

AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH
W BYDGOSZCZY

Zeszyty Naukowe 108

ROLNICTWO 16



WR-F

BYDGOSZCZ - 1983

**AKADEMIA TECHNICZNO-ROLNICZA
IM. JANA I JĘDRZEJA ŚNIADECKICH
W BYDGOSZCZY**

Zeszyty Naukowe 108

ROLNICTWO 16



BYDGOSZCZ - 1983

PRZEWODNICZĄCY KOMITETU REDAKCYJNEGO
doc. dr hab. Juliusz Skonieczny

REDAKTOR NAUKOWY
doc. dr hab. Ojcumiła Stefaniak

OPRACOWANIE REDAKCYJNE I TECHNICZNE
mgr Halina Koziołkiewicz, Alfons Grzenkiewicz

Wydano za zgodą Rektora
Akademii Techniczno-Rolniczej
w Bydgoszczy

ISSN 0208-6344

**WYDAWNICTWO UCZELNIANE AKADEMII TECHNICZNO-ROLNICZEJ
W BYDGOSZCZY**

Wyd. I Nakład 100+50. Ark. wyd. 6.2. Ark. druk. 6.3. Papier kl. V.
Zamówienie nr 375/83. Oddano do druku w sierpniu. Druk ukończono we wrześniu 1983 r.
Cena 76 zł MNSzWiT K-6/171
Uczelniany Zakład Małej Poligrafii w Bydgoszczy

91 D 12/14

SPIS TREŚCI

1. Janina Rogońska, Stanisław Flasiński - Wpływ stresu osmotycznego na akumulację proliny u rzepaku	5
2. Janina Rogońska, Maria Gośka - Indukcja organogenezy w korzeniach, hypochotylach i liścieniach buraka cukrowego w kulturach in vitro	11
3. Stanisław Flasiński, Wojciech Dębowski, Ewa Kaźmierczak-Wstępne badania aktywności niektórych enzymów w kiełkach linii płodnych, typu 0 i męskosterylnych buraka cukrowego	19
4. Ryszard Zamorski, Alfons G.J.Voragen - Enzymatyczna hydroliza substratów celulozowych	27
5. Bronisława Sas - Piotrowska - Porównawcze badania nad patogenicznością izolatów <i>Fusarium sulphureum</i> /Schlecht/ w stosunku do bulw ziemniaka	37
6. Mariusz Piątek, Róża Sypniewska - Wpływ nawożenia mineralnego żelazistych łąk nadnoteckich na zdrowotność kupkówki pospolitej / <i>Dactylis glomerata</i> L./ tymotki łąkowej / <i>Phleum pratense</i> L./ i wiechliny łąkowej / <i>Poa pratensis</i> L./	49
7. Bronisława Sas-Piotrowska, Elwira Sliwińska - Metodyczne aspekty laboratoryjnej oceny reakcji bulw ziemniaka na <i>Phoma solanicola f.foveata</i> I.Wpływ podłoża na wzrost i patogeniczność grzyba <i>Phoma solanicola f.foveata</i>	59
8. Bronisława Sas-Piotrowska, Halina Łachowska, Wojciech Piotrowski - Metodyczne aspekty laboratoryjnej oceny reakcji bulw ziemniaka na <i>Phoma solanicola f.foveata</i> II.Wpływ głębokości zakażenia na porażenie bulw	73
9. Wojciech Piotrowski, Halina Łachowska, Bronisława Sas-Piotrowska - Metodyczne aspekty laboratoryjnej oceny reakcji bulw ziemniaka na <i>Phoma solanicola f.foveata</i> III.Kształtowanie się porażenia bulw w różnych terminach jego oceny	79



Janina Rogozińska
Stanisław Flasiński

WPLYW STRESU OSMOTYCZNEGO NA AKUMULACJĘ PROLINY U RZEPAKU

Wykazano reakcję rzepaku będącego w fazie kwitnienia na stres osmotyczny, analizując akumulację proliny i zawartość białka. Stwierdzono, że akumulacja proliny wywołana stresem jest najwyższa w liściach i kwiatostanach. Towarzyszy temu obniżenie poziomu białek rozpuszczalnych.

1. WSTĘP

W liściach wielu gatunków roślin poddanych stresowi osmotycznemu zwiększa się poziom proliny, co związane jest z obniżeniem potencjału wody /8,11,12/. Akumulacja ta jest spowodowana hydrolizą białek, choć stwierdzono pewną syntezę proliny *de novo*, zależną od światła, temperatury i dostępności węglowodanów /4/. Sugerowano, że akumulowana prolina może być utleniana i służyć za źródło energii lub też może być włączana do białek /10/.

Istnieje pogląd, że akumulacja wolnej proliny jest adaptacją metaboliczną i stanowi cechą odporności na suszę /8/. Prace Hansona i in. /6/ wskazują jednak na brak pozytywnej korelacji między akumulacją proliny a odpornością na suszę i sugerują, że szybka akumulacja proliny jest raczej reakcją składową, a nie cechą adaptacyjną /12/. Innym wskaźnikiem odporności roślin na suszę jest zawartość białka. Wykazano bowiem, że rośliny odporne mają wyższą zawartość białka niż mniej odporne /2/.

Wystąpienie suszy w okresie kwitnienia rzepaku może powodować znaczne obniżenie plonu, sięgające niekiedy 20% /5/. Niniejsze badania przeprowadzono celem wykrycia wczesnych reakcji rzepaku na stres osmotyczny, który jest jedną z form suszy, przez określenie tempa akumulacji proliny i zawartości białka.

2. MATERIAŁ I METODA BADAŃ

Rzepak ozimy /*Brassica napus* L. var. *oleifera* cv. *Skrzeszowicki*/ będący w stadium 4-5 liści, przewieziono z pola /11.4.1982/ i umieszczono w wazonach hodowlanych w rozcieńczonej do połowy pożywce Hoaglanda /Czerwiński, 1980/. Rośliny rosły w hali vegetacyjnej i w fazie kwitnienia /17.5.1982/ zastosowano stres osmotyczny, który wywołano roztworami glikolu po -

lietylenowego i chlorku sodu, o zbliżonych potencjałach osmotycznych. Do 900 ml pożywki jednej serii dodano w dwu kolejnych dniach po 100 ml 40% glikolu polietylenowego /PEG/-6000, co odpowiada 19 barom /6/, a do drugiej serii dodano jednorazowo 100 ml 2N NaCl. Po 1, 2, 4, 6 i 8 dniach wzrostu w warunkach stresowych, wykonano analizy zawartości proliny i białek rozpuszczalnych w liściach 4-tej pary, odcinkach łodyg pomiędzy tymi liśćmi oraz w kwiatach ze środkowej części kwiatostanów i w korzeniach.

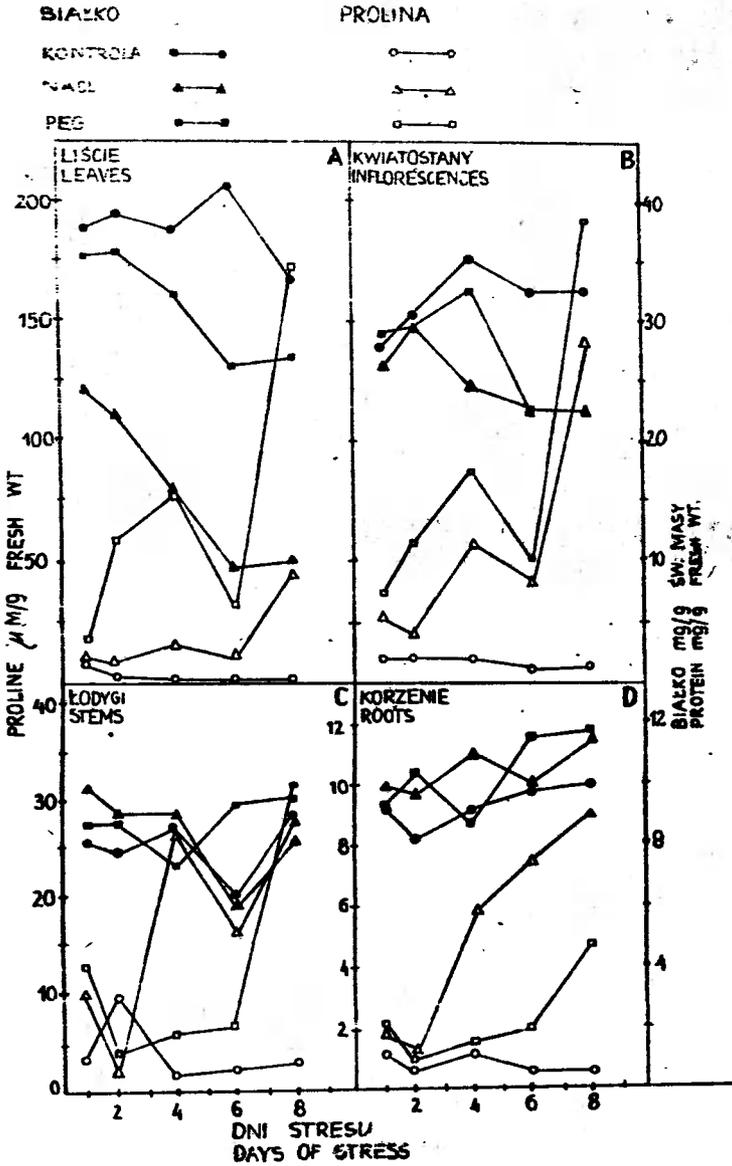
Prolinę oznaczono metodą Batesa i in. /1/ wykorzystując tworzenie charakterystycznego kompleksu aminokwasu z ninhydriną w środowisku kwaśnym. Po homogenizacji świeżej masy w 3% kwasie sulfosalicylowym i odwirowaniu przy 15000 g, przeprowadzono reakcję ninhydrinową, a powstały barwny kompleks ekstrahowano toluenem i mierzono absorpcję przy 520nm. Całkowite białko rozpuszczalne ekstrahowano w oparciu o metodę Botha i Botha /2/. Świeżą masę homogenizowano w 50 mM buforze Tris-HCl o pH 7,5 zawierającym 1 mM EDTA. Po odwirowaniu homogenatu przy 20000 g oznaczano w su-pernatancie białko całkowite metodą Lowry'ego i in. /9/, wobec wołowej albuminy surowiczej jako wzorca.

3. WYNIKI BADAŃ Z DYSKUSJĄ

Z przeprowadzonych badań wynika, że rzepak będący w fazie kwitnienia silnie reaguje na obniżenie potencjału wodnego pożywki, wywołanego przez dodanie roztworu PEG'u lub NaCl. Widoczne symptomy wystąpiły u większości roślin po 4 dniach i pogłębiały się w miarę przedłużania stresu. W przypadku gdy stres wywoływano PEG'iem, występowała charakterystyczna brzegowa chloroza liści, a w przypadku stresu wywołanego NaCl, chloroza obejmowała całe liście. Proces ten postępował wraz z przedłużaniem stresu. Zastosowanie obu czynników stresowych wpłynęło na opóźnienie rozwoju kwiatostanów, przy czym w przypadku zastosowania PEG'u nastąpiło charakterystyczne zasychanie ich wierzchołków.

Roślina reaguje jednak znacznie wcześniej na warunki stresowe, ponieważ deficyt wody zmienia całą gospodarkę azotową roślin przez wpływ zarówno na transport azotu, jak i jego przyswajalność /2,3,12/. Symptomom wizualnym poszczególnych organów rzepaku towarzyszyły zmiany metabolizmu, objawiające się zarówno akumulacją proliny, jak i obniżeniem poziomu białek.

Rycina 1A i B wykazuje, że akumulacja proliny w liściach i kwiatostanach następowała wraz z przedłużeniem stresu. Obniżenie poziomu proliny miało miejsce jedynie w 6 dniu, co spowodowane było zmianami atmosferycznymi - podwyższeniem wilgotności względnej i obniżeniem temperatury. Po ich ustąpieniu nastąpił jednak ponowny wzrost akumulacji proliny. Stwierdzono pewne różnice w ilości nagromadzonej proliny w zależności od czynnika wywołującego stres. Po 8 dniach stresu, akumulacja proliny w liściach była około 3 razy wyższa w przypadku stresu wywołanego



rys. 1. Wpływ stresu osmotycznego wywołanego chlorkiem sodu /NaCl/ i glikolem polietylenowym /PEG/ na zawartość proliny i białek rozpuszczalnych u rzepaku

ig. 1. The effect of osmotic stress caused by sodium chloride /NaCl/ and polyethylene glycol /PEG/ on proline and soluble protein content in oilseed rape

PEG'iem, niż w przypadku zastosowania NaCl. Analogiczne zależności wystąpiły w kwiatostanach. Ilość nagromadzonej proliny przy zastosowaniu PEG'u była w nich jednak tylko o 1/3 wyższa niż przy NaCl.

Duża ilość akumulowanej proliny w liściach rzepaku może być wynikiem szybkiej syntezy lub wolnej translokacji. Stwierdzono bowiem mniejszą zawartość proliny w łydżach i korzeniach. Stres wywołany NaCl powodował w nich większe nagromadzenie proliny, niż stres wywołany PEG'iem. Pewien wyjątek stwierdzono tylko w 8 dniu stresu, w którym ilości proliny w łydżach były podobne przy obu stosowanych czynnikach stresowych. Podobne reakcje na stres osmotyczny wykazano u innych roślin, rosnących w różnych warunkach środowiska /7/. Również Carceller i Frischmana /4/ wykazały, że susza i inne czynniki stresowe zmieniają specyficznie poziom proliny.

Inną reakcją roślin na stres wodny jest rozkład białek i zahamowanie ich syntezy, co stwierdzono w tkankach wielu gatunków roślin /2,3/. Akumulacji proliny w liściach i kwiatostanach rzepaku towarzyszyło obniżenie poziomu całkowitych białek rozpuszczalnych /rys. 1A, B/. Zmniejszenie zawartości białek nastąpiło w liściach po 2 dniach stresu, natomiast w kwiatostanach po 4 dniach. W liściach było ono większe w przypadku zastosowania NaCl niż PEG'u. Rozkład białek jest normalnym zjawiskiem w starzejących się liściach, a produkty rozkładu białek przemieszczają się do tworzących się organów generatywnych. Proces ten został przyspieszony u rzepaku na skutek zastosowania czynników stresowych. Oba czynniki stresowe powodowały podobne obniżenie poziomu białek w kwiatostanach. Znacznie niższy poziom białek rozpuszczalnych stwierdzono w łydżach i korzeniach /rys. 1C, D/, co jest związane z mniejszą aktywnością metaboliczną tych organów w okresie kwitnienia. Nieznaczne wahania w zawartości białka w kolejnych dniach pod wpływem zastosowanych czynników stresowych wydają się nieistotne.

Większość badań nad wpływem stresu wodnego na akumulację proliny przeprowadzona była na roślinach zbożowych i motylkowych /6,11,12/. W niniejszej pracy wykazano, że rzepak należący do roślin krzyżowych reaguje podobnie. Określono tempo akumulacji proliny w poszczególnych organach rzepaku, wykazując pewną specyficzność działania obu czynników stresowych. Liście rzepaku, podobnie jak liście innych roślin, są miejscem bardzo intensywnej akumulacji proliny. Duże ilości proliny gromadziły również kwiatostany, do których intensywnie dopływają z rośliny macierzystej związki fizjologiczne czynne i metabolity podstawowe. Zmieniony metabolizm azotowy rzepaku pod wpływem działania stresu objawiał się ponadto obniżeniem poziomu białek rozpuszczalnych, zwłaszcza w liściach i kwiatostanach.

LITERATURA

1. Bates L.S., Walderen R.P., Teare I.D., 1973: Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and Soil*, 39, 205-207

2. Botha F.C., Botha P.J., 1980: The effect of water stress on the nitrogen metabolism of two maize lines, 1.Effects on the protein content and RNase activity. *Jl.S.Afr.Bot.*1,45-52
3. Cooke R.J., Oliver J., Davies D.D., 1979: Stress and protein turnover in Lemna minor, *Plant Physiol.*, 64, 1109-1113
4. Carceller M., Frascina A., 1980: The free proline content of water stressed maize roots, *Z.Pflanzenphysiol.*, 100, 43-49
5. Deabiński F., 1975: *Rośliny oleiste*, PWRL, Warszawa, 64-72
6. Hanson A.D., Nelsen C.E., Everson E.H., 1977: Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars, *Crop Sci.*, 17, 720-726
7. Jefferies R.L., Rudmik T., Dillon E.M., 1979: Responses of halophytes to high salinities and low water potentials, *Plant Physiol.*, 64, 989-994
8. Levitt J., 1972: *Responses of plants to environmental stress*, Academic Press, New York, 697s
9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951: Protein measurement with the folin phenol reagent, *J.Biol.Chem.*, 193, 265-275
10. Oaks A., Mitchell D.J., Barnard R.A., Johnson P.C., 1970: The regulation of proline biosynthesis in maize roots., *Can. J.Bot.*, 48, 2249-2258
11. Routley D.G., 1966: Proline accumulation in wilted ladino clover leaves *Crop Sci.*, 6, 358-361
12. Tully R.E., Hanson A.D., Nelsen C.E., 1979: Proline accumulation in water-stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen budget, *Plant Physiol.*, 63, 518-523

EFFECT OF OSMOTIC STRESS ON PROLINE ACCUMULATION IN OILSEED RAPE

Summary

The effect osmotic stress on proline accumulation and protein content in oilseed rape at the stage of flowering was studied. It was found out that proline accumulation due to the stress was very high in the leaves and inflorescences. This was accompanied by a lower level of soluble protein content.

ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО СТЕССА НА НАКОПЛЕНИЕ ПРОЛИНА У РАПСА

Резюме

Исследована реакция цветущего рапса на осмотический стресс, анализируя накопление пролина и содержание белка. Установлено, что накопление пролина, вызванное стрессом, достигает самого высокого уровня в листьях и соцветиях. Это сопровождается понижением уровня растворимых белков.

Janina Rogozińska
Stanisław Flasiński
Zakład Fizjologii Roślin
Instytut Rolniczy ATR
ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz



Janina Rogozińska
Maria Goška

INDUKCJA ORGANOGENEZY W KORZENIACH, HYPOKOTYLACH I LIŚCIENIACH BURAKA CUKROWEGO W KULTURACH IN VITRO

Porównano zdolności organogenetyczne wyszczepionych fragmentów korzeni, hypokotyli i liścieni buraka cukrowego w kulturach in vitro. W zależności od kombinacji regulatorów wzrostu, eksplantaty tworzyły kalus i/lub korzenie. Na liścieniach ponadto rozwinęły się pączki wegetatywne, z których uzyskano normalne rośliny. Otrzymane wyniki mogą być wykorzystane w wegetatywnym mnożeniu buraka cukrowego, gdyż dają lepsze efekty niż stosowane dotychczas metody sadzonkowania buraka.

1. WSTĘP

Zdolność regeneracyjna roślin zależy od gatunku, organu i podłoża. Jak wynika z nielicznych doniesień dotyczących buraka cukrowego, uzyska - no tworzenie kalusa i korzeni na hypokotylach, korzeniach, liścieniach i liściach oraz różnicowanie pączków z pędów kwiatostanowych, wyizolowanych pylników i zalążków /1,2,3,4,5,7,8,10/. Stosując liście jako eksplan - taty Rogozińska i Goška /8/ uzyskały nie tylko inicjację pączków, ale - po przeniesieniu roślin do ziemi - dalszy ich rozwój. Różnicowanie liści w pączki uzyskali również de Greef i Jacobs /2/, jednak wyników tych nie udało im się powtórzyć.

Określenie zdolności regeneracyjnej poszczególnych fragmentów sie - wtek buraka cukrowego, ma na celu zastosowanie uzyskanych wyników w wege - tatywnym mnożeniu. W cytowanych pracach stosowano rozmaite pożywki, użu - pełniane różnymi składnikami, różne odmiany buraka, brak w nich jednak danych liczbowych odnośnie efektywności metod.

2. MATERIAŁ I METODA BADAŃ

Materiał doświadczalny stanowiły kłębki wielonasiennych buraków cukrowych /Beta vulgaris L. prov. altissima Döll./; diploidalnej odmiany AJ-3. Wyizolowane z kłębków nasiona sterylizowano przez 5 min. wodą chlo - rowaną, a następnie płukano kilkakrotnie sterylną wodą. Umieszczano je w próbkach zawierających 0,9% wodny roztwór garu. Po 14 dniach odcinano z wyrosłych siewek 5 mm odcinki korzeni hypokotyli i liścieni, następnie

przenoszono je na pożywkę Murasiege i Skooga /1962/ zawierającą 3% sacharozy, 0,9% agaru, 100 mg/l inozytoli i 0,4 mg/l tiaminy. Pożywkę uzupełniano substancjami wzrostowymi, kwasem naftylo-1-octowym /NAA/ lub 6-benzylamino-puryną /BAP/, o stężeniu 0,2, 1,5 i 25 μM oraz ich kombinacjami. Każda z 25 kombinacji doświadczalnych obejmowała 12 eksplantatów.

Kultury umieszczano w temperaturze 25°C w 16 godz. fotoperiodzie.

Źródło światła stanowiło światło fluorescencyjne o natężeniu ok. 1500 luk-sów. Obserwacje nad wyszczepionymi eksplantatami przeprowadzano co 7 dni, w 8-tygodniowym okresie ich wzrostu.

3. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA.

Zdolność regeneracyjna eksplantatów wyraźnie zależała od miejsca pobrania z siewki i od poszczególnych regulatorów wzrostu lub ich kombinacji w pożywce.

a/ Wpływ substancji wzrostowych na regenerację z korzeni

Wyzolowane odcinki buraka cukrowego hodowane były na 25 wariantach substancji wzrostowych, dodawanych do pożywki. Na odcinkach korzeni hodowanych na 10 kombinacjach substancji wzrostowych tworzył się kalus i korzenie boczne, a na 13 kombinacjach tylko korzenie. Początek ryzogenezy zaobserwowano już po 14 dniach wzrostu eksplantatów, natomiast tworzenie kalusa zachodziło później, po 21 dniach. Wysokie stężenia cytokiny hamowały rozwój korzeni. Inicjacji korzeni nie zaobserwowano, gdy pożywką zawierała 25 μM BAP lub kombinację 25 μM BAP z 0,2 μM NAA. Najlepszą pożywką dla tworzenia korzeni okazała się kombinacja z 5 μM NAA + 0,2 μM BAP, na której wszystkie eksplantaty tworzyły korzenie. Najwyższy procent korzeni tworzących kalus /63/ uzyskano na pożywce zawierającej 1 μM NAA + 1,5 lub 25 μM BAP. W kulturach korzeni wyszczepionych na pożywkę z podanymi 25 kombinacjami substancji wzrostowych nie uzyskano tworzenia pączków.

b/ Wpływ substancji wzrostowych na regenerację z hypokotyli

Badając zdolność wyizolowanych hypokotyli do różnicowania, obserwowano również tworzenie kalusa i korzeni. Na 16 z przebadanych 25 kombinacji substancji wzrostowych, tworzyły się korzenie, a na 14 kalus. Tworzenie korzeni zaobserwowano już po 7 dniach hodowli w przypadku gdy pożywka zawierała 0,2 μM BAP + 0,2 μM NAA. Natomiast gdy stosowano 5 μM BAP, tworzenie korzeni następowało dopiero po 28 dniach. Stężenie 25 μM było hamujące dla ich inicjacji. Wysokie stężenia auksyny stymulowały rozwój korzeni. Pożywka z 25 μM NAA okazała się najlepsza dla ryzogenezy. Powstawanie kalusa obserwowano na ogół po 14 dniach od wyszczepienia hypokotyli. Najobfitsze tworzenie kalusa /83% uzyskano na kombinacjach z 5 μM NAA + 5 μM BAP. Analogicznie, jak w przypadku kultur odcinków korzeni, również nie uzyskano tworzenia pączków na hypokotylach.

c. Wpływ substancji wzrostowych na regenerację z liścieni

Zróżnicowana zdolność regeneracyjna eksplantatów była najbardziej widoczna w liścieniach. W początkowym okresie inkubacji na pożywkach z poszczególnymi substancjami wzrostowymi i ich kombinacjach, liścienie znacznie zwiększały swą wielkość, po czym tworzyły kalus /po ok. 14 dniach/. Liścienie wykazały największą zdolność do tworzenia kalusa /na 23 kombinacjach z 25/, ale małą do tworzenia korzeni /na 6 kombinacjach/. W odróżnieniu od eksplantatów korzeni i hypocotyli, tworzyły się na nich pączki wegetatywne /Tab.1, Ryc.1/. Uzyskano je po 8 tygodniach hodowli liścieni, na pożywce zawierającej 5 μM BAP /Ryc.2A/.

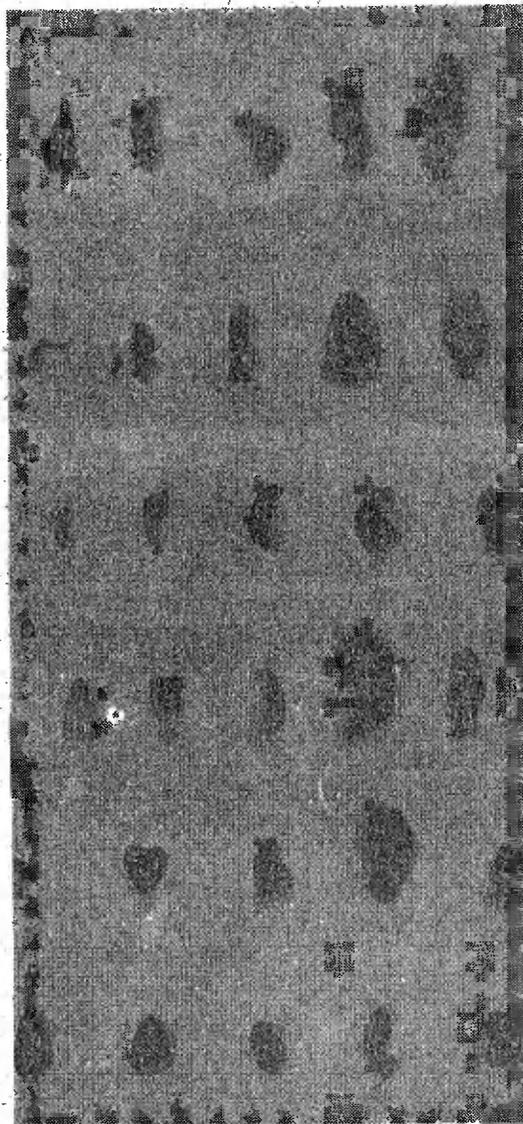
Tabela 1

Table 1

Wpływ substancji wzrostowych na regenerację z liścieni buraka cukrowego
The influence of growth substances on regeneration of sugar beet cotyledons

Substancje wzrostowe μM Growth substances μM		% liścieni tworzących kalus i organy % of cotyledons forming callus and organs		
NAA	BAP	kalus callus	korzenie roots	pączki buds
0	0	0	0	0
0,2	0	0	0	0
1	0	50	32	0
5	0	16	8	0
25	0	24	16	0
0	0,2	24	0	0
0	1	48	24	0
0	5	80	0	32
0	25	56	0	0
0,2	0,2	50	0	0
0,2	1	80	0	0
0,2	5	40	0	0
0,2	25	24	0	0
1	0,2	24	8	0
1	1	32	0	0
1	5	88	0	0
1	25	24	0	0
5	0,2	16	0	0
5	1	32	0	0
5	5	88	0	0

5	25	48	0	0
25	0,2	16	0	0
25	1	32	0	0
25	5	83	16	0
25	25	52	0	0



Rys.1. Wzrost i regeneracja liścieni buraka cukrowego pod wpływem substancji wzrostowych /NAA - kwas naftylo-1-octowy, BAP - 6 - benzyloami - onopuryna/ A: NAA 0 -25 μ M, B: BAP 0 - 25 μ M, C: 0,2 μ M NAA+ 0-25 μ M BAP, D: 1 μ M NAA + 0 -25 μ M BAP, E: 5 μ M NAA + 0 - 25 μ M BAP, F: 25 μ M NAA + 0 - 25 μ M BAP

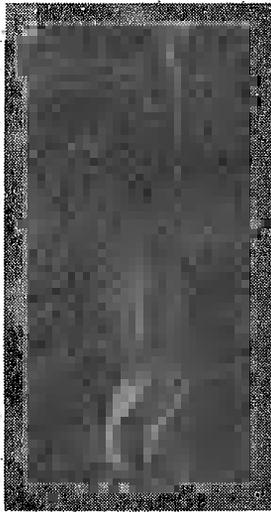
Fig.1. Groth and regeneration of sugar beet cotyledons induced by growth regulators NAA - naphthalene - 1 - acetic acid, BAP - 6 benzylaminopurine/ A: NAA 0 - 25 μ M, B: BAP 0 - 25 μ M, C: 0,2 μ M, NAA + 0 - 25 μ M BAP, D: 1 μ M NAA + 0 - 25 μ M BAP, F: 25 μ M NAA + 0 - 25 μ M BAP

0 0.2 1 5 25 μ M



Rys.2A. Pączki wytworzone na liściach rosnących na pożywce z $5 \mu\text{M}$ BAP
 Fig.2A. Buds formed on cotyledons grown on medium with $5 \mu\text{M}$ BAP

Wyróżnicowane pączki przeszczepiono na świeżą pożywkę z $5 \mu\text{M}$ NAA + $1 \mu\text{M}$ BAP, gdzie zachodził ich dalszy rozwój /Ryc. 2B/. Uzyskane rośliny



Rys.2B. Rośliny po pierwszym pasażu pączków na pożywce z $5 \mu\text{M}$ NAA + $1 \mu\text{M}$ BAP
 Fig.2B. Plantlets from subcultured buds on medium with $5 \mu\text{M}$ NAA + $1 \mu\text{M}$ BAP

przesądzono następnie do ziemi. Nie różniły się one od roślin uzyskiwanych drogą konwencjonalną z nasion.

Jak wynika z przeprowadzonych badań, eksplantaty korzeni hypokotyli i liścieni buraka cukrowego, posiadają zróżnicowaną zdolność od organogenezy. Tworzenie pączków wegetatywnych uzyskano tylko na liścieniach. W innych pracach uzyskano tworzenie pączków również na hypokotylach i to zarówno u buraków cukrowych jak i pastewnych /4,9/. Zastosowanie różnych wariantów stężeń NAA i BAP, umożliwiło znalezienie odpowiedniej równowagi regulatorów wzrostu dla uzyskania pożądanych efektów morfogenetycznych w wyszczepionych eksplantatach. BAP ma istotną rolę w określeniu rozwoju wyizolowanej 'kanki i do indukcji pączków z liścieni buraka cukrowego, podobnie jak z innych organów, niezbędna jest cytokinina. Procent liścieni tworzących pączki wynosił 32.

W badaniach genetycznych i hodowlanych często jest pożądane posiadanie większej liczby egzemplarzy roślin wartościowego genotypu, który może być zachowany przez kilka lat. Mnożenie wegetatywne przez sadzonkowanie liści i korzeni zapasowych buraka bezpośrednio do ziemi jest mało efektywne, gdyż uzyskuje się stosunkowo mało materiału /6/. Stąd konieczne są poszukiwania nowych metod. Dotychczasowe wyniki uzyskane w mnożeniu wegetatywnym różnych gatunków roślin metodą kultur in vitro są bardzo zachęcające, gdyż pozytywne wyniki uzyskano u wielu gatunków roślin. W odniesieniu do buraka cukrowego zagadnienie to nie zostało dotychczas dostatecznie opracowane. Przebadana zdolność organogenetyczna eksplantatów siewek buraka cukrowego w kulturach in vitro może stanowić podstawę do wykorzystania w praktyce hodowlanej.

W części doświadczalnej badań uczestniczył Stanisław Borys w ramach wykonywanej pracy magisterskiej.

LITERATURA

1. Atanassov A., Kikindonov T., 1971: Preparation of in-vitro tissue cultures from divers organs of *Beta vulgaris* L.C.R.Acad.Sci.Agric.Bulg.4, s. 75-83
2. De Greef W., Jacobs M., 1979: In vitro culture of the sugarbeet: description of a cell line with high regeneration capacity.Plant Sci.Lett. 17, s. 55-61
3. Gośka M., 1981: Badania nad uzyskaniem roślin haploidiśalnych buraka w kulturze in vitro, Praca doktorska, ATR, Bydgoszcz
4. Eocker M.P., Nabors M.W., 1977: Callus initiation, growth and organogenesis in sugarbeet /*Beta vulgaris* L./, Z. Pflanzenphysiol. 84, s.237-246
5. Margara J., 1970: Neoformation de bourgeons in vitro chez la betterave sucriere, *Beta vulgaris* L.C.R. Acad.Sci.Paris, Ser.D.270, s.698-731
6. Miedema P., Groot P.J., Zuidgeest J.H.M., 1980: Vegetative propagation of *Beta vulgaris* by leaf cuttings. Euphytica 29, s.425-432
7. Rogozińska J.H., Gośka M., Kuźdowicz A., 1977: Induction of plants from anthers of *Beta vulgaris* cultured in vitro.Acta Soc.Bot.Pol., 46, s. 471-479

- 8 Rogozińska J., Goška M., 1978: Induction of differentiation and plant formation in isolated sugar beet leaves. Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. sci. Biol. 26, s. 343-345
- 9 Rogozińska J., Kotowska U., Goška M., 1979: Rozmnażanie buraka pasownego z hypocotyli poprzez kultury in vitro. Hod. Roślin Aklim. Nas., 3, s. 1-7
10. Melander T., 1974: Callus and root formation in explants of *Beta vulgaris* L. Physiol. Plant., 32, s. 305-307

INDUCTION OF ORGANOGENESIS IN ROOTS, HYPOCOTYLS, AND COTYLEDONS OF SUGAR BEET IN CULTURE IN VITRO

Summary

The organogenetic potentials of the root, hypocotyl, and cotyledon in the explants of sugar beet were compared. Depending on the combination of growth regulators used, the explants formed callus and/or roots. On the cotyledons, moreover, vegetative buds were formed and developed into normal plants. The results obtained can be used in vegetative propagation of sugar beet because they give better effects than those obtained by methods used hitherto by planting leaves or roots directly into the soil.

ИНДУКЦИЯ ОРГАНОГЕНЕЗЫ В КОРНЯХ, ГИПОКОТИЛЯХ И СЕМЯДОЛЯХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В КУЛЬТУРАХ

Резюме

Сравнены органогенетические способности выращенных explantатов корней, гипокотилей и семядолей сахарной свеклы в культурах in vitro. В зависимости от комбинации регуляторов роста, explantаты образовали каллус / или корни. На семядолях, кроме того, развились вегетативные почки, из которых получены нормальные растения. Полученные результаты можно использовать в вегетативном размножении сахарной свеклы, потому что получаемые эффекты лучше, чем в применяемом до сих пор методе черенкования.

Janina Rogozińska
Zakład Fizjologii Roślin
ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz

Maria Goška
Zakład Buraka i innych Roślin Korzeniowych IHAR
pl. Weysenhoffa 11
85-950 Bydgoszcz



Stanisław Fiasziński
Wojciech Dębowski
Ewa Kaźmierczak

WSTĘPNE BADANIA AKTYWNOŚCI NIEKTÓRYCH ENZYMÓW W KIEŁKACH LINII PŁODNYCH, TYPU 0 I MĘSKOSTERYLNYCH BURAKA CUKROWEGO

Badania aktywności enzymów w etiolowych kiełkach buraka cukrowego przeprowadzono na 4 liniach płodnych, 3 wyselekcjonowanych z nich liniach typu 0 oraz 3 komplementarnych liniach męskosterylnych. Między poszczególnymi liniami stwierdzono duże zróżnicowanie aktywności esterazy, kwaśnej fosfatazy, kwaśnej i obojętnej inwertazy. Wykazano, że aktywność dehydrogenazy glutaminianowej jest niższa u roślin płodnych niż u sterylnych. Aktywność dehydrogenazy jabłczanowej jest niższa w kiełkach linii typu 0 niż w roślinach płodnych.

1. WSTĘP

Obecnie stosowane metody hodowli nowych odmian buraka cukrowego wymagają wieloletnich doświadczeń polowych. Realną perspektywą skrócenia czasu hodowli nowych odmian roślin są badania cytologiczne i biochemiczne. Prace te mają na celu wyszukiwanie różnic w budowie komórek i metabolizmie roślin płodnych i sterylnych w różnych etapach rozwoju. Badania cytologiczne nad sterylnością kukurydzy prowadzone przez Chenga i wsp./3/ wykazały, że u roślin sterylnych oprócz zakłóceń w rozwoju tapetum nie następuje gromadzenie skrobi w epidermie i endotezjum pylników w czasie późnej mikrosporogenezy. Ahokas /1/ prowadząc badania na jęczmieniu wykazał, że liście linii sterylnych zawierały więcej karotenu oraz mniejszą ilość chloroplastów i chlorofilu b w porównaniu z liniami płodnymi. Enzymatyczne badania mitochondriów płodnych i sterylnych roślin kukurydzy wykazały niższą aktywność i uboższy skład izozymatyczny oksydazy cytochromowej u roślin sterylnych /13/.

Celem przeprowadzonych badań było poszukiwanie ewentualnych różnic w poziomie aktywności kwaśnej fosfatazy, esterazy, kwaśnej i obojętnej inwertazy, dehydrogenazy glutaminianowej i jabłczanowej między kiełkami roślin płodnych, typu 0 i męskosterylnych.

2. MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły 12-dniowe etiolowane kiełki czterech linii płodnych /FJO 1₇₉, FJO 3₇₉, FJO 5₇₉, FJO 6₇₉/, trzech wyselekcjonowanych z nich linii typu 0 /S1 B₇₉, S55 B₇₉, S56 B₇₉/ oraz trzech komplementarnych linii męskosterylnych /S1 A₇₉, S55 A₇₉, S56 A₇₉/ buraka cukrowego /hodowli BHR Chodów/.

Świeżą masę /1g, 8-12 kiełków/ homogenizowano w 100 mM buforze fosforanowym o pH 7,2 zawierającym 16 mM 2-merkaptoetanol i wirowano 6 minut przy 14 tys. obr./min. W supernatancie oznaczano aktywność poszczególnych enzymów i stężenie białka.

Białko oznaczano metodą Lowry'ego i wsp. /11/ z użyciem wołowej albuminy surowiczej /BSA/ jako standardu.

Aktywność esterazy oznaczano z użyciem 1-naftylooctanu jako substratu metodą podaną przez Hippsa i Nelsona /8/. Aktywność kwaśnej fosfatazy oznaczono przez pomiar ilości p-nitrofenolu uwolnionego z p-nitrofenylofosforanu sodu. Mieszanina reakcyjna zawierała 1,9 cm³ 2,63 mM p-NPP w 100 mM buforze cytrynianowym o pH 5,5 i 0,1 cm³ ekstraktu z kiełków rozcieńczonego tym samym buforem. Po 10 minutach inkubacji reakcję hamowano 1,0 cm³ 2M roztworu wodorotlenku sodowego i mierzono absorpcję przy 410 nm. Aktywność inwertazy badano oznaczając ilość cukrów redukcyjnych uwolnionych przez 0,1 cm³ supernatantu w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 0,035 mM sacharozy. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 0,5 cm³, czas reakcji 2 minuty dla kwaśnej inwertazy i 20 minut dla obojętnej. Reakcję prowadzono w buforze McIlvaina o pH 4,5 lub 7,5 odpowiednio dla inwertazy kwaśnej i obojętnej. Ilość cukrów redukujących oznaczano zmodyfikowaną metodą Smogyi-Nelsona /7/. Aktywność dehydrogenazy jabłczanowej /2/ i glutaminianowej /10/ oznaczano mierząc spadek gęstości optycznej przy 340nm w temperaturze 24°C. Aktywność pozostałych enzymów oznaczono w temperaturze 30°C.

Jednostką enzymatyczną /J/ określano taką ilość enzymu, która wytwarza 1 mikromol produktu dla esterazy i kwaśnej fosfatazy, hydrolizuje 1 mikromol substratu dla inwertazy lub utlenia 1 mikromol NADH₂ dla dehydrogenazy w ciągu 1 minuty w opisanych warunkach reakcji. Aktywność ogólną wyrażano w jednostkach na gram świeżej masy /J/ g ś.m./, aktywność właściwą w jednostkach na miligram białka /J/mg białka/. Uzyskane wyniki są średnią z trzech kolejnych doświadczeń wykonanych w identycznych warunkach.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przedstawiane enzymatyczne badania płodnych i sterylnych, etiolowanych kiełków buraka cukrowego stanowią kontynuację badań przeprowadzonych na liściach tej rośliny /4,5/. Poprzednio wykazano, że aktywność α i β -amylazy była wyższa u linii płodnych i sterylnych w porównaniu z liniami typu 0. Linie typu 0 posiadały natomiast wyższą aktywność peroksydazy. Ge-

orgescu i wsp. /6/ stwierdzili niższą aktywność tego enzymu u linii typu 0 w porównaniu z roślinami płodnymi i męskosterylnymi, jednak badania te przeprowadzono na 45-dniowych roślinach buraka cukrowego. Ponadto różnice między wynikami uzyskanymi przez Georgescu i Dębowskiego mogą być spowodowane odmiennością genetyczną badanego materiału i warunkami klimatyczno-glebowymi.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że aktywność ogólna esterazy /tabela 1/ była bardzo zróżnicowana w obrębie poszczególnych grup

Tabela 1

Table 1

Aktywność ogólna i właściwa esterazy i kwaśnej fosfatazy w kiełkach buraka cukrowego w liniach płodnych, typu 0 i męskosterylnych

Total and specific activity of esterase and acid phosphatase in sugar beet sprouts in fertile, type 0 and male sterile lines

Linie Lines		Aktywność Activity			
		Esteraza Esterase		Kwaśna fosfataza Acid phosphatase	
		ogólna x 10 ² total x 10 ²	właściwa x 10 ² specific x 10 ²	ogólna total	właściwa specific
płodne fertile	FJQ 179	4,12 ± 0,06 ^x	1,05 ± 0,01	2,62 ± 0,08	1,60 ± 0,04
	FJQ 379	4,17 ± 0,18	0,68 ± 0,01	2,60 ± 0,10	1,43 ± 0,03
	FJQ 579	9,08 ± 0,30	2,12 ± 0,02	2,28 ± 0,05	1,34 ± 0,07
	FJQ 679	10,43 ± 0,18	2,41 ± 0,08	2,71 ± 0,11	1,49 ± 0,03
	NRU/0,05/	0,31	0,15	0,31	0,16
typu 0 type 0	S1 B79	9,12 ± 0,04	2,11 ± 0,08	2,36 ± 0,15	1,50 ± 0,01
	S55 E79	9,26 ± 0,32	2,24 ± 0,04	3,06 ± 0,04	1,51 ± 0,01
	S56 B79	10,17 ± 0,10	2,12 ± 0,06	3,36 ± 0,05	1,86 ± 0,11
	NRU/0,05/	0,92	0,28	0,40	0,31
męskosterylne male sterile	S1 A79	10,74 ± 0,62	2,53 ± 0,08	2,43 ± 0,04	1,48 ± 0,04
	S55 A79	8,92 ± 0,42	2,24 ± 0,21	2,20 ± 0,14	1,63 ± 0,03
	S56 A79	7,55 ± 0,17	1,72 ± 0,03	1,93 ± 0,03	1,32 ± 0,09
	NRU/0,05/	1,76	0,39	0,37	0,29
NRU/0,05/		0,62	0,16	0,19	0,13

x - wartość średnia ± odchylenie standardowe

linii. Największe różnice aktywności wystąpiły w grupie linii płodnych, natomiast dużo mniejsze między liniami typu 0. Aktywność właściwa tego enzymu w grupie linii typu 0 nie wykazuje istotnego zróżnicowania. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic aktywności esterazy między poszczególnymi grupami linii, natomiast poprzednie badania wykazały w liściach buraka cukrowego u linii typu 0 obecność charakterystycznego izoczymu esterazy /5/. Izozymy, esterazy badano również w pylnikach pszenicy i stwierdzono u roślin sterylnych w porównaniu z płodnymi mniejszą liczbę frakcji tego enzymu, jak również peroksydazy i leucynocaminopeptydazy /9/.

Aktywność ogólna i właściwa kwaśnej fosfatazy /tabela 1/ jest mniej zróżnicowana w badanych liniach, niż aktywność esterazy. Jednak różnice te są statystycznie istotne. Dwie spośród trzech linii typu 0 wyróżniają się dużo wyższą aktywnością ogólną od pozostałych linii. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic między grupami linii płodnych i męskosterylnych. Według Natha i Watsona /12/ aktywność ogólna tego enzymu w tarczках zarodkowych i pylnikach kukurydzy była podobna u roślin płodnych i sterylnych. Badania te, prowadzone na 72-godzinnych tarczках zarodkowych oraz w okresie premejozy, mejozy i stanu dojrzałości pylników wykazały jednak, że aktywność właściwa spadała u roślin płodnych i nie zmieniała się lub wzrastała u roślin sterylnych.

Aktywność ogólna kwaśnej inwertazy /tabela 2/ u linii męskosterylnych była podobna i najniższa w porównaniu z pozostałymi liniami /śr. 0,46 J/g s.m./. W grupie linii płodnych i typu 0 różnice aktywności były duże. Szcze-

Tabela 2

Table 2

Aktywność ogólna i właściwa kwaśnej i obojętnej inwertazy w kielkach buraka cukrowego w liniach płodnych, typu 0 i męskosterylnych

Total and specific activity of acid and neutral invertase in sugar beet sprouts in fertile, type 0 and male sterile lines

Linie Lines		Aktywność Activity			
		Kwaśna inwertaza Acid invertase		Obojętne inwertaza Neutral invertase	
		ogólna total	właściwa specific	ogólna $\times 10^2$ total $\times 10^2$	właściwa $\times 10^2$ specific $\times 10^2$
płodne fertile	FJQ 1,79	0,71 \pm 0,03 ^{1/2}	0,40 \pm 0,01	5,78 \pm 0,06	3,52 \pm 0,15
	FJQ 3,79	0,82 \pm 0,06	0,44 \pm 0,01	6,31 \pm 0,69	4,02 \pm 0,32
	FJQ 5,79	1,19 \pm 0,03	0,74 \pm 0,01	13,95 \pm 2,05	8,30 \pm 1,38
	FJQ 6,79	0,82 \pm 0,02	0,50 \pm 0,08	7,87 \pm 0,62	4,60 \pm 0,36
	NRU/0,05/	0,05	0,12	3,74	1,96

c.d. tabeli 2

typu 0 type 0	S1 B ₇₉	0,44 ± 0,01	0,26 ± 0,03	3,13 ± 0,38	2,00 ± 0,35
	S55 E ₇₉	0,62 ± 0,01	0,32 ± 0,01	5,19 ± 0,25	2,88 ± 0,06
	S50 E ₇₉	0,62 ± 0,16	0,44 ± 0,05	7,34 ± 0,25	3,72 ± 0,45
	NRU/0,05/	0,39	0,09	1,45	1,73
męskosterylne male sterile	S1 A ₇₉	0,45 ± 0,04	0,28 ± 0,05	4,92 ± 0,25	3,14 ± 0,32
	S55 A ₇₉	0,48 ± 0,01	0,33 ± 0,01	3,58 ± 0,25	2,66 ± 0,04
	S56 A ₇₉	0,45 ± 0,06	0,31 ± 0,06	3,62 ± 0,06	2,50 ± 0,18
	NRU/0,05/	0,13	0,12	1,11	0,61
	NRU/0,05/	0,11	0,08	1,67	1,05

x - wartość średnia ± odchylenie standardowe

gólnie wysoką aktywność tego enzymu stwierdzono u linii płodnej FJQ⁵⁷⁹ /1,19 J/g ś.m./. Aktywność właściwa kwaśnej inwertazy była zróżnicowana we wszystkich grupach linii. Aktywność ogólna i właściwa obojętnej inwertazy /tabeli 2/ jest także zróżnicowana u linii płodnych i typu 0. Mimo że statystycznie istotne, najmniejsze różnice aktywności stwierdzono u linii męskosterylnych. Linie płodne mają wyższą niż linie męskosterylne aktywność ogólną właściwą kwaśnej i obojętnej inwertazy, jednak różnice te nie są istotne statystycznie.

Aktywność ogólna i właściwa dehydrogenazy glutaminianowej /tabela 3/ jest bardzo podobna w grupie linii płodnych i najniższa w porównaniu z

Tabela 3

Table 3

Aktywność ogólna i właściwa dehydrogenazy glutaminianowej i jabłczanowej w kiełkach buraka cukrowego w liniach płodnych, typu 0 i męskosterylnych

Total and specific activity of glutamate and malic dehydrogenase in sugar beet sprouts in fertile, type 0 and male sterile lines

Linie Lines	Aktywność Activity				
	dehydrogenaza glutaminianowa glutamate dehydrogenase		dehydrogenaza jabłczanowa malic dehydrogenase		
	ogólna x10 total x10	właściwa x10 ² specific x10 ²	ogólna total	właściwa specific	
płodne fertile	FJQ 1 ₇₉	2,05 ± 0,13 ^x	4,76 ± 0,11	2,65 ± 0,08	0,58 ± 0,02
	FJQ 3 ₇₉	2,07 ± 0,02	4,36 ± 0,12	2,68 ± 0,05	0,56 ± 0,01
	FJQ 5 ₇₉	1,97 ± 0,11	4,45 ± 0,16	2,32 ± 0,01	0,62 ± 0,05
	FJQ 6 ₇₉	2,02 ± 0,02	4,75 ± 0,07	2,96 ± 0,17	0,68 ± 0,06
	NRU/0,05	0,31	0,38	0,53	0,08

typu 0 type 0	S1 B ₇₉	2,22 ± 0,08	5,34 ± 0,13	2,12 ± 0,03	0,46 ± 0,01
	S55 B ₇₉	2,12 ± 0,01	5,18 ± 0,02	1,80 ± 0,11	0,50 ± 0,01
	S56 B ₇₉	2,44 ± 0,05	5,67 ± 0,07	1,99 ± 0,07	0,48 ± 0,02
	NRU/0,05/	0,19	0,70	0,40	0,04
męskosterylne male sterile	S1 A ₇₉	2,16 ± 0,04	5,58 ± 0,21	2,53 ± 0,08	0,58 ± 0,01
	S55 A ₇₉	2,64 ± 0,08	6,85 ± 0,10	3,24 ± 0,20	0,53 ± 0,06
	S56 A ₇₉	3,94 ± 0,06	8,61 ± 0,03	1,72 ± 0,01	0,38 ± 0,01
	NRU/0,05/	0,31	0,69	0,46	0,17
	NRU/0,05/	0,17	0,31	0,22	0,06

x - wartość średnia ± odchylenie standardowe

pozostałymi liniami /śr. $2,03 \times 10^{-1}$ J/g ś.m., $4,58 \times 10^{-2}$ J/mg białka/. Linie typu 0 mają wyższą aktywność ogólną i właściwą /śr. $2,26 \times 10^{-1}$ J/g ś.m., $5,39 \times 10^{-2}$ J/mg białka/. Różnice aktywności właściwej między liniami płodnymi i typu 0 oraz między płodnymi i męskosterylnymi są statystycznie istotne. W grupie linii męskosterylnych występuje duże zróżnicowanie aktywności dehydrogenazy glutaminianowej. Również aktywność dehydrogenazy jabłczanowej /tabela 3/ jest bardzo zróżnicowana w tej grupie linii. Najmniejsze zróżnicowanie aktywności tego enzymu stwierdzono w grupie linii typu 0. Linie te mają niższą aktywność ogólną i właściwą w porównaniu z liniami płodnymi. Jednak różnice aktywności właściwej między liniami płodnymi i typu 0 są niewielkie.

Przedstawione enzymatyczne badania kiełków buraka cukrowego wykazały, że linie płodne FJQ 1₇₉ i FJQ 3₇₉ mają bardzo bliskie wartości aktywności ogólnej analizowanych enzymów. Linia FJQ 6₇₉ ma podobne aktywności badanych enzymów oprócz aktywności esterazy, która jest znacznie wyższa. Natomiast linia FJQ 5₇₉ ma wyraźnie wyższą od pozostałych linii płodnych aktywność esterazy oraz kwaśnej i obojętnej inwertazy. Sugeruje to, że w trakcie kilkuletniej hodowli i eliminacji cech niekorzystnych mogło nastąpić znaczne zróżnicowanie genotypów badanych linii płodnych. Linie typu 0 są istotnie zróżnicowane pod względem aktywności kwaśnej fosfatazy oraz kwaśnej i obojętnej inwertazy. Natomiast aktywność esterazy, dehydrogenazy glutaminianowej i dehydrogenazy jabłczanowej są w tej grupie bardzo podobne. Linie męskosterylne wykazują istotne zróżnicowanie pod względem aktywności wszystkich enzymów oprócz aktywności ogólnej kwaśnej inwertazy.

Z powyższego omówienia wynika, że występują znaczne różnice aktywności między poszczególnymi liniami niezależnie od przynależności do danej grupy jak i w obrębie grup. Nie pozwala to na porównywanie ze sobą aktywności średnich dla poszczególnych grup, mimo że obserwuje się w kilku przypadkach obniżanie lub wzrost aktywności linii typu 0 w porównaniu z liniami płodnymi i męskosterylnymi. Dlatego wydaje się, że badania na zszerszym materiale należałoby przeprowadzić dla tych enzymów /dehydrogenaz glutamina-

nowej i jabłczanowej/, dla których istnieje stosunkowo małe zróżnicowanie aktywności w obrębie grup, szczególnie w grupie linii płodnych i typu 0. Celowe wydaje się kontynuowanie tych badań ze względu na duże znaczenie praktyczne w hodowli.

LITERATURA.

1. Ahokas H., 1978: Cytoplasmic male-sterility in barley.II.Physiology and anther cytology of *msm₁*. Hereditas 89, 7-22
2. Bergmeyer H.U., Bemt E.,1971:Malic dehydrogenase.in: Methods of Enzymatic Analysis Ed. H.U.Bergmeyer Verlag Chemie Weinheim s.757-760
3. Cheng P., Greyson R., Walden D., 1979: Comparison of anther development in genic male-sterile and male fertile corn/*Zea mays*/ from light microscopy and scanning electron microscopy.Can.J.Bot.57 ,578-596
4. Dębowski W., 1981: Badania nad polimorfizmem izoenzymów peroksydazy linii buraków i ich mieszańców. Hod.Roślin, Aklim. i Nasien. 25 , 1-7
5. Dębowski W., 1982: Badania enzymatyczne liści buraka cukrowego o zróżnicowanej genetyczno-cytoplazmatycznej sterylności . - przygotowywane do druku w wydawnictwie Hod.Roślin,Aklim. i Nasien.
6. Georgescu C., Römer D., Olteanu Gh., 1979: Peroxidase activity as a possible test for distinguishing S-Plasm from N-Plasm in sugar beet. Euphytica 28, 779-784
7. Hatanaka Ch., Kobara Y., 1980: Determination of glucose by a modification of Somogyi-Nelson method. Agric.Biol.Chem. 44, 2943-2949
8. Hips F.P., Nelson D.R., 1974: Esterase from the midgut and gastric caecum of the american cockroach, *Periplaneta Americana* /L./ Biochim. Biophys. Acta 341 , 421-436
9. Höhler B., Börner Th. 1980:Vergleichende Untersuchungen von Isoenzymen des Anthergewebes fertiler und cytoplasmatisch männlich steriler Weizenpflanzen. Biochem.Physiol.Pflanzen 175 , 562-569
10. Kwiatkowska J., 1974: Dehydrogenazy glutaminianowa /GLDH/ w: Enzymologii klinicznej red. E.Szczeklik PZWŁ Warszawa s. 223-225
11. Lowry G.H., Rosenbrough H.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem, 193, 265-275
12. Nath J., Watson C.V., 1980: Acid phosphatase changes associated with development of male sterile and fertile maize. Biochem. Genet.18, 377-388
13. Watson C., Nath J., Nauda D., 1978: Possible mitochondrial involvement in mechanism of cytoplasmic male sterility in maize /*Zea mays*/.Biochem. Genet.15 , 1113 - 1124

PRELIMINARY STUDIES ON ACTIVITY OF SOME ENZYMES IN FERTILE, TYPE 0 AND
MALE STERILE LINES OF SUGAR BEET SPROUTS

Summary

There was estimated the activity of enzymes in etiolated sugar beet sprouts of four fertile lines—three selected from them of 0 type and three complementary male sterile lines. A large variability of esterase, acid phosphatase, acid and neutral invertase activity between individual lines was found out. It was demonstrated that activity of glutamate dehydrogenase is lower in fertile plants than in sterile ones. Malic dehydrogenase activity is lower in type 0 lines sprouts than in fertile plants.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В РОСТКАХ
ЛИНИЙ ФЕРТИЛЬНЫХ, ТИПА 0 И МУЖКОСТЕРИЛЬНЫХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Резюме

Исследования ферментативной активности в ростках сахарной свеклы проводились на 4 фертильных линиях, 3 отобранных из них линиях типа 0 и 3 комплементарных линиях мужкостерильных.

Обнаружена большая разница активности эстеразы, кислой фосфатазы, кислой и нейтральной инвертазы в отдельных линиях.

Доказано, что активность глутаматдегидрогеназы ниже у фертильных растений чем у стерильных. Активность малатдегидрогеназы ниже в ростках линии типа 0 по сравнению с фертильными растениями.

Stanisław Flasiński
Zakład Fizjologii Roślin
Instytut Rolniczy ATR
ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz

Wojciech Dębowski
Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Oddział w Bydgoszczy
Plac Ossolińskich 12

Ewa Kaźmierczak
Zakład Biochemii
Instytut Rolniczy ATR
ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz

Ryszard Zamorski
Alfons G.J.Voragen

ENZYMATYCZNA HYDROLIZA SUBSTRATÓW CELULOZOWYCH

Hydrolizowano sproszkowaną bibułę filtracyjną, bawełnę zmieloną w młynku młotkowym /bawełna MM/ i bawełnę zmieloną w młynku młotkowym i młynku kulowym /bawełna MKM/, używając w tym celu częściowo oczyszczonych celulaz otrzymanych przez frakcjonowanie handlowego preparatu enzymów celulolitycznych MAXAZYM CL 4000. Zastosowano dwie egzoglukanazy i dwie endoglukanazy oraz cztery ich kombinacje. Endoglukanazy wykazały wyższą aktywność niż egzoglukanazy w stosunku do wszystkich substratów. Najefektywniej rozkładana była bawełna MKM, a pozostałe substraty były hydrolizowane w podobnym stopniu. Enzymy i ich kombinacje ujawniały zróżnicowane, indywidualne powinowactwo w stosunku do poszczególnych substratów. Kombinacje enzymatyczne z reguły wykazywały wyższą aktywność, niż pojedyncze enzymy, lecz jedynie w kilku przypadkach stwierdzono wyraźny synergizm enzymów składowych. Wyniki testu antronowego i testu Nelsona-Somogyi'ego sugerowały, że w hydrolizatach pojawiały się niekiedy kilkocukry większe od celobiozy, ale nie zostało to potwierdzone analizą HPLC. W hydrolizatach stwierdzano obecność glukozy i celobiozy, które były uwalniane w różnym stosunku w zależności od kombinacji enzymatycznej i substratu, jednakże celobioza pojawiła się najobficiej w hydrolizatach bawełny MKM. W miarę upływu czasu w hydrolizatach stwierdzano obecność stosunkowo większych ilości glukozy.

1. WSTĘP

Biomasę celulozy tworzącej się w wyniku fotosyntezy w ciągu roku ocenia się na około 20×10^{10} t. Celuloza, jako główny składnik roślinnej ściany komórkowej, skupia około 50% węgla biosfery. W przeliczeniu na suchą masę stanowi ona około 20% masy traw, 40% drewna i $90 \pm 5\%$ bawełny /1,7,11,12/. Odpady rolnicze, przemysłowe i komunalne zawierają około 60% celulozy. Celuloza hydrolizowana do glukozy stanowi potencjalny surowiec do produkcji etanolu i w następstwie innych związków chemicznych /1,5,7,8/.

Proces hydrolizy celulozy prowadzi się różnymi sposobami, zwykle jednak jest niezbędne stosowanie kosztownych, drastycznych środków fizycznych i chemicznych. Drugą, bardziej obiecującą możliwością, stanowi rozkład enzymatyczny połączony ewentualnie z uprzednią obróbką mechaniczną w celu zwiększenia podatności celulozy na hydrolizę poprzez obniżenie stopnia krystaliczności /4,5/. Celulazy wytwarzane są w roślinach jedynie w okresie wzrostu i dojrzewania owoców. Enzymy te mogą być również syntetyzowa-

ne przez szereg mikroorganizmów, z których pleśń ze względu na łatwość hodowli są szczególnie dogodnym źródłem /1,2,6,9,10/.

Mechanizm enzymatycznego rozkładu celulozy nie jest szczegółowo poznany /2,9,10,13/. Aktywności stosowanych *in vitro* enzymów pochodzących z różnych mikroorganizmów różnią się znacznie i zależą w decydujący sposób od stosowanego substratu /3/.

Ponieważ właściwości fizykochemiczne celulozy wpływają na przebieg hydrolizy z użyciem celulaz /2,5/, w przedstawionych badaniach zastosowano różne preparaty celulozowe poddając je działaniu celulaz otrzymanych przez frakcjonowanie handlowego preparatu celulolitycznego MAXAZYM CL 4000. Enzymy stosowano osobno i w kombinacjach.

2. MATERIAŁY I METODY

a/ Enzymy

Handlowy kompleks enzymów celulolitycznych MAXAZYM CL 4000 frakcjonowano na sitach molekularnych i wymiennikach jonowych otrzymując częściowo oczyszczone dwie frakcje egzo-celobiohydrolazy beta-1,4 glukanu / C_{I_1} i C_{I_2} /, dwie frakcje endo-glukanohydrolazy beta-1,4 glukanu / C_{x_1} i C_{x_2} / oraz dwie frakcje beta-glukozydazy/celobiaz/y/. Dokładniejszy opis sposobu ich otrzymywania zamieszczono w poprzedniej pracy /14/. Enzymy użyto w następujących ilościach /w uniwersalnych jednostkach aktywności enzymatycznej - U/:

$$C_{I_1} - 0,045U, C_{I_2} - 0,010U, C_{x_1} - 0,0022U, C_{x_2} - 0,0021U$$

Podczas wstępnych badań prowadzonych na sproszkowanej bibule Whatman CF i jako substracie stwierdzono, że takie ilości winny reprezentować porównywalną aktywność.

b/ Substraty celulozowe

- bibuła: - bibułę filtracyjną Whatman CF i sproszkowano w młódcierzu;
 - bawełna: - bawełnę *Gossypium hirsutum* odtłuszczono kilkoma porcjami acetonu, wysuszone czym zmielono w młynku młotkowym /bawełna MM/ oraz część z niej dodatkowo w młynku kulowym /bawełna MKM/.
 Substraty przechowywano w eksykatorze.

c. Schemat doświadczenia

Substraty celulozowe poddano działaniu czterech celulaz osobno i w postaci czterech kombinacji / $C_{I_1} C_{x_1}$, $C_{I_1} C_{x_2}$, $C_{I_2} C_{x_1}$, $C_{I_2} C_{x_2}$ /. W próbkach termostatowanych w 30°C umieszczono po 12 mg substratu oraz 4 cm³ buforowanego w pH 5,2 roztworu enzymu /enzymów/. Próby ślepe zawierały jedynie substrat i roztwór buforowy. Do mieszaniny dodawano kilka kropli

toluenu /3-5/ w celu zahamowania wzrostu mikroorganizmów. Po 24, 120 i 168h hydrolizy każdorazowo zawartość trzech próbek z każdej kombinacji oraz dwóch prób ślepych wirowano, a supernatant poddawano analizie stosując test Nelsona-Somogyi'ego i test antronowy. Po 120 i 168 h produkty hydrolizy analizowano metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej /HPLC/.

d/ Metody analityczne

- wykonanie testu Nelsona-Somogyi'ego i testu antronowego opisano w poprzedniej pracy /14/.

- wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa /HPLC/.

Próbki analizowano po 120 i 168 h. Pobierano po 1 cm³ supernatantu i poddawano liofilizacji przez noc. Następnie, tuż przed analizą, próbki, w których za pomocą testu antronowego stwierdzono stężenie glukozy powyżej 0,5 mg/cm³ rozpuszczano w 250 μl wody destylowanej i analizowano automatycznie. Próbki o zawartości glukozy poniżej 0,5 mg/cm³ rozpuszczano w 50 μl wody destylowanej i nanoszono na kolumnę manualnie. Zastosowano aparat firmy Spectra Physics SP 8000 z integratorem SP 4100.

Warunki chromatograficzne:

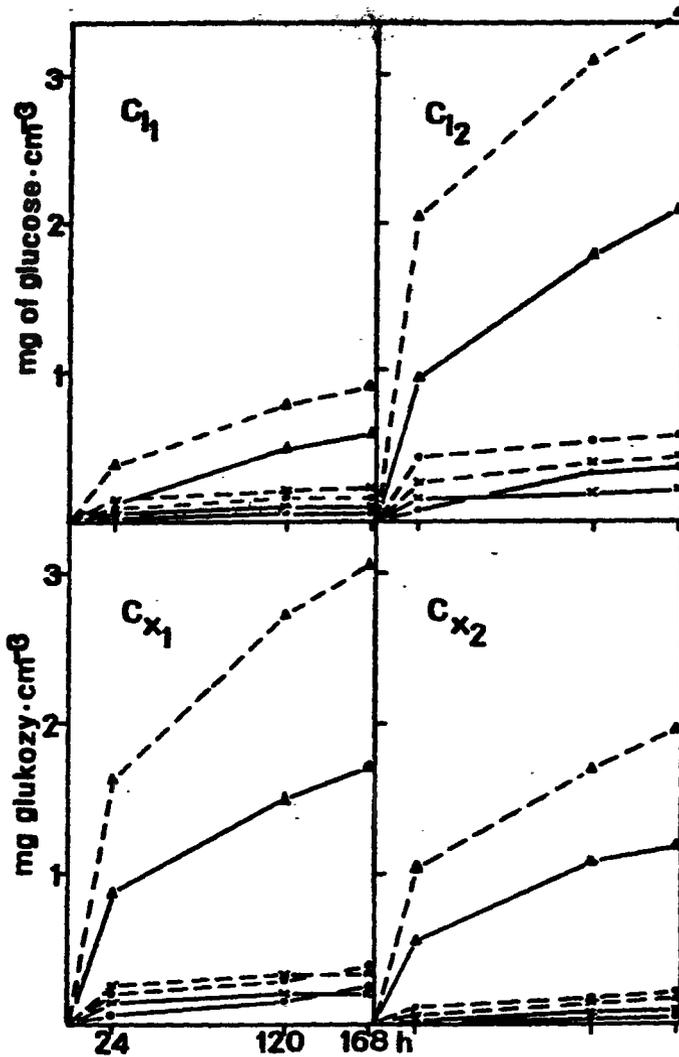
- I/ kolumna - Excalibar o wymiarach 25 x 4,6 mm /I.D./,
- II/ wypełnienie - Spherisorb S5 NH₂,
- III/ rozpuszczalniki - A-acetonitryl, B-woda,
- IV/ faza ruchoma - gradient od 15% B do 45% B, liniowy przez 10 min,
- V/ przepływ - 2,0 cm³/min,
- VI/ ciśnienie - 2000 psi,
- VII/ detektor - mierzący współczynnik refrakcji.

W tych warunkach glukoza była wmywana z kolumny po około 360 s, a celobioza po około 480 s. Próby ślepe wykazywały wyłącznie szczyt buforowy ukazujący się po około 800 s, który nie zakłócał rejestracji rozdzielu chromatograficznego.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Stwierdzona w badaniach wstępnych wyższa aktywność hydrolityczna endoglukanaz niż egzoglukanaz w stosunku do sproszkowanej bibuły utrzymywała się również w kolejnych doświadczeniach wobec pozostałych substratów /Rys.1 Tab.1/. Powyższa obserwacja może oznaczać, że zastosowane metody obróbki mechanicznej celulozy były niewystarczające dla znaczącego zniszczenia wiązań wewnątrzfibrylarnych. Wiązania te rozbijane są przez endoglukanazy /4,6,13/, co w następstwie umożliwia atak egzoglukanaz /5,6/.

Miarą aktywności hydrolitycznej celułaz mogą być wyniki testu antronowego, jak również wyniki otrzymane metodą HPLC. Wyższe wartości uzyskano z reguły w teście antronowym, niemniej jednak w wypadku bibuły i bawełny MM szeregi aktywności enzymów i ich kombinacji przedstawiają się podobnie dla obu metod /rys.1 i 2, tab.1/. Najefektywniejszymi kombinacjami enzymatycznymi w stosunku do bibuły okazały się C₁, C_{x1} i C₂, C_{x2}. W wy-

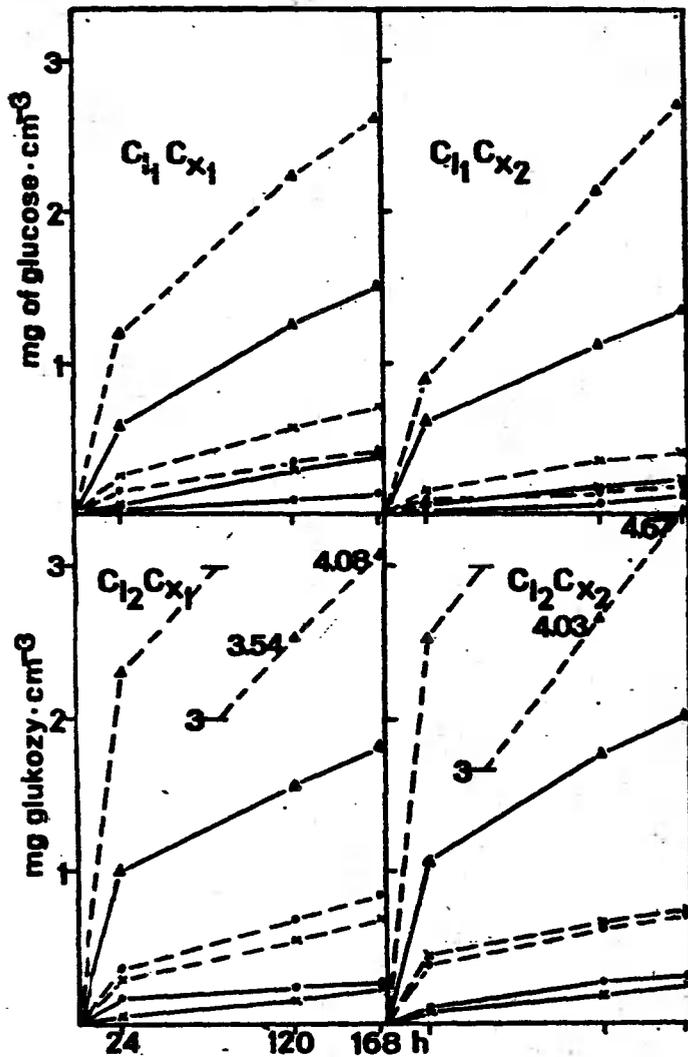


Rys.1. Aktywność hydrolityczna pojedynczych celulaz w stosunku do substratów celulozowych wyrażona jako ilość redukujących grup końcowych /test Nelson-Somogyi/ oraz stężenie cukrów w hydrolizacie /test antrony/ w przeliczeniu na glukozę

----- test A ———— test N-S
 —x— bibuła —●— bawełna MM, —▲— bawełna MKM

Fig.1. Hydrolytic activity of single cellulases against the cellulosic substrates expressed as the number of reducing end-groups /Nelson-Somogyi test/ and as sugars concentration in hydrolyzate /anthrone test/ calculated to glucose.

----- A test ———— N-S - test
 —x— filter paper, —●— cotton HM, —▲— cotton BHM



Rys. 2. Aktywność hydrolityczna kombinacji celulaz w stosunku do substratów celulozowych wyrażona jako ilość redukujących grup końcowych /test Nelson-Somogyi/ oraz stężenie cukrów w hydrolizacie /test antronowy/ w przeliczeniu na glukozę (opis jak do Rys.1.)

Fig. 2. Hydrolytic activity of cellulase combinations against the cellulosic substrates expressed as the number of reducing end-groups /Nelson-Somogyi test/ and as sugars concentration in hydrolyzate /anthrone test/ calculated to glucose (descriptions as in Fig.1.)

mienionych przypadkach obserwowano wyraźne synergiczne działanie obu enzymów składowych, postulowane przez innych autorów /6,13/. Kombinacje egzoglukanazy C_{I_1} z endoglukanazami najlepiej hydrolizowały baweinę MM, bardzo aktywna była również sama egzoglukanaza. Test antronowy wykazał również najwyższą aktywność tego enzymu i jego kombinacji w stosunku do baweiny MKM, co jednak nie zostało potwierdzone analizą HPLC, gdzie obserwowano wysoką aktywność pojedynczych enzymów C_{x_1} i C_{I_2} i nieco niższą aktywność kombinacji enzymatycznych. Egzoglukanaza C_{I_1} hydrolizowała substraty baweiny najsłabiej. Poza wymienionymi dwoma przypadkami synergizmu zjawisko to nie występowało wyraźnie w pozostałych doświadczeniach, a dla substratów otrzymanych z baweiny obserwowano nawet tendencję wzajemnej inhibicji enzymów tworzących kombinacje. Powodem takiego zachowania enzymów mogło być ich częściowe oczyszczenie, jak również niewłaściwie dobrane ilości enzymów w kombinacjach. Podobne wnioski nasuwały także wyniki poprzednich badań /14/. Wszystkie enzymy i ich kombinacje najłatwiej hydrolizowały baweinę MKM. Egzoglukanaza C_{I_1} i jej kombinacje przejawiały szczególną aktywność w stosunku do bibuły. Pozostałe pojedyncze enzymy nie wykazały zauważalnych różnic w zdolności hydrolizowania bibuły i baweiny MM, natomiast kombinacje C_{I_2} lepiej hydrolizowały baweinę MM niż bibułę /rys. 1 i 2, tabl.1/. Tak więc² sproszkowana bibuła i baweina MM charakteryzowały się podobną podatnością na hydrolizę enzymatyczną. Zastosowanie dodatkowo młyna kulowego kilkakrotnie zwiększyło możliwości hydrolizy baweiny. Fakt ten wskazuje na konieczność starannego doboru metody wstępnej obróbki mechanicznej substratów celulozowych.

Stosunek wyników testu antronowego i testu Nelsona-Somogyi'ego traktowany jako średni stopień polimeryzacji pośrednio może informować o składzie chemicznym hydrolizatu. Stosunek ten wyznaczony dla kombinacji egzoglukanazy C_{I_2} dla wszystkich substratów, a w wypadku baweiny MM również dla endoglukanazy C_{x_1} , endoglukanazy C_{I_1} oraz kombinacji $C_{I_1} C_{x_1}$ był wyższy od 2,0 /rys.1 i 2/. Na podstawie tych obliczeń można by wnioskować, że poza pojawiającymi się w hydrolizatach glukozą i celobiozą odczepiane były także większe podjednostki cukrowe /np. celobiozy/, szczególnie łatwo z baweiny MM. Mimo, że Ghose i Gosh /5/ oraz Fiechter /6/ dopuszczają taką możliwość, obserwacji tych nie potwierdziła analiza HPLC /tab.1/.

Analiza HPLC wykazała, że glukoza najobficiej była uwalniana z bibuły przez kombinacje $C_{I_1} C_{x_1}$ i $C_{I_2} C_{x_2}$, z baweiny MM przez kombinacje C_{I_2} , a z baweiny MKM także przez pojedyncze enzymy C_{I_2} i C_{x_1} . Celobioza najefektywniej odczepiana była z bibuły przez kombinację $C_{I_1} C_{x_1}$, z baweiny MM przez egzoglukanazę C_{I_2} i jej kombinacje, a z baweiny MKM przez endoglukanazę C_{x_1} i kombinację $C_{I_1} C_{x_1}$ /tab.1/.

Z ilości uwolnionych cukrów i stosunku Glu/Cel wynika, że celobioza pojawiała się stosunkowo trudniej w hydrolizatach bibuły i baweiny MM, niż w hydrolizatach baweiny MKM. Z reguły rosnący po 48 h hydrolizy stosunek Glu/cel wskazuje, że w miarę upływu czasu szybciej była uwalniania glukoza. Obniżenie tego ilorazu po 48 h obserwowano jedynie w wypadku endoglukanazy

Tabela
Table

Stężenie cukrów w hydrolizatach substratów celulozowych oznaczone metodą RPIC /mgxcm⁻³,
Concentration of sugars in hydrolyzates of cellulose substrates determined by means
of RPIC /mgxcm⁻³/

Substraty Substrates Enzymy Enzymes	Bibula - Filter Paper			Bawełna MM - Cotton HM			Bawełna MKN - Cotton BHM		
	120 h Glu/Cel Glu/Cel	168 h Glu/Cel Glu/Cel	ogółem total	120 h Glu/Cel Glu/Cel	168 h Glu/Cel Glu/Cel	ogółem total	120 h Glu/Cel Glu/Cel	168 h Glu/Cel Glu/Cel	ogółem total
C _I ₁	0,07 0,03 2,3	0,09 0,03 3,0	0,10 0,12	0,03 0,0 -	0,03 0,0 -	0,03	0,23 0,32 0,72 0,55	0,41 0,40 1,0 0,81	0,41 0,40 1,0 0,81
C _I ₂	0,10 0,0 -	0,10 0,0 -	0,10 0,10	0,14 0,04 3,5	0,09 0,09 1,0	0,18	1,16 0,59 2,0 1,74	1,68 0,52 3,2 2,20	1,68 0,52 3,2 2,20
C _x ₁	0,09 0,02 4,5	0,11 0,03 3,7	0,11 0,14	0,10 0,05 2,0	0,10 0,06 1,7	0,16	1,01 1,35 0,7 2,36	1,18 1,27 0,9 2,45	1,18 1,27 0,9 2,45
C _x ₂	0,05 0,0 -	0,05 0,01 5,0	0,05 0,06	0,05 0,0 -	0,06 0,01 6,0	0,07	0,74 0,54 1,4 1,28	1,08 0,60 1,8 1,68	1,08 0,60 1,8 1,68
C _I ₁ C _x ₁	0,28 0,17 1,7	0,34 0,18 1,9	0,45 0,52	0,06 0,02 3,0	0,09 0,01 9,0	0,10	0,72 0,82 0,9 1,54	1,11 0,89 1,2 2,00	1,11 0,89 1,2 2,00
C _I ₁ C _x ₂	0,15 0,02 7,5	0,18 0,04 4,5	0,17 0,22	0,05 0,0 -	0,07 0,0 -	0,07	0,69 0,58 1,2 1,27	1,02 0,60 1,7 1,62	1,02 0,60 1,7 1,62
C _I ₂ C _x ₁	0,13 0,0 -	0,14 0,0 -	0,13 0,14	0,15 0,06 2,5	0,34 0,06 5,7	0,40	1,22 0,48 2,5 1,70	1,37 0,37 3,7 1,74	1,37 0,37 3,7 1,74
C _I ₂ C _x ₂	0,17 0,05 3,4	0,34 0,04 8,5	0,22 0,38	0,17 0,05 3,4	0,40 0,05 8,0	0,45	1,27 0,41 3,1 1,68	1,72 0,31 5,6 2,03	1,72 0,31 5,6 2,03

Glu-glukoza
Glu-glucose

Cel-celobioza
Cel-cellobiose

MM-młyn młotkowy
HM-hammer mill

MKN-młyn kulowo-młotkowy
BHM-ball-hammer mill

C_{x_1} i kombinacji C_{I_1} , C_{x_2} dla bibuły oraz endoglikanazy C_{x_1} i egzoglikanazy C_{I_2} dla bawełny MKM. Należy jednak zaznaczyć, że w kilku przypadkach dotyczyjących obu substratów nie udało się obliczyć stosunku Glu/Cel z powodu niewykrycia celobiozy w hydrolizatach /tab.1/.

W przedstawionych badaniach potwierdziły się w pełni wnioski Fan i in /3/, którzy stwierdzili, że na przebieg rozkładu enzymatycznego celulozy ma wpływ szereg czynników, a przede wszystkim: cechy strukturalne celulozy /krystaliczność, rozmiary fibryli, konformacja, obecność wody/ bezpośrednio wpływające na możliwość dyfuzji enzymów i innych substancji chemicznych /np. soli nieorganicznych/ oraz obecność substancji towarzyszących celulozie /ligniny, hemicelulozy, pektyn/. Istotne także okazywało się pochodzenie i właściwości stosowanych enzymów /2,9/. Mimo, że użyte w naszym doświadczeniu celulazy i ich kombinacje wykazywały zróżnicowaną aktywność względem siebie i w stosunku do poszczególnych substratów, opracowane przez nas kombinacje nie wydają się być optymalnie dobrane. Niekorzystnym zjawiskiem była ujawniona wzajemna inhibicja. Wobec faktu, że inni autorzy opisali kompleksy enzymów celulolitycznych składające się z trzech rodzajów celulaz /osiem enzymów/ /13/, a nawet czterech rodzajów celulaz /5,6/ niezbędne będzie dalsze oczyszczenie zastosowanych enzymów i dokonanie ich pełnej charakterystyki oraz podjęcie badań z użyciem większej ilości enzymów /np. beta-glukozydaz/. Enzymy zastosowane w naszym doświadczeniu prawdopodobnie zawierały jeszcze domieszki innych enzymów /przypuszczalnie beta-glukozydaz/, co uwidoczniło się jako zmniejszenie ilości celobiozy po 48 h w przypadku egzoglikanazy C_{I_2} i jej kombinacji podczas hydrolizy bawełny MKM. Częściowe oczyszczenie preparatów enzymów celulolitycznych użytych w doświadczeniu zapewne powodowało występowanie wzajemnej inhibicji enzymów tworzących kombinacje /13/.

LITERATURA

1. Coughlan M., Polan M. 1978, Cellulose and cellulases: food for thought, food for the future. *Int.J.Biochem.* 10, 103-108.
2. Emert G., Gum E., Lang J., Liu T., Brown R. 1974, Cellulases. *Adv.Chem* 136, 79-99
3. Fan L., Lee Y., Beardmore D. 1980, Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis. *Adv.Biochem.Eng.* 14, 101-117.
4. Fan L., Lee Y., Beardmore D., 1980, Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotech.Bioeng.* 22, 177-199.
5. Fiechter A., 1979, Cellulosic raw material for enzymatic sugar production. *Proc.COST-Workshop on production and feeding of single cellprotein*, Jülich.
6. Ghose T., Gosh P., 1979, Cellulase production and cellulose hydrolysis. *Process.Biochem.* 14, 20-24.

7. Keenan J., 1979, Review of biomass to fuels. *Process. Biochem.*, 14 9-15.
8. Linko P., 1978, Über die Herstellung von Cellulasen und die enzymatische Spaltung von Cellulose. *Chem. Ing. Techn.*, 50, 655-661.
9. Mandels M., Dorval S., Medeiros J., 1978 Saccharification of cellulose with *Trichoderma cellulase*. *Proc.*, 2, 627-669.
10. Mandels M., Reese E., 1964, Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fibric. *Develop. Ind. Microbiol.*, 5, 3-10
11. Ott F., Spurlin H.M., Graffin M.W., 1955, Cellulose and cellulase derivatives. 11ed., t.5 Interscience Publishers, New York.
12. Sihtola H., Neimo L., 1975, The structure and properties of cellulase. *Symp. enzym. hydr. cell.*, SITRA, Helsinki, Finland, 9-21.
13. Wood T., McCrae S., 1977, The mechanism of cellulase action with particular reference to the C_I component. *Proc. Bioconversion Symp. IIT* New Delhi, India, 111-141.
14. Zamorski R., Voragen A., 1982, Enzymatyczna hydroliza polisacharydów jabłka i buraka cukrowego. *Zesz. Nauk. ATR. seria Rolnictwo*, 15, w druku.

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELLULOSIC SUBSTRATES

Summary

Pulverized filter paper, cotton hammer-milled /cotton HM/ and cotton ball-hammer-milled /cotton BHM/ were used as substrates for enzymatic hydrolysis with cellulases obtained from fractionation of the commercial cellulolytic complex MAXAZYM CL 4000. Four partially purified cellulases /two exoglucanases and two endoglucanases/ and four their combinations were applied. Endoglucanases were found to be more active than exoglucanases in action against all the substrates. The most sensitive substrate to hydrolysis was cotton BHM and the rest of the substrates were hydrolysed to a similar degree. Cellulases and their combinations acted in a different, individual way against the substrates. Enzymatic combinations showed higher activity than single cellulases, however, only in a few cases a synergistic action of exoglucanase and endoglucanase was found out. The results of the anthrone test and Nelson-Somogyi test suggested the appearance of some oligosaccharides, different from cellobiose but it was not confirmed in the HPLC analysis. They were released in a different ratio depending on the combination applied and the substrate. However, cellobiose was determined in the cotton BHM hydrolyzates in higher concentrations. Relatively higher amounts of glucose were found in hydrolyzates as the time passed.

ФЕРМЕНТАТИВНИЙ ГІДРОЛІЗ ЦЕЛЮЛОЗНИХ СУБСТРАТІВ

Резюме

Гідролізовано поромкообразную фільтровальную бунату, хлопок мелотий мелотковой мельницей /хлопок ММ/, а также хлопок мелотий конической шаровой и мелотковой мельницей /хлопок МММ/ применяя с этой целью частично очищенные комплексы: две из них это экзоглюканазы и две эндоглюканазы, а

также четыре их комбинации. Эндотоксины проявили более высокую активность, чем эндоглюказы по отношению ко всем субстратам. Хлопок МШМ был гидролизован быстрее, чем остальные субстраты, которые были гидролизованы подобным образом. Ферменты и их комбинации проявляли дифференцированную взаимную приспособленность по отношению к субстратам. Ферментативные комбинации, как правило, проявляли более высокую активность, чем остальные ферменты, однако только в нескольких случаях установлен четкий синергизм составных ферментов. На основании полученных данных антроновс теста и теста Нельсон-Сомогги в гидролизатах было отмечено присутствие олигосахаридов больше, чем целлобиозы, но этого не подтвердил анализ ХЩЛД. В гидролизатах определено присутствие глюкозы и целлобиозы, которые освобождались в равной степени в зависимости от комбинации ферментов и субстрата, однако целлобиоза чаще появлялась в гидролизатах хлопка МШМ. По истечении времени в гидролизатах отмечено присутствие большого количества глюкозы.

Ryszard Zamorski
Zakład Biochemii
Instytut Rolniczy ATR
ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz

Alfons G.J. Voragen
Department of Food Chemistry
Agricultural University of Wageningen
6703 BC Wageningen
Holandia

Bronisława Śas - Piotrowska

PORÓWNAWCZE BADANIA NAD PATOGENICZNOŚCIĄ IZOLATÓW FUSARIUM
SULPHUREUM /SCHLECHT/ W STOSUNKU DO BULW ZIEMNIAKA

W badaniach laboratoryjnych na połówkach bulw 21 odmian ziemniaka, reprezentujących różne grupy wczesności, sprawdzano patogeniczność 10 izolatów *Fusarium sulphureum*. Testy prowadzono w dwóch terminach: jesiennym /I/ i wiosennym /II/.

Stwierdzono, że najbardziej przydatnym terminem do prowadzenia testów odpornościowych jest termin jesienny. Izolatem najbardziej patogenicznym okazał się izolat F 8.

1. WSTĘP

Gospodarka rolna ponosi corocznie olbrzymie straty na skutek chorób roślin uprawnych, powodowanych przez grzyby pasożytnicze, bakterie czy wirusy.

Niektóre z chorób mogą być z powodzeniem zwalczane środkami chemicznymi, w stosunku do innych metody te są bądź to nieskuteczne, bądź też nie-ekonomiczne /1/.

Jedną z dróg prowadzących do zmniejszenia szkodliwości wielu patogenów jest hodowla odpornościowa /5/. O jej sukcesach decyduje jednak wiele czynników, z których najważniejszymi są:

- znajomość mechanizmu odporności i sposobu dziedziczenia się tej cechy oraz dostępność źródeł odporności,
- znajomość uzdolnień pasożytniczych sprawcy oraz zmienności tej cechy tak w obrębie rodzaju, jak i gatunku,
- znajomość wzajemnych uwarunkowań: patogen - roślina /3/.

Sucha zgnilizna bulw wywoływana jest przez grzyby z rodzaju *Fusarium* /9/. Różnią się one między sobą pod względem uzdolnień pasożytniczych. Gatunkiem uważanym za głównego sprawcę suchej zgnilizny bulw ziemniaka jest *Fusarium sulphureum* /4,9/. Ten też gatunek charakteryzował się w doświadczeniach laboratoryjnych najwyższą patogenicznością /6,8/.

Stwierdzono także, że różne izolaty tego samego gatunku mogą wykazywać odmienną szybkość wzrostu na podłożach agarowych /7/, a także wytwarzać enzymy powodujące macerację tkanek bulw ziemniaka o różnej aktywności /2/. Ta ostatnia cecha świadczyć może o ich odmiennej patogeniczności w stosunku do bulw ziemniaka.

Celem przeprowadzonych badań było określenie uzdatnień pasożytniczych różnych izolatów *Fusarium sulphureum*, które charakteryzowano w doświadczeniach infekcyjnych.

2. MATERIAŁ I METODA

W doświadczeniu badano patogeniczność izolatów grzyba *Fusarium sulphureum*, wyizolowanych z chorych bulw ziemniaka. W dalszym omówieniu oznaczono je symbolami od F1 do F10.

Badania przeprowadzono na 21 odmianach, które wyszczególniono poniżej:

1. Baca	7. Krab	13. Osa	19. Sowa
2. Bryza	8. Lenino	14. Pola	20. Tarpan
3. Epoka	9. Merkur	15. Prosa	21. Uran
4. Flisak	10. Narew	16. Ronda	
5. Janka	11. Noteć	17. Ryś	
6. Kora	12. Nysa	18. Sokół	

Wymienione odmiany reprezentowały różne grupy wczesności. Przy omawianiu wyników oraz na wykresach posłużono się numerami kolejnymi odmian.

Próbki bulw wymienionych odmian, w stopniu oryginału, otrzymano z Centrali Nasiennej w Bydgoszczy.

Badania przeprowadzono w dwóch terminach tj. w listopadzie /termin I/ i w maju /termin II/. Doświadczenie wykonano w 4 powtórzeniach, biorąc każdorazowo po 4 połówki bulw każdej z odmian dla każdego izolatu *Fusarium sulphureum* i terminu badań.

Inokulum stanowiły krążki pożywki agarowo-glukozowo-ziemniaczanej przeobrażone grzybnia poszczególnych izolatów *Fusarium sulphureum*. Ich średnica wynosiła 8 mm.

Wybrane do testowania zdrowe i wyrównane pod względem wielkości bulwy dokładnie myto i odfekowano przez zanurzenie w denaturacie. Następnie bulwy krojono na 2 połówki: wzdłuż osi od części stolonowej do wierzchołkowej. Połówki bulw umieszczano płaszczyzną cięcia do góry na szybie utrzymywanej za pomocą korków gumowych nad wypełnionym wodą dnem kuwety.

Inokulację przeprowadzano umieszczając na środku każdej połówki krążek grzybni w ten sposób, aby grzybnia patogena stykała się bezpośrednio z miąższem bulwy. W obiektach kontrolnych krążek grzybni zastąpiono krążkiem bibuły nasączonym wodą destylowaną.

Po inokulacji kuwety przykrywano szybą szklaną i pozostawiono w temperaturze pokojowej /około 20°C/.

Obserwacje tempa rozrastania się patogena prowadzono codziennie. Po stwierdzeniu całkowitego zarosnięcia przez jeden z izoistów *Fusarium sulphureum* całej powierzchni połówki bulwy którejś z odmian, przeprowadzano ostatnią bonitację.

Przyjęto dwa kryteria oceny:

- średnica porażenia w mm,

- głębokość porażenia w mm, którą określano po przecięciu połówki bulwy w płaszczyźnie prostopadłej do płaszczyzny pierwszego cięcia.

Zebrał wyniki badań opracowano statystycznie metodą pojedynczej analizy wariancji.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Rozprzestrzenianie się patogena na bulwach było w terminie wiosennym szybsze i wynosiło 4 dni, a w terminie jesiennym całkowite zarodnięcie powierzchni było wolniejsze i wynosiło 5 dni.

W doświadczeniu stwierdzono istotne różnice w porażeniu bulw ziemniaka w zależności od izolatów *Fusarium sulphureum*, odmian oraz terminów prowadzonych badań. Istotnymi okazały się również interakcje pomiędzy tymi czynnikami.

Największe porażenia bulw określane średnicą plamy w mm powodował izolat F 8, a mierzone głębokością wnikania izolat 7,10 /rysunek 1/. Izolaty F 6,9,5,4 były najmniej patogoniczne w stosunku do bulw ziemniaka.

Stwierdzono także odmienną reakcję badanych odmian na infekcję *Fusarium sulphureum* określoną dwoma uprzednio wymienionymi kryteriami /rysunek 2/. Najmniej podatną odmianą była Kora, dla której średnica plamy wynosiła 27,01 mm, a najbardziej podatną odmianą Narew, o średnicy plamy 36 mm. Najmniejszą penetrację w głąb bulwy stwierdzono u odmiany Lenino /4,28 mm/, a największą u odmiany Sowa /5,88 mm/.

Porażenie bulw ziemniaka zależało do terminu przeprowadzonych badań. W I terminie stwierdzono istotnie mniejsze porażenie bulw aniżeli w terminie drugim. Wynosiło ono odpowiednio:

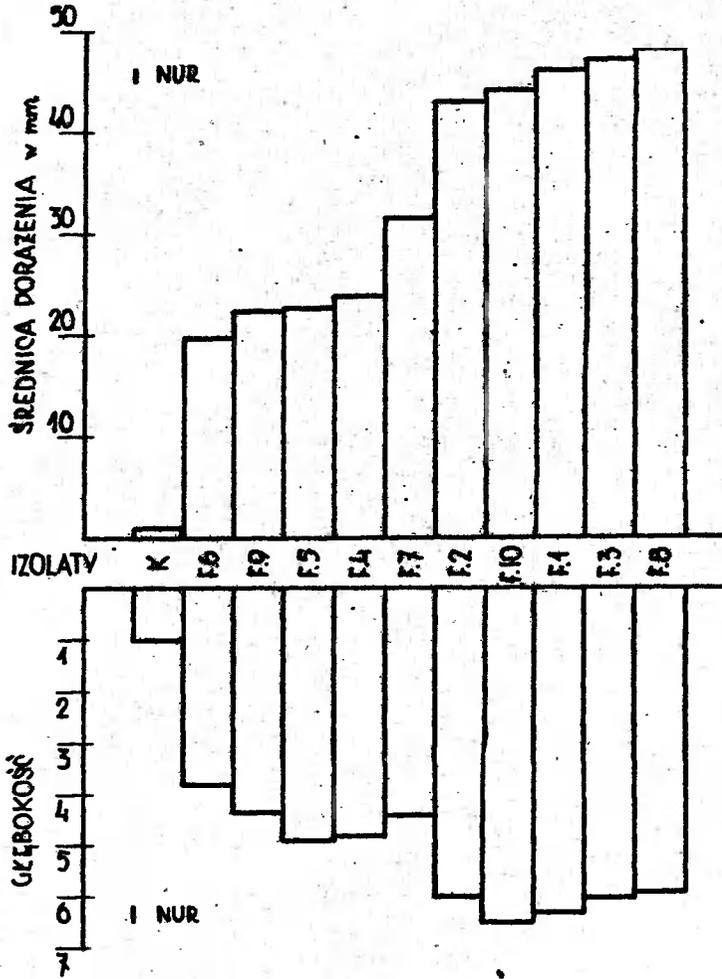
termin badań	średnica plamy /mm/	głębokość wnikania /mm/
I	30,98	4,85
II	32,14	4,99
NUR	0,41	0,09

Może to świadczyć o zmniejszającej się odporności bulw na czynnik chorobotwórczy w czasie przechowywania.

Istotnie różna reakcja odmian na zastosowanie izolaty *Fusarium sulphureum* ujawniła się tylko w wypadku jednego kryterium oceny - średnicy plamy /tabela 1/. U wszystkich odmian najmniejszą średnicą plamy, a tym samym najmniejszą patogonicznością charakteryzował się izolat F 6. Najbardziej patogonicznym okazał się izolat F 8. W silnym stopniu porażał on 13 z badanych odmian, podczas gdy izolaty F 1 i F 3 porażały po 4 odmiany.

Patogoniczność badanych izolatów zależała od terminu przeprowadzonych badań /rysunek 3/. Zróżnicowanie to obserwowano w wypadku obu stosowanych kryteriów oceny. Jedynie izolaty F 7 i F 2 nie wykazywały istotnego zróżnicowania w średnicy plamy, a izolaty F 6,7,2,3 w głębokości wnikania.

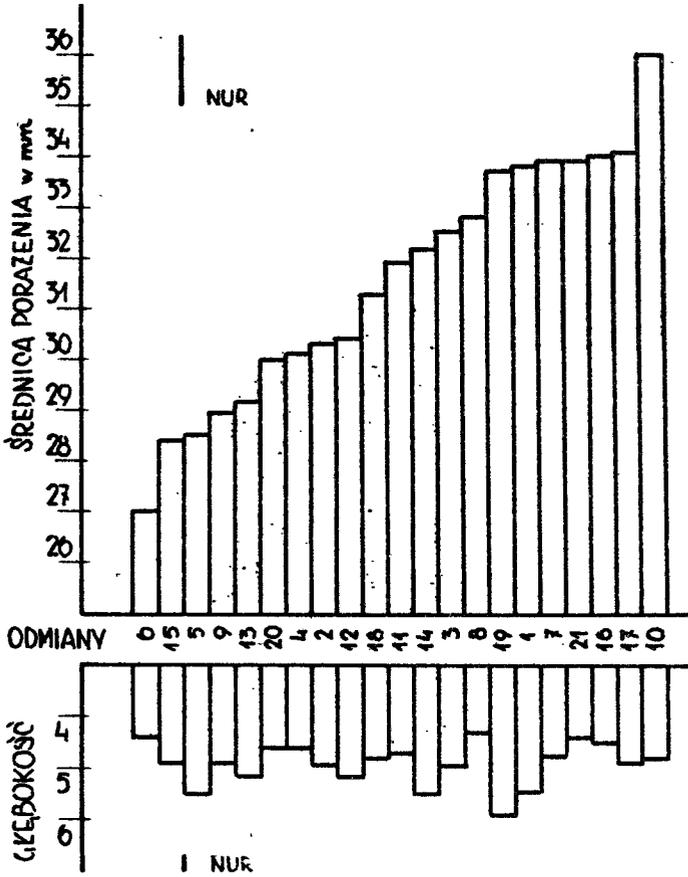
Izolaty F 5 i F 4 wykazały wyższą patogoniczność w I terminie badań niezależnie od przyjętego kryterium. Wyższe porażenie w tym terminie ob -



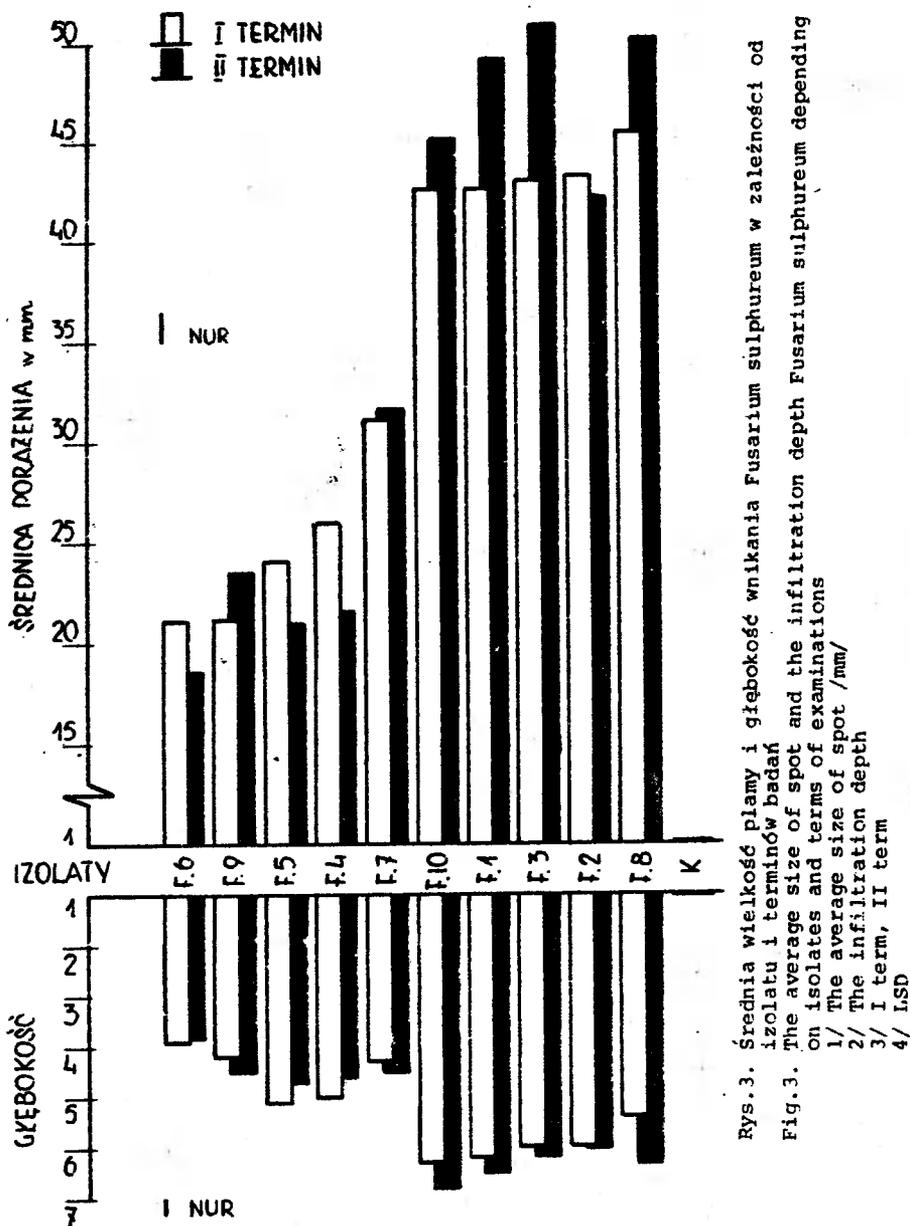
Rys.1. Średnia wielkość plamy i głębokość wnikienia w zależności od izolatów *Fusarium sulphureum*

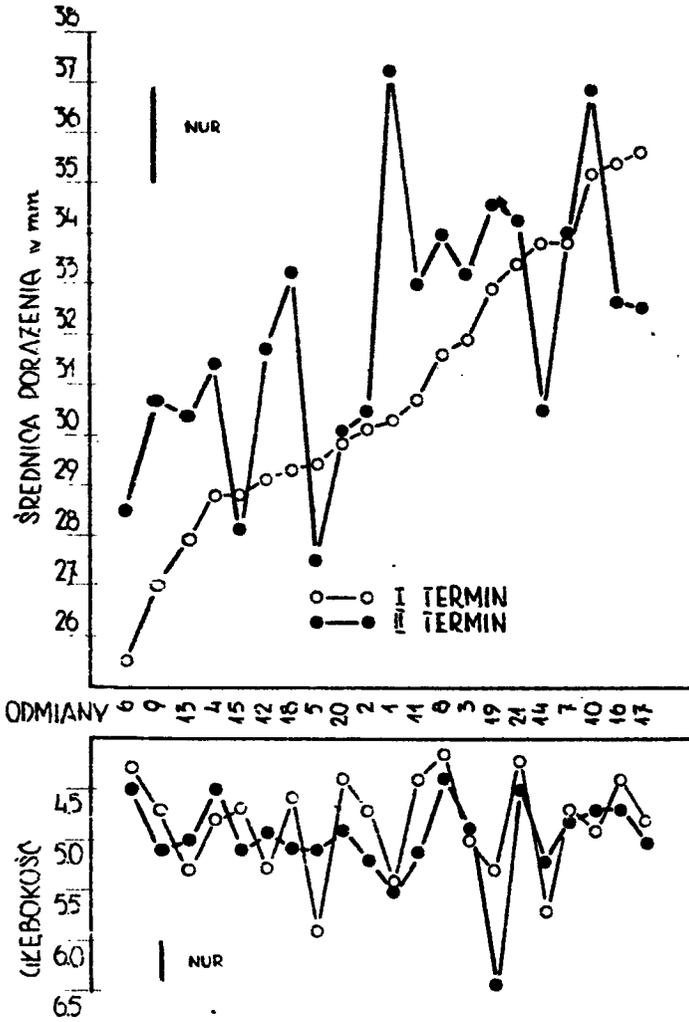
Fig.1. The average size of spot and the infiltration depth depending on isolates of *Fusarium sulphureum*

- 1/ The average size of spot /mm/
- 2/ The infiltration dept
- 3/ L&D
- 4/ Isolates



Rys. 2. Średnia wielkość plamy i głębokość wnikania *Fusarium sulphureum* w zależności od odmiany
 od odmiany
 1/ The average size of spot /mm/
 2/ The average size of spot depending on variety
 3/ The infiltration depth
 4/ Variety





Rys. 4. Średnia wielkość plamy i głębokość wnikania Fusarium sulphureum w zależności od odmiany i terminów badań.

Fig. 4. The average size of spot and the infiltration depth Fusarium sulphureum depending on variety and terms of examination

- 1/ The average size of spot /mm/
- 2/ The infiltration depth
- 3/ LOS
- 4/ Term. I term
- 5/ Varieties

Tabela 1

Średnica porażenia bulw przez *Fusarium sulphureum* w zależności od izolatu
Contamination diameter of the variety of fungus *Fusarium sulphureum* depending on
the isolates

Lp.	Odmiany	K	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9	F 10
1	Baca	1,00	45,86	44,69	49,23	24,57	23,83	20,75	42,43	52,03	22,38	44,87
2	Bryza	1,00	42,93	41,76	41,20	22,21	22,54	20,52	28,71	47,11	22,03	43,25
3	Epoka	1,00	52,44	41,74	51,35	23,07	20,41	19,14	31,71	49,76	20,52	46,76
4	Flisak	1,00	45,93	34,73	47,00	20,77	22,95	21,23	29,76	45,71	23,59	38,61
5	Janka	1,00	44,29	38,67	40,66	21,35	21,23	18,67	29,10	40,70	20,80	36,80
6	Kora	1,00	38,54	35,29	39,79	21,42	20,68	17,90	28,20	38,99	19,20	36,09
7	Krab	1,00	49,30	47,52	54,33	25,70	24,28	21,40	31,12	48,65	23,43	45,84
8	Lenino	1,00	47,58	46,54	51,44	21,28	22,55	18,68	28,89	51,49	23,54	47,71
9	Merkur	1,00	41,14	39,20	43,23	21,67	21,70	19,52	24,70	45,15	20,78	39,30
10	Narew	1,00	53,00	52,45	55,01	28,13	21,97	19,04	39,33	52,01	22,92	51,12
11	Noteć	1,00	48,01	43,46	48,57	21,37	20,97	19,03	31,03	49,49	25,20	42,76
12	Nysa	1,00	42,52	39,65	41,50	25,68	22,14	21,58	29,21	44,64	23,86	42,73
13	Osa	1,00	41,56	37,41	41,26	22,50	23,11	20,70	27,58	43,15	21,23	41,33
14	Pola	1,00	47,62	43,53	46,22	25,94	23,47	19,05	31,82	48,26	21,91	44,90
15	Proсна	1,00	44,32	37,05	40,91	21,55	21,96	17,64	25,81	42,46	21,21	38,94
16	Ronda	1,00	47,66	45,37	50,96	29,74	22,17	18,58	34,75	51,18	24,32	48,45
17	Ryś	1,00	49,04	46,40	49,38	27,34	23,93	19,04	36,43	49,78	22,38	50,07
18	Sokół	1,00	45,36	45,96	42,24	23,08	21,83	18,97	31,06	48,11	21,83	44,46
19	Sowa	1,00	45,53	45,28	48,18	27,31	26,81	23,03	35,46	50,49	23,60	44,24
20	Tarpan	1,00	41,80	41,57	46,36	19,72	20,12	19,08	28,58	48,31	20,27	42,85
21	Uran	1,00	48,45	46,66	53,83	23,06	21,83	20,89	32,90	51,57	23,17	49,19

Tabela 2

Średnica porażenia bulw przez *Fusarium sulphureum* w zależności od odmiany, izolatu i terminu badań

Contamination diameter the tubers of *Fusarium sulphureum* depending on variety, isolates and term of examinations

Odmiany	I termin										II termin											
	K	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9	F 10	K	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9	F 10
Baca	1,00	40,98	39,91	41,59	24,31	24,72	21,65	31,14	48,84	20,39	39,16	1,00	50,74	53,73	56,88	24,83	22,95	19,85	38,28	55,22	24,37	50,58
Bryza	1,00	40,14	43,49	38,75	24,23	23,47	21,36	30,84	43,50	20,43	43,97	1,00	45,73	40,02	43,65	20,18	21,60	19,69	26,57	50,71	23,63	42,52
Epoka	1,00	44,92	42,37	48,77	25,04	24,46	20,41	30,23	48,01	22,30	43,31	1,00	59,96	41,11	53,93	21,10	16,37	17,88	33,20	51,51	18,75	50,21
Fliśak	1,00	40,76	35,64	39,44	23,32	25,53	23,79	26,97	41,30	23,88	35,33	1,00	51,10	33,83	54,55	18,22	20,38	18,67	32,54	50,12	23,30	41,89
Janka	1,00	43,33	41,89	36,66	23,98	25,48	20,09	31,55	38,55	22,36	38,64	1,00	45,25	35,46	44,66	18,72	16,99	17,25	26,65	42,85	19,25	34,97
Kora	1,00	34,32	37,42	32,73	23,26	21,82	18,44	26,60	35,25	16,60	32,91	1,00	42,76	33,16	46,86	19,59	19,54	17,37	29,81	42,74	21,81	39,27
Krab	1,00	46,10	50,81	49,24	27,72	27,09	23,24	33,64	44,55	22,22	46,61	1,00	52,50	44,24	59,42	23,68	21,46	19,56	28,59	52,74	24,65	45,08
Lenino	1,00	41,75	45,96	45,53	23,90	23,01	19,80	27,53	50,85	22,58	45,94	1,00	53,41	47,12	57,35	18,66	22,09	17,56	30,24	52,13	24,50	49,49
Merkur	1,00	37,74	36,27	37,48	21,75	21,75	20,03	22,64	39,89	18,34	39,74	1,00	44,54	42,13	48,98	21,59	21,66	19,02	26,76	50,41	23,22	38,86
Narew	1,00	52,27	54,02	50,97	30,14	22,74	20,12	40,27	48,09	18,22	49,17	1,00	53,74	50,75	59,06	26,13	21,19	17,95	38,40	55,93	27,63	53,07
Noteć	1,00	45,30	42,24	44,75	23,54	21,32	20,46	27,89	48,94	25,10	37,84	1,00	50,71	40,69	52,39	19,20	20,61	17,59	34,16	50,05	25,29	47,67
Nysa	1,00	37,99	37,01	34,55	28,75	24,46	24,18	30,94	39,19	23,44	38,81	1,00	47,05	42,29	48,45	22,62	19,83	18,97	27,48	50,10	24,28	46,65
Ośa	1,00	36,50	34,17	38,92	23,57	25,44	23,17	26,15	41,13	19,34	37,57	1,00	46,63	40,66	43,60	21,43	20,77	18,23	29,02	45,18	23,13	45,09
Pola	1,00	46,30	46,48	45,37	30,81	26,08	20,61	35,08	48,92	22,20	48,99	1,00	48,95	40,57	47,06	21,08	20,87	17,50	28,56	47,60	21,63	40,82
Proсна	1,00	41,50	38,01	40,76	24,39	23,83	19,39	25,17	42,40	21,31	39,33	1,00	47,13	36,09	41,06	18,72	20,09	15,88	26,46	42,53	21,12	38,56
Ronda	1,00	45,95	46,21	50,98	35,13	24,92	20,62	38,97	52,10	23,90	49,28	1,00	49,38	44,52	50,94	24,34	19,41	16,55	30,54	50,36	24,75	47,62
Ryś	1,00	51,13	49,71	50,11	30,17	25,45	20,95	38,87	51,30	22,55	50,89	1,00	46,96	43,09	48,65	24,51	22,42	17,13	33,98	48,25	22,21	49,26
Sokoł	1,00	40,40	42,14	34,19	23,41	24,38	20,22	28,36	45,75	19,56	43,26	1,00	50,32	49,79	50,30	22,75	19,29	17,72	33,77	50,48	24,09	45,66
Sowa	1,00	45,72	48,08	47,26	26,70	25,92	21,39	30,86	50,34	20,10	44,37	1,00	45,35	42,47	49,11	27,93	27,70	24,67	40,07	50,65	27,10	44,12
Tarpan	1,00	36,21	42,58	42,51	22,70	21,61	20,62	31,29	46,13	20,13	43,34	1,00	47,38	40,41	50,22	16,74	18,62	17,55	25,87	50,49	20,42	42,35
Uran	1,00	46,18	49,30	49,61	25,06	21,76	21,29	36,97	49,42	20,88	46,21	1,00	50,73	44,02	58,06	21,06	21,91	20,50	28,83	53,73	25,46	52,18

NUR 6,39 mm

serwowano również dla izolatu F 6, ale tylko przy średnicy plamy.

Istotnie największe porażenie bulw wyrażone w średnicy plamy powodo-
wał w jesiennym terminie badań izolat F 8, a w wiosennym izolaty F 3 i
F 8. Biorąc pod uwagę głębokość wnikania w obu terminach najagresywniej-
szy był izolat F 10.

Niejednakowa była także w obu terminach badań reakcja odmian ziem-
niaka na *Fusarium sulphureum* /rys.4/. Brak istotnego zróżnicowania pomię-
dzy terminami badań obserwowano u 9 odmian dla kryterium: średnica plamy,
a u 12 odmian, gdy oceniono głębokość wnikania.

W I terminie badań wyższe porażenie, niż w terminie II stwierdzono
u 5 odmian, gdy oceniano średnicę plamy oraz u 7 odmian, gdy oceniano
głębokość wnikania. Zróżnicowanie wielkości średnicy plamy w zależności
od odmiany, użytego izolatu i terminu przeprowadzonych testów przedsta-
wiono w tabeli 2.

Istotnie największą średnicę porażenia stwierdzono w I terminie u
odmiany Ryś, a w II terminie u odmiany Baca. Przy głębokości wnikania naj-
większe porażenie w terminie I wykazała odmiana Janka, a w terminie II
odmiana Sowa. Przy uszeregowaniu otrzymanych wyników dla badanych odmian
od wartości najniższej do najwyższej, dla każdego terminu oddzielnie,
możemy zaobserwować podział użytych izolatów na dwie grupy. Grupę izola-
tów bardziej patogenicznych - F 1,2,3,8,10 i mniej patogenicznych F 4, 5,
6,9 od izolatu F 7. Izolat ten, biorąc pod uwagę średnicę porażenia, cha-
rakteryzował się średnią patogenicznością w stosunku do wszystkich od-
mian badanych tak w jesiennym, jak i w wiosennym terminie.

Biorąc pod uwagę terminy prowadzonych badań, jak też reakcję odmian
stwierdzono, że najbardziej przydatnym do testowania był izolat F 8.

4. WNIOSKI

1. Najbardziej odpowiednim terminem prowadzenia testów odpornościo-
wych okazał się termin jesienny, w którym to zaobserwowano większe pora-
żenie bulw.

2. Izolaty *Fusarium sulphureum* różniły się między sobą pod względem
patogeniczności. Najbardziej patogenicznym, a tym samym najodpowiedniej-
szym do wykorzystania w testach odpornościowych okazał się izolat F 8.

3. Badane odmiany różniły się między sobą pod względem wrażliwości
na *Fusarium sulphureum*. Odmianami najmniej wrażliwymi były Kora i Lenino.

LITERATURA

- Berliński K., 1974: Ekonomiczne aspekty ochrony ziemniaka przed choro-
bami, szkodnikami i chwastami. Biul. I.Ziem., 13, 73-92
- Bulnheim U., 1978: Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung pektin-und
zellulosespaltender Enzyme bei verschiedenen Isolaten von *Erwinia caro-*

- tovora var. stroseptica und Fusarium spp. Tag.-Ber., Akad. Landwirtschaft-Wiss. DDR, Berlin, 157, 177-186
3. Henniger H., 1969: Möglichkeiten und Probleme der Resistenzzüchtung gegenüber Knollenfäule - Erkrankungen der Kartoffel. Sitzungsber., 17 33-47
 4. Pett B., Götz J., 1978: Verbreitung kartoffelpathogener Fusarien unter besonderer Berücksichtigung des Gebietes der DDR. Tag.-Ber., Akad. Landwirtschaft-Wiss. DDR, Berlin, 157, 45-53
 5. Piotrowski W., Perz B., Komorowska - Jędryś J., Ratuszniak R., 1974 : Hodowla ziemniaków odpornych na choroby przechowalnicze. Ziemiak, 61 - 66
 6. Ratuszniak E., Sas-Piotrowska B., 1978: Versuche zur Bestimmung der Beziehungen zwischen einigen Pilzarten der Gattung Fusarium in Mischinfektionen. Tag.-Ber., Akad. Landwirtschaft.-Wiss. DDR, Berlin, 157, 81-91
 7. Sas-Piotrowska B., 1977: Próba oceny skuteczności niektórych fungicydów w laboratoryjnych doświadczeniach płytkowych. Zesz. Nauk. ATR, 44, s. Rolnictwo /3/, 125-136
 8. Sas-Piotrowska B., Ratuszniak E., 1979: Wpływ stężenia inokulum i gatunku grzyba z rodzaju Fusarium na porażenie bulw ziemniaka. Zesz. Nauk ATR, 76, s. Rolnictwo /8/, 65-86
 9. Wojciechowska H., Mikołajewska J., 1972: Grzyby powodujące suchą zgniliznę ziemniaka w Polsce. Biul. I. Ziem. 9, 91-101

COMPARATIVE RESEARCH ON ISOLATES PATHOGENICITY OF FUSARIUM SULPHUREUM
IN RELATION TO POTATO TUBERS

Summary

In a laboratory research on tubers halves of 21 potato varieties, representing different groups of earliness, pathogenicity of 10 isolates of *Fusarium sulphureum* was checked.

The tests were conducted in two terms - spring /I/ and autumn /II/.

It has been stated that the most useful term for conducting tests on hardness is the autumn term /II/. F 8 proved to be the most pathogenic isolate.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НАД ПАТОГЕННОСТЬЮ ИЗОЛЯТОВ
В СООТНОШЕНИИ К КЛУБНЯМ КАРТОФЕЛЯ

Резюме

В лабораторных исследованиях на половинках клубней у 21 сорта картофеля, спелость у которых выступает в разное время, была проверена патогенность 10 изолятов *Fusarium sulphureum*.

Тесты были проведены дважды: осенью и весной /II/.
Установлено, что наиболее подходящим сроком для проведения тестов устойчивости картофеля является осеннее время.
Самым патогенным изолитом оказался изолит P 8.

Bronisława Sas - Piotrowska
Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Instytut Rolniczy AR
ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz

Mariusz Piątek
Róża Sypniewska

WPLYW NAWOŻENIA MINERALNEGO ŻELAZISTYCH ŁĄK NADNOTECKICH NA
ZDROWOTNOŚĆ KUPKOWKI POSPOLITEJ /*DACTYLIS GLOMERATA L.*/ TY-
MOTKI ŁĄKOWEJ /*PHLEUM PRATENSE L.*/ I WIECHLINY ŁĄKOWEJ /*POA*
PRATENSIS L./

W latach 1980, 1981 przeprowadzono obserwacje nad wpływem nawożenia mineralnego nadnoteckich łąk żelazistych na zdrowotność kupkówki pospolitej /*Dactylis glomerata L.*/, tymotki łąkowej /*Phleum pratense L.*/ i wiechliny łąkowej /*Poa pratensis L.*/. Stwierdzono porażenie części nadziemnych traw przez mączniaka prawdziwego zbóż i traw /*Erysiphe graminis D.C.*/ oraz występowanie zgorzeli korzeni powodowane głównie przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Poziom nawożenia i zastosowany dodatek miedzi nie wpłynęły wyraźnie na stan zdrowotności badanych roślin. Miedź zmniejszyła jednak ilość izolowanych z korzeni grzybów patogenicznych głównie z rodzaju *Fusarium*.

WSTĘP

Wokół kanału górnonoteckiego rozciąga się na obszarze około 1240ha kompleks łąk należących do kombinatu PGR Lubostroń. Łąki te ze względu na warunki glebowe są ciekawym obiektem obserwacyjnym. Występujące tam gleby murszowo-torfowe charakteryzują się wysoką, w granicach 18%, zawartością frakcji żelazistych, a pH roztworu glebowego wynosi około 7.

W runi łąkowej w okresie przeprowadzania obserwacji dominowała wiechlina łąkowa /50%, kupkówka pospolita /10% i tymotka łąkowa /10%. Rzadziej występowała kostrzewa łąkowa, kostrzewa czerwona i mozga trzcinowata. Udział chwastów i ziół łąkowych wahał się w granicach 2%. Najczęściej obserwowano perz, gęsiówkę płaskową, barszcz zwyczajny, rdost kolankowy, mniszek pospolity i krwawnik lekarski.

W 1977 roku na łąkach przeprowadzono zabiegi rekultywacyjne. W następnych latach zaobserwowano szybką degradację porostu. Wypadały trawy najbardziej wartościowe i pojawiały się puste miejsca. Spadały plony. Badania podjęte przez IMUZ przy udziale Zakładu Fitopatologii Instytutu Rolniczego ATR w Bydgoszczy miały określić przyczynę niekorzystnych zmian. Przypuszczano, że do degradacji łąk mogły przyczynić się grzyby powodujące choroby traw.

Grzyby atakujące system korzeniowy traw wchodzi w skład mikroflory gleby łąkowej i stanowią specyficzną grupę patogenów /1/. Ich szkodli-

wość zależy od warunków siedliska, warunków atmosferycznych, zabiegów agrotechnicznych, sposobu użytkowania łąk i innych czynników. Powodują one średnio straty około 10% plonu ogólnego, a na plantacjach nasiennych nawet do kilkudziesięciu /10,12,13,14/.

Za sprawców zgnilizn korzeniowych powszechnie uważane są *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium equiseti* i *Fusarium oxysporum*. Domech /6/, Grigoriev /8/ i Łacicowa /11/ izolowali ponadto z korzeni objętych zgorzelą *Helminthosporium sativum*. Bojarczuk /3/ donosi o dużej szkodliwości grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Alternaria*, a Mühle /14/ wymienia *Pythium debaryanum*, *Olpidium brassicae*, *Polymyxa graminis* i *Ophiobolus graminis*.

Najgroźniejszym z grzybów porażających części nadziemne traw łąkowych jest mączniak prawdziwy zbóż i traw. Inne patogeny występują na ogół w niewielkim nasileniu i rzadko powodują większe straty /13,14/.

Większość autorów uważa, że obfite nawożenie azotem, wapnem lub magnezem, a niedostateczne potasem, fosforem i mikroelementami zwiększa porażenie roślin przez choroby /14,15/.

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu nawożenia mineralnego na zdrowotność traw z łąk nadnoteckich i poznanie patogenów wywołujących proces chorobowy. Obserwacje przeprowadzono w miejscowości Olimpin na łąkach doświadczalnych Instytutu Melioracji i Użytków Zielonych w Bydgoszczy.

MATERIAL I METODY

Doświadczenie założono na łąkach nadnoteckich należących do kombinatu PGR Lubostroń w 1980 roku metodą losowanych bloków. Występują tam gleby murszowo-torfowe o wysokiej, sięgającej 18% zawartości frakcji żelazistej. Zastosowano dwa poziomy nawożenia: wyższy - 700 kg NPK/ha i niższy - 350 NPK/ha z dodatkiem 20 kg CuSO_4 i bez siarczanu miedzi. Szczegółowe obserwacje zdrowotności trzech przeważających w runi gatunków traw tj. kępki pospolitej, tymotki łąkowej i wiechliny łąkowej przeprowadzono przed zbiorem każdego pokosu.

W 1980 roku na skutek nadmiernych opadów doświadczenie uległo okresowemu zalaniu. Przebieg warunków klimatycznych w 1981 roku był sprzyjający dla rozwoju i wysokiego plonowania traw łąkowych. Średnie temperatury i opady nie odbiegały od przeciętnych w tym rejonie. Ilość opadów wynosi tu tylko ok. 500 mm rocznie, ale jest to rekompensowane przez wysoki poziom wody gruntowej.

Do analiz fitopatologicznych pobierano losowo próby traw z trzech punktów każdego polotka. Stanowiły je wycięte nożem kępki o średnicy 3 cm razem z korzeniami do głębokości 20 cm. Korzenie obmywano w wodzieociągowej i ustalano stopień ich porażenia. Do wyceny porażenia korzeni i części nadziemnych zastosowano skalę dziewięciostopniową. Stopień 0 oznaczał rośliny zdrowe, a 9 całkowicie zamarłe. Następnie przeprowadzono i-

zolakę grzybów z korzeni. W tym celu wycinano z korzeni, z pogranicza miejsc zdrowych i chorych, inokula wielkości 0,5 cm. Z każdej kombinacji doświadczalnej przygotowano po 90 inokulów. Płukano je w 6% wodzie utlenionej, 0,1% sublimacie i trzykrotnie w wodzie sterylnej, a następnie wyłożono co płytek Petriego na pożywkę ziemniaczano-glukozową zastaloną agarom. W celu wyeliminowania bakterii pożywkę zakwaszono kwasem cytrynowym do pH 5,5. Wyrastające grzyby odszczepiano na skosy agarowe, doprowadzając do kultur jednorodnych, przenoszono na pożywki standardowe i oznaczano według kluczy mykologicznych: Barnett /2/, Booth /4/ i Gilman/7/.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W tabeli 1 przedstawiono wpływ nawożenia mineralnego na występowanie *Erysiphe graminis* na trawach. Z zestawienia tego wynika, że w 1980 roku

Tabela 1

Wpływ nawożenia mineralnego na występowanie *Erysiphe graminis* D.C
wyrażony w skali 9-stopniowej /Olimpin 1981r./
Effect of mineral fertilizing on *Erysiphe graminis* D.C. occurrence
presented in 9-degree scale.

Poziomy nawożenia Fertilization level /kg/ha/	Wiechlina łąkowa Meadow grass			Kupkówka pospolita Archard-grass			Tymotka łąkowa Timothy - grass			X
	Pokosy - Swath									
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	
N 300										
P ₂ O ₅ 160	1,25	3,0	1,5	0,25	2,0	0,25	0,25	1,25	0,50	1,14
K ₂ O 240										
N 150										
P ₂ O ₅ 80	1,0	2,0	0,25	0,50	1,75	0,25	0,75	1,5	0,25	0,92
K ₂ O 240										
N 300										
P ₂ O ₅ 160										
K ₂ O 240	2,25	3,5	1,0	0,75	0,75	0,50	0,25	2,0	0,5	1,28
CuSO ₄ 20										
N 150										
P ₂ O ₅ 80										
K ₂ O 120	1,5	3,0	0,75	0,25	1,25	0,75	0,5	1,5	0,75	1,14
CuSO ₄ 20										
Kontrola-Control	2,0	4,0	1,0	0,5	1,5	1,0	0,75	1,5	1,0	1,47
X	1,60	3,10	0,90	0,45	1,45	0,55	0,50	1,55	0,60	
\bar{x}		1,68			0,75			0,88		

NUR dla nawożenia 0,245
LSD for fertilizing

NUR dla pokosów 0,245
LSD for swaths

obserwowano tylko zaatakowane pojedyncze rośliny. natomiast w 1981 roku choroba wystąpiła na wszystkich badanych gatunkach traw, choć w różnym nasileniu. Najbardziej zaatakowana przez mączniaka była wiechlina łąkowa, znacznie słabiej kupkówka pospolita i tymotka łąkowa. Nasilenie choroby było największe tuż przed zbiorem drugiego pokosu. Dla kupkówki i tymotki stopień porażenia części nadziemnej wahał się w tym okresie od 0,75 do 2,0, a dla wiechliny od 2,0 do 3,5. Różnice między kombinacjami nawozowymi nie były wielkie. Najostrzej uwidoczniły się one na wiechlinie łąkowej. Dodatek miedzi spowodował większe jej porażenie. Kupkówka i tymotka w szczególnych kombinacjach nawozowych były porażone bardzo różnie, tak iż trudno znaleźć korelację między stopniem porażenia i poziomem nawożenia.

W tabeli 2 przedstawiono wpływ nawożenia mineralnego na zdrowotność korzeni traw. Zestawienie to wykazuje, że wszystkie badane w latach 1980,

Tabela 2

Wpływ nawożenia mineralnego na zdrowotność korzeni traw wyrażony w skali 9-stopniowej /Olimpin 1980r i 1981/
Effect of mineral fertilizing on healthiness of grass roots presented in 9-degree scale

Poziom nawożenia Fertilization level /kg/ha/		Rok Year	Wiechlina łąkowa Meadow-grass			Kupkówka pospolita Orchard-grass			Tymotka łąkowa Timothy - grass			x
			Pokosy - Swath									
			I	II	III	I	II	III	I	II	III	
N	300											
P ₂ O ₅	160	1980	2,0	2,5	3,2	3,5	3,5	2,5	1,5	4,0	2,0	2,6
K ₂ O	240	1981	2,5	1,0	4,0	2,5	4,0	3,0	2,0	4,0	4,0	3,0
N	150											
P ₂ O ₅	80	1980	3,0	1,0	3,0	3,5	1,0	3,0	2,1	3,0	3,0	2,5
K ₂ O	120	1981	2,5	2,0	2,0	3,5	4,0	2,0	2,0	3,0	3,3	2,7
N	300											
P ₂ O ₅	160	1980	3,5	3,5	3,0	2,5	2,5	4,0	1,5	3,0	3,0	2,9
K ₂ O	240	1981	1,0	2,0	2,5	2,0	4,0	3,0	1,0	4,0	4,0	2,6
CuSO ₄	20											
N	150											
P ₂ O ₅	160	1980	3,0	1,5	2,0	2,5	2,5	3,5	1,5	3,0	2,5	2,4
K ₂ O	120	1981	1,0	2,0	3,0	2,5	3,0	2,5	2,5	3,0	4,5	2,7
CuSO ₄	20											
Kontrola-Control		1980	3,0	2,5	3,0	3,2	2,0	2,5	1,5	2,0	2,0	2,4
		1981	2,0	2,5	3,0	2,0	3,0	3,0	1,5	1,3	4,0	2,4
x		1980	2,9	2,2	2,8	3,0	2,1	3,1	1,6	3,0	2,5	
		1981	1,8	1,9	2,9	2,5	3,6	2,7	1,8	2,8	4,0	
x		1980	2,6			2,7			2,4			
		1981	2,2			2,9			2,9			

NUR dla pokosów 1980 - 0,596
LSD for swaths 1981 - 0,253

NUR dla gatunków 1980 - 0,502
LSD for species 1981 - 0,253

Tabela 3

Występowanie grzybów na korzeniach wiechliny łąkowej /*Poa pratensis* L./
/Olimpin 1980 r.i 1981 r./

Occurrence of fungi on meadow - grass roots /*Poa pratensis* L./

Grzyb Fungus	Liczba izolatów - Number of isolates												Kontrola Control
	700 NPK						Rodzaj kombinacji nawozowej - Kind of fertilizer combination						
	80 r.	81 r.	80 r.	81 r.	80 r.	81 r.	700 NPK 20 CuSO ₄	80 r.	81 r.	350 NPK 20 CuSO ₄	80 r.	81 r.	
<i>Fusarium</i> sp.	-	25	-	20	1	12	-	-	-	-	-	-	11
<i>Fusarium sambucinum</i> Fuck.	-	10	-	5	-	7	-	-	-	-	-	-	4
<i>Fusarium solani</i> Sacc.	2	4	2	7	-	5	-	-	-	-	-	-	1
<i>Fusarium martii</i> Appel	6	-	1	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium culmorum</i> Sacc.	4	4	52	2	41	2	-	-	-	-	-	-	47
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht	-	3	5	1	6	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Fusarium avenaceum</i> Sacc.	8	-	7	2	14	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>Penicillium</i> sp. /Ogółem/	64	46	67	37	64	24	24	57	16	3	24	58	23
<i>Mucor</i> sp.	13	32	11	29	29	34	34	14	15	39	16	8	29
<i>Alternaria tenuis</i> Nees.	17	23	11	32	8	8	8	20	15	16	5	5	20
<i>Cladosporium herbarum</i> Link	19	1	14	4	5	2	2	20	2	2	2	14	3
<i>Trichoderma lignorum</i> Harze	42	1	16	1	23	2	2	36	1	11	25	4	4
<i>Verticillium</i> sp.	1	26	-	15	1	24	24	1	1	3	6	13	13
<i>Cephalosporium</i> sp.	6	3	4	4	1	1	1	1	1	4	4	3	3
<i>Cylindrocarpum</i> rad. Wollenw.	2	-	1	1	-	-	-	4	-	-	-	-	-
<i>Trichoderma galeum</i> Abbot	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Botrytis</i> sp.	2	1	2	7	8	1	1	5	5	1	1	5	1
<i>Epicoccum</i> sp.	14	1	1	-	14	1	1	6	1	1	1	15	1
<i>Phoma</i> sp.	2	1	5	-	2	-	-	1	1	1	-	-	1
<i>Macrosporium</i> sp.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus</i> sp.	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pestalotia</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia</i> sp.	1	1	1	-	1	-	-	1	1	1	-	-	1
Grzyby nieoznaczone	2	1	1	-	1	-	-	1	1	1	-	-	1
Indeterminate fungi	1	12	3	10	8	11	11	1	1	7	-	-	5
Razem - Total	178	149	135	142	167	110	165	109	137	108			

Tabela 4

Występowanie grzybów na korzeniach tymotki łakowej /Phleum pratense L./
/Olimpin 1980 r. i 1981 r./
Occurrence of fungi on tymothy - grass roots /Phleum pratense L./

Grzyby Fungus	Liczba izolatów - Number of isolates Rodzaj kombinacji nawozowej - Kind of fertilizer /combination/kg/ha												
	700 NPK		350 NPK		700 NPK 20 CuSO ₄		350 NPK 20 CuSO ₄		350 NPK 20 CuSO ₄		Kontrola Control		
	80r.	81r.	80r.	81r.	80r.	81r.	80r.	81r.	80r.	81r.	80r.	81r.	
Fusarium sp.	2	23	-	8	-	8	-	-	-	-	-	-	10
Fusarium sambucinum Fuck.	-	11	-	5	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium graminearum Schw.	1	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusarium solani Sacc.	1	5	1	6	-	6	-	-	-	-	-	-	2
Fusarium martii Appel	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Fusarium culmorum Sacc.	45	1	32	2	23	1	40	2	29	1	29	1	1
Fusarium oxysporum Schlecht.	3	1	5	-	2	1	2	2	5	2	5	2	2
Fusarium avenaceum Sacc.	15	-	10	2	10	-	10	2	6	1	6	1	1
Fusarium sp. /Ogólem/	68	41	49	23	38	18	53	33	42	13	42	13	13
Penicillium sp.	4	24	13	31	5	26	12	21	16	30	16	30	30
Mucor sp.	11	25	15	27	19	20	6	19	3	29	3	29	29
Alternaria tenuis Ness.	29	2	15	5	12	1	11	3	26	4	26	4	4
Cladosporium herbarum link	27	1	24	2	24	1	45	1	17	1	17	1	1
Macrosporium sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trichoderma lignorum Harze	-	8	-	22	1	6	-	-	-	-	-	-	11
Verticillium sp.	6	1	3	3	1	2	3	4	2	2	2	2	4
Cephalosporium sp.	-	6	-	5	1	3	-	-	-	-	-	-	5
Cylindrocarpum rad. Wollenw.	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Trichoderma glaucum Abbot	-	8	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
Botrytis sp.	1	3	1	-	-	2	1	2	1	2	2	1	1
Epicoccum sp.	4	4	12	1	10	1	6	-	11	1	11	1	1
Phoma sp.	1	-	7	2	-	1	1	-	3	3	3	1	1
Rhizoctonia sp.	1	-	6	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1
Grzyby nieoznaczone	1	12	2	15	1	11	-	-	6	1	6	1	7
Indeterminate fungi	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Razem - Total	153	131	152	136	112	95	138	123	126	107	107	107	107

Tabela 5

Występowanie grzybów na korzeniach kupkówki pospolitej /Dactylis glomerata L./
/Ollimpin 1980r. i 1981 r.
Occurrence of fungi on orchard - grass roots /Dactylis glomerata L./

Grzyb Fungus	WYKAZ KOMUNIKACJI HAWÓWYJAZU NA DACTYLIS GLOMERATA L. / OLLIMPIN 1980 R. I 1981 R.											
	700 NPK		350 NPK		700 NPK 20 CuSO ₄		350 NPK 20 CuSO ₄		700 NPK 20 CuSO ₄		Kontrola Control	
	80r.	81r.	80r.	81r.	80r.	81r.	80r.	81r.	80r.	81r.	80r.	81r.
Fusarium sp.	1	13	-	18	-	15	1	8	-	21	20	
Fusarium sambucinum Fuck.	-	5	-	8	-	5	-	6	-	-	9	
Fusarium graminearum Schw.	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	
Fusarium solani Sacc.	1	5	1	7	-	9	1	5	-	-	9	
Fusarium martii Appel	1	-	3	3	-	-	-	-	-	5	-	
Fusarium culmorum Sacc.	62	5	46	3	48	4	33	-	25	-	1	
Fusarium oxysporum Schlecht.	4	2	4	4	5	-	2	1	-	-	3	
Fusarium avenaceum Sacc.	10	-	8	1	14	1	15	1	4	-	2	
Fusarium sp. /Ogółem/	79	30	63	41	72	34	52	21	55	-	44	
Penicillium sp.	9	31	4	24	12	27	7	21	-	-	27	
Pestalotia sp.	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	
Mucor sp.	16	28	11	24	16	15	20	27	27	-	31	
Alternaria tenuis Nees.	14	3	32	4	15	3	23	1	-	-	3	
Cladosporium herbarum Link	30	3	26	2	22	1	22	4	3	-	4	
Macrosporium sp.	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	
Trichoderma lignorum Harze	1	21	3	33	1	22	1	9	1	1	25	
Verticillium sp.	5	2	-	3	1	-	-	5	-	-	3	
Cephalosporium sp.	-	4	-	5	-	1	-	3	-	-	4	
Cylindrocarpon rad. Wollenw.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Trichoderma glaucum Abot	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	2	
Botrytis sp.	4	-	2	1	-	-	2	1	29	-	-	
Epicoccum sp.	15	-	9	1	16	-	12	1	17	-	-	
Phoma sp.	-	-	3	-	3	-	1	1	-	-	-	
Rhizoctonia sp.	3	-	1	-	2	-	5	-	-	-	-	
Grzyby nieoznaczone	1	10	1	13	-	9	1	8	-	-	6	
Indeterminate fungi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Razem - Total	179	133	159	151	167	113	148	103	132	149		

1981 gatunki traw ulegały zgorzeli korzeni. Proces gnicia nasilał się w miarę rozwoju vegetacji i był najbardziej zaawansowany przed zbiorom trzeciego pokosu. Nie zaobserwowano większych różnic pomiędzy stopniem porażenia korzeni wiechliny, kupkówki i tymotki. Wahał się on w ciągu okresu vegetacji od 1 do 4. Dodatek miedzi zarówno przy wyższym i niższym poziomie nawożenia powodował nieco słabsze gnicie korzeni badanych traw.

W tabelach 3,4,5 przedstawiono grzyby wyizolowane z korzeni wiechliny łąkowej, tymotki łąkowej i kupkówki pospolitej. Składają się na nie liczne gatunki pasożytnicze i saprofityczne. Na wszystkich poddanych obserwacji gatunkach traw przeważają patogeny z rodzaju *Fusarium*. Przy wyższym i niższym poziomie nawożenia bez miedzi uzyskano zbliżone ilości izolatów grzybów z rodzaju *Fusarium*. Dodatek miedzi bardzo wyraźnie wpłynął natomiast na zmniejszenie ich liczby. Dla wiechliny łąkowej np. w 1981 roku przy wyższym poziomie nawożenia bez miedzi uzyskano ogółem 46 izolatów *Fusarium*, a po dodaniu miedzi tylko 24. Podobna tendencja wystąpiła u tymotki, a nieco słabsza u kupkówki. Poziom nawożenia nie wpłynął na zróżnicowanie gatunkowe izolowanych grzybów.

Na częściach nadziemnych kupkówki, tymotki i wiechliny w większym nasileniu wystąpił *Erysiphe graminis* D.C. tylko w 1981 roku. Porażenie mączniakiem w 1980 roku i innymi chorobami w okresie przeprowadzania doświadczenia było sporadyczne. Obfite opady w 1980 roku i okresowe zalesnienie doświadczenia mogły utrudnić rozwój grzyba *Erysiphe graminis*. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że najsilniej mączniak prawdziwy atakował wiechlinę łąkową. Choroba nasilała się przed zbiorom drugiego pokosu. Kućmierz /10/, Mikołajska /13/ i Mühle /14/ uważają, że wśród traw pastewnych właśnie wiechlina łąkowa jest najbardziej wrażliwa na porażenie mączniakiem. Z analizy uzyskanych danych wynika, że poziom nawożenia mineralnego i dodatek miedzi nie miały wyraźnego wpływu na wystąpienie choroby. Być może dlatego, że nawożenie nie było jednostronne i mimo wzrostu dawki został zachowany podobny stosunek N:P:K.

Wśród wyizolowanych z korzeni traw grzybów najwięcej gatunków należało do rodzaju *Fusarium*. Podobne wyniki uzyskali: Bojarczuk /3/, Grogoriev /8/ i Mühle /14/. Inne gatunki były reprezentowane bardzo nieznacznie. Nawożenie mineralne nie wpłynęło wyraźnie na zdrowotność korzeni traw, ale dodatek miedzi zmniejszył ilość izolatów patogenów korzeniowych, szczególnie z rodzaju *Fusarium*. W literaturze nie spotkano danych, z którymi można by porównać ten wynik.

WNIOSKI

1. Na trawach poddanych obserwacji wystąpił mączniak prawdziwy zbóż i traw *Erysiphe graminis* D.C. i zgnilizny korzeni.
2. Wiechlina łąkowa uległa najsilniejszemu porażeniu przez *Erysiphe graminis* D.C.

3. Gnicieorzeni traw wystąpiło w średnim nasileniu na całej łące dosiadcznej.
4. Poziomawożenia i dodatek miedzi nie miały wyraźnego wpływu na zdrowotność korzeni oraz na części nadziemne badanych traw.
5. Dodatek miedzi do nawożenia mineralnego zmniejszył ilość izolowanych z korzeni grzybów patogenicznych z rodzaju *Fusarium*.

LITERATURA

1. Baker K.F., Burges A., Synder W.C. 1965. Ecology of soil borne plant pathogens. Prelude to biological control. Univ. Calif. Press Berkeley, Los Angeles.
2. Barnett H.L. 1962. Illustrated genera of imperfect fungi. Burges Publ. Co., Minneapolis.
3. Bojarczuk M. 1974. Studia nad reakcją pszenicy na grzyby. Cz. II. Hod. Roślin, Aklim. i Nas., 18, 113-129.
4. Booth C. 1971. The genus *Fusarium*. Comm. Mycol. I Kew, Surrey, England
5. Cheesman J.H., Roberts E.C., Tiffany L.H. 1965. Effects of nitrogen level and osmotic pressure of the nutrient solution on incidence of *Puccinia graminis* and *Helminthosporium sativum* infection in Marion Kentucky bluegrass. Agron. J., 57, 6, 599-602.
6. Domsch K.H., Gams W. 1968. Die Bedeutung vorfruchtabhängiger Verschiebungen in der Bodenmikroflora III. Der Abbau organischer Substrate. Phytopathologische Zeitschrift, 63, 3, 287-297.
7. Gilman J.C. 1971 A manual of soil fungi. Iowa Univ. Press.
8. Grigoriev M.F. 1971. Kornievye gnili pszenicy. Zašč. Rast., 6, 14-15.
9. Kreutzer W.A. 1972. *Fusarium* spp. as colonists and potential pathogens in root zones of grassland plants. Phytopathology, 62, 9, 1066-1070.
10. Kućmierz J. 1977. Wyniki obserwacji nad wpływem nawożenia mineralnego na występowanie grzybów pasożytniczych traw łąkowych w okolicy Jaworek. Zesz. Nauk. AR. Kraków, Rolnictwo, 16, 69-86.
11. Łacicowa B. 1975. Rola niektórych roślin uprawnych w polepszaniu fitosanitarnego stanu gleby. Ochrona Roślin, 11, 5-6.
12. Madej T., Miętkiewski R. 1974. Przyczynę do znajomości mikroflory traw w szczecińskim. Roczn. Nauk Roln., Ochrona Roślin, 4, 2, 195-204.
13. Mikołajaska J. 1971. Grzyby powodujące choroby traw w woj. olsztyńskim. Ochrona Roślin, 12, 6-7.
14. Mühle E. 1975. Choroby i szkodniki traw pastewnych. PWRiL Warszawa.

EFFECT OF MINERAL FERTILIZING OF IRON MEADOWS ON THE NOTEC RIVER

Summary

In the years 1980 and 1981 there were conducted observations of the effect of mineral fertilizin of the iron meadows on the Notec River on the healthiness of the orchard-grass /*Dactylis glomerata* L./, tymothygrass /*Phleum pratense* L./, and meadow -grass /*Poa pratensis* L./ There was recorded the infection of the grass overground portions with the powdery mildews of the grass and corn /*Erysiphe graminis* D.C./ as well as the occurrence of the root gangrene caused mainly by the fungi of the *Fusarium* genus. A fertilization level and the applied addition of copper did not affect clearly the healthiness of the plants under examination. Copper, however, caused a decrease in the quantity of the pathogenic fungi-mainly of the *Fusarium* genus separated from the roots.

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НА ЖЕЛЕЗИСТЫЕ ЛУГА НАД НОТЕЦЬЮ

Резюме

В 1980-81г.г. были проведены наблюдения над влиянием внесения удобрений минеральных на железистые луга над Нотецью на целебность ежи сборной /*Dactylis glomerata* L./, луговой тимофеевки / *Phleum pratense* L./ и луговой мятлики /*Poa pratensis* L./. Установлено поражение надземной части трав мучнистой росой хлебов и трав / *Erysiphe graminis* D.C./, а также появление цитоспороза корней, вызванного главным образом, грибами рода *Fusarium*. Уровень удобрения и примененное добавление меди не повлияли отчетливо на здоровье исследуемых растений. Однако медь сократила количество изолированных из корней патогенных грибов, главным образом, из рода *Fusarium*.

Marian Piątek
Róża Sypniewska
Zakład Fitopatologii
Instytut Rolniczy ATR
ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz

Bronisława Sas - Piotrowska
Elwira Śliwińska

METODYCZNE ASPEKTY LABORATORYJNEJ OCENY REAKCJI BULW
ZIEMNIAKA NA PHOMA SOLANICOLA F.FOVEATA

I. Wpływ podłoża na wzrost i
patogeniczność grzyba *Phoma*
solanicola f.foveata

W warunkach laboratoryjnych zbadano wzrost i patogeniczność grzyba *Phoma solanicola f.foveata* hodowanego na dziewięciu podłożach. W pierwszym etapie przeprowadzono obserwacje wzrostu i zarodnikowania patogena na poszczególnych podłożach. Następnie oceniono porażenie bulw ziemniaka przez *P.solanicola f.foveata*.

Stwierdzono najbardziej intensywny wzrost *Phoma solanicola f.foveata* na pożywce agarowo-glukozowo-ziemniaczanej i maltozowej. Najintensywniejsze zarodnikowanie było na pożywce agarowo-glukozowo-ziemniaczanej. Największą patogeniczność w stosunku do bulw ziemniaka wykazał patogen wyhodowany na pożywce Martina, gdzie obserwowano najwolniejszy jego wzrost.

1. WSTĘP

Ziemniak atakowany jest przez sprawców chorób i uszkodzany przez szkodniki zarówno w okresie wegetacji, jak i w okresie przechowywania.

Do chorób grzybowych powodujących znaczne straty w przechowalniach zaliczana jest zaraza ziemniaka oraz sucha zgnilizna, która stanowi poważny problem w przechowalnictwie wielu krajów Europy Zachodniej i Północnej, obu Ameryk i Australii/12/.

Ostatnio stwierdzono w Polsce lokalne występowanie patogenów z rodzaju *Phoma*. Chorobę wywoływaną przez tego patogena nazwano fomozą. Wywołuje ją grzyb z rodzaju *Phoma*, należący do rzędu *Sphaeropsidales*, klasy *Fungi imperfecti* o nazwie *Phoma solanicola f.foveata*.

Po raz pierwszy fomozę wykrył Desmarie'res w 1849 r. na łodygach roślin ziemniaka. W Szkocji w 1936 r. choroba została wykryta na przechowywanych bulwach ziemniaka. W Niemczech stwierdzono jej występowanie w 1953r, a w ZSRR w 1958r. W Polsce chorobę zidentyfikowano po raz pierwszy w woj.opolskim w lipcu 1966 r. na ziemniakach odmiany Lenino /15/. Wiosną 1968 r. wyizolowano i zidentyfikowano grzyb *Phoma* sp. także na odmianach Wyszoborski i Wulkan, a później na innych odmianach w różnych rejonach kraju /20,21/.

Aby zapobiec stratom w plonie oraz dalszemu rozprzestrzenianiu się choroby, wielu badaczy podjęło prace w kierunku poznania sprawy choroby, dokładnej jego biologii i znalezienia odmian odpornych na fomozę /4,6,7,8,14, 16,18,19/.

Podstawowym czynnikiem, który warunkuje osiągnięcie pozytywnych wyników w hodowli odpornościowej jest znajomość biologii sprawcy i podstaw odporności. Nie mniej ważna jest możliwość dysponowania odpowiednimi metodami selekcji. Testowanie materiałów hodowlanych polega na wielokrotnym infekowaniu bulw różnych odmian i rodów ziemniaka czynnikiem chorobotwórczym i na ocenie ich odporności.

Chcąc prowadzić ostrą selekcję trzeba dysponować materiałem infekcyjnym charakteryzującym się wysoką patogeniznością, która między innymi uzależniona jest - w wypadku innych patogenów - od rodzaju podłoża.

Jak stwierdził Wnