0,10301	1	1,8786	1	0,4134	0,52484
(3) bakterie	1	0,4964	0,48620	1	1,4867	0,23164	1	1,5406	1	2,2592	0,14263
1 x 2 interakcja	1	0,0146	0,90462	1	0,1351	0,71562	1	0,0797	1	0,0153	0,90236
1 x 3 interakcja	1	0,4964	0,48620	1	0,1421	0,16484	1	3,6776	1	0,9298	0,34214
2 x 3 interakcja	1	1,4105	0,24372	1	0,3001	0,89288	1	1,7054	1	0,0547	0,81661
1 x 2 x 3 interakcja	1	0,1463	0,70465	1	0,0073	0,93230	1	0,3256	1	0,0648	0,80075
błąd	32	-	-	32	-	-	32	-	32	-	-

Test wielokrotnego rozstępu NEWMANA-Keula**

1. Podłoże hodowlane	1. Podłoże hodowlane		2. Czas szczepienia bakterią	
	sterylne	niesterylne	sterylne	niesterylne
1. Podłoże hodowlane	7,1500 a	6,550 a	11,8850 a	10,4750 a
2. Czas szczepienia bakterią	6,8300 a	6,8700 a	10,0150 a	12,3450 a
1. Podłoże hodowlane	0,1586 a	0,1177 a	10,1197 b	10,1566 a
2. Czas szczepienia bakterią	0,1197 b	0,1566 a	10,1248 a	10,1515 a
1. Podłoże hodowlane	0,1586 a	0,1177 a	10,1197 b	10,1566 a
2. Czas szczepienia bakterią	0,1197 b	0,1566 a	10,1248 a	10,1515 a
1. Podłoże hodowlane	0,1586 a	0,1177 a	10,1197 b	10,1566 a
2. Czas szczepienia bakterią	0,1197 b	0,1566 a	10,1248 a	10,1515 a

Objaśnienia:

* – wpływ istotny; ** – wartości średnie oznaczone w danej kolumnie (dla poszczególnych wariantów) taką samą literą nie różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$



FOT. Mikoryzy utworzone na korzeniach siewek sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.) po zaszczepieniu grzybem *W. mikolae* (podłoże sterylne)

Trójczynnikowa analiza wariancji (ANOVA 3) dla szczepu *Wilcoxina* sp. BG 30335K porównująca wpływ podłoża hodowlanego, czasu szczepienia bakterią oraz rodzaju bakterii na wzrost pędów i korzeni siewek wykazała, że w podłożu hodowlanym sterylnym siewki miały dłuższe pędy, większą suchą masę pędów oraz dłuższe korzenie niż w podłożu niesterylnym (tab. 2). Takiego oddziaływania nie zanotowano w przypadku dwóch pozostałych grzybów ektendomikoryzowych (tab. 3 i 4). Czas szczepienia siewek bakteriami w odniesieniu do czasu zaszczepienia tym grzybem (*Wilcoxina* sp. BG 30335K) był ważniejszym czynnikiem wpływającym na siewki (na suchą masę pędów) niż rodzaj bakterii (tab. 2). W przypadku *Wilcoxina* sp. Z 30362K na długość pędów siewek korzystnie wpływał *Bacillus polymyxa*, gdy był wprowadzany na korzenie roślin po tygodniu od ich zaszczepienia grzybem ektendomikoryzowym (tab. 3.). W doświadczeniach z grzybem *Wilcoxina mikolae* bakterie i czas ich wprowadzenia na korzenie siewek nie wpływał na rozwój pędów i korzeni siewek (tab. 4).

Dyskusja

Dominującym gatunkiem grzyba w szkółkach leśnych na całym świecie jest *Wilcoxina mikolae*, którego cechą jest wysoka efektywność w opanowaniu korzeni przy jednoczesnej słabej zdolności konkurencyjnej z tubylczymi grzybami ektendomikoryzowymi (17, 25). Opinie na temat różnic w symbiotycznej wydajności grzybów ekto- i ektendomikoryzowych są wśród badaczy rozbieżne. Niektórzy (12), uważają grzyby ektendomikoryzowe za mniej korzystne lub nawet szkodliwe dla gospodarza. Mikola (18) nie stwierdził istotnych różnic we wzroście siewek bez mikoryz i z ektendomikoryzą. Laiho (11) natomiast zanotował znaczący wpływ szczepienia grzybem ektendomikoryzowym na wzrost i kondycję siewek. Użyte w naszych doświadczeniach grzyby ektendomikoryzowe różnie od-

działywały na korzenie i pędy siewek. Szczep *Wilcoxina* sp. BG 30335K wpływał hamująco na długość korzeni i pędów zarówno w podłożu hodowlanym sterylnym jak i niesterylnym. Inny zbadany przez nas szczep, *Wilcoxina* sp. Z 30362K, wpływał hamująco na suchą masę korzeni i pędów. *Wilcoxina mikolae* nie oddziaływał na siewki w podłożu hodowlanym sterylnym, natomiast w podłożu niesterylnym hamował wzrost korzeni i stymulował wzrost pędów. Zahamowanie wzrostu lub biomasy roślin wskutek mikoryzowej infekcji notowali Nylund i Wallender (19), Dosskey i in. (5) oraz Colpaert i in. (1). Chanway i Holl (2) wykazali, że *W. mikolae* użyty do zaszczepienia siewek stymulował rozwój mikoryz, ale hamował biomasę pędów. Bakteria *Bacillus* sp. nie wpływała na biomasę siewek. Zaszczepienie siewek mieszaną hodowlą grzyba i bakterii dało natomiast efekt mikoryzowej infekcji podobny do zaszczepienia siewek samym grzybem. Większa była jednakże biomasę pędów. Biomasa korzeni i większość pędów nie zmieniła się wskutek zaszczepienia siewek tymi drobnoustrojami.

Bakteria *Azospirillum brasilense* nie wpływała na badane parametry siewek, natomiast *Bacillus polymyxa* stymulował długość pędów siewek tylko w obecności grzyba *Wilcoxina* sp. Z 30362K. Również Różycki i in. (21) zanotowali, że działanie bakterii (*Bacillus subtilis*, *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*) zależało od grzybowego symbionta. Nasze badania wykazały, że oddziaływanie badanych mikroorganizmów na siewki sosny zależało od podłoża, w którym rosły. W podłożu hodowlanym sterylnym oddziaływanie drobnoustrojów (grzybów i bakterii) niekiedy było korzystniejsze niż w podłożu niesterylnym.

Wcześniejsze badania nad siewkami ektomikoryzowymi (4) również wykazały, że oddziaływanie grzybów ektomikoryzowych i bakterii na siewki zależało od podłoża hodowlanego. W hodowlanym, sterylnym podłożu jednoczesne zaszczepienie grzybem ektomikoryzowym (*Hebeloma crustuliniforme*) i *Bacillus polymyxa* nie zmieniało biomasy korzeni w porównaniu z zaszczepieniem siewek samym grzybem. Kiedy bakteria była wprowadzona 7 dni po zaszczepieniu siewek grzybem ektomikoryzowym wzrosła natomiast biomasę pędów przy jednoczesnym braku wpływu na korzenie. W podłożu hodowlanym sterylnym obserwowano zjawisko odwrotne. W prezentowanych doświadczeniach, *Bacillus polymyxa* wprowadzany do gleby po tygodniu od zaszczepienia siewek grzybem ektomikoryzowym (*Wilcoxina* sp. Z 30362K) stymulował wzrost pędów. Badania te sugerują, że oddziaływanie pomiędzy grzybem a bakterią mogą wpływać na wzrost siewek mikoryzowych. Badań tych nie wykonywano w warunkach naturalnych, gdzie bez wątplenia różne zmienne czynniki środowiska mogą wpływać na wzajemne oddziaływanie roślina-grzyb ektomikoryzowy i bakteria.

Literatura

1. Colpaert J.V., Van Assche J.A., Luijstens K.: The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris* L. *New Phytol.* 1992, 120: 127-135
2. Chanway C.P., Holl F.B.: Biomass increase and associative nitrogen fixation of mycorrhizal *Pinus contorta* seedlings inoculated with a plant growth promoting *Bacillus* strain. *Can. J. Bot.* 1991, 69: 507-511

3. **Crawford R.H., Li C.Y., Floyd M.:** Nitrogen fixation in root-colonized large woody residue of Oregon coastal forests. *For. Ecol. Manage* 1997, 92: 229-234
4. **Dahm H., Strzelczyk E., Ciesielska A., Redlak K.:** The effect of ectomycorrhizal fungi and bacteria on pine seedlings. *Acta Mycologica* 1998, 33 (1): 25-36
5. **Dosskey M.G., Linderman R.G., Boersma L.:** Carbon-sink stimulation of photosynthesis in Douglas fir seedlings by some ectomycorrhizas. *New Phytol.* 1990, 115: 269-274
6. **Garbaye J.:** Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 1994, 128: 197-210
7. **Grayston S. J., Vaughan D., Jones D.:** Rhizosphere carbon flow in trees in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* 1997, 5: 29-56
8. **Griffiths R.P., Hartman M.E., Caldwell B.A., Carpenter S.E.:** Acetylene reduction in conifer lags during early stages of decomposition. *Plant Soil* 1993, 148: 53-61
9. **Ingestad T., 1960:** Studies on the nutrition of forest trees. III. Mineral nutrition of pine. *Physiol. Plantarum* 1960, 13: 513-533
10. **Lacanze B.:** Localisation cytochimique des activités phosphatases des champignons mycorrhiziens développés sur milieu complet à carence en phosphate. *Ca. J. Bot.* 1993, 61: 1411-1414
11. **Laiho O.:** Further studies on ectendotrophic mycorrhiza. *Acta Forest. Fennica* 1965, 79:1-35
12. **Levishon J., 1963:** Über Mykorrhizen and Pseudomykorrhizen. W: Mykorrhiza, Intern. Mykorrhiza-symposium, 1963, Weimar 1960
13. **Li C.Y., Castellano M.A.:** Nitrogen fixing bacteria isolated from within sporocarps of three ectomycorrhizal fungi. W: R. Molina (red.) *Proceedings 6th North American Conference on Mycorrhiza*, s. 264, Oregon State University, Forestry Research Laboratory. Corvallis, 1985
14. **Li C.Y., Castellano M.A.:** Azospirillum isolated from sporocarps of the mycorrhizal fungi *Hebeloma crustuliniforme* and *Rhizopogon vinicolor*. *Trans. Br. Soc.* 88 (4): 563-565, 1987
15. **Li C. Y., Hung L.L.:** Nitrogen fixing (acetylene-reducing) bacteria associated with ectomycorrhizae. *Plant and Soil* 1987, 98: 425-428
16. **Li C.Y., Massicotte H.B., Moore L.V.H.:** Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. *Plant and Soil* 1992, 140: 35-40
17. **Mikola P.:** Studies on the ectendotrophic mycorrhiza of pine. *Acta Forest. Fenn.* 1965, 79 (2): 1-56
18. **Mikola P., Laiho O., Erikäinen J., Kuvaja K.:** The effect of slash burning on the commencement of mycorrhizal association. *Acta Forest. Fenn.* 1964, 77: 1-3

19. **Nylund J.E., Wallender H.:** Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in semi-hydroponic cultivation system. *New Phytol.* 1989, 112: 389-398
20. **Renni E. M.:** A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria in soils. *Can. J. Microbiol.* 1981, 27 (1): 8-14
21. **Różycki H., Kampert M., Strzelczyk E., Li C.Y., Perry D.A.:** Effect of different soil bacteria on mycorrhizae formation in scots pine (*Pinus sylvestris* L.) – in vitro studies. *Fol. Forest. Polon.* 1994, 36: 91-102
22. **Strzelczyk E., Kampert m., Li C.Y.:** Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media in different carbon sources. *Microbiol. Res.* 1994, 149: 55-60
23. **Tilak K.V.B.R., Li C.Y., Trappe J.M.:** Characterization of nitrogen-fixing *Azospirillum* isolated from within sporocarps of ectomycorrhizal fungi with Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Franco J.). *Indian J. Microbiol.* 1988, 28 (4): 315-319
24. **Werner A., Idzikowska K., Napierała-Filipiak A.:** Mikoryza ektendotroficzna sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.). *Sylwan* 2000, CXLIV 4: 53-67
25. **Wilcox H.E., Wang C.J.K.:** Mycorrhizal and pathological associations of dematiaceous fungi in roots of 7-month-old tree seedlings. *Can. J. For. Res.* 1987, 17: 884-899

*Zakład Mikrobiologii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu*

Summary

The effect of ectendomycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on pine seedlings (*Pinus sylvestris* L.) – in vitro studies

The fungi used in our studies in different manner affected the length and dry mass of shoots and roots. Most often was however the effect inhibitory. *Bacillus polymyxa* stimulated the length of the shoots of the seedlings after the previously inoculation with *Wilcoxina* sp. Z 30362K. *Azospirillum brasilense* did not affect the seedlings. The sterile medium was more profitable than the nonsterile one for the seedlings inoculated with *Wilcoxina* sp. BG 30335K. In the case of another ectendomycorrhizal fungus *Wilcoxina* sp. Z 30362K the sterility of the medium had no meaning on the influence of the effect of the fungus and bacteria on the pine seedlings.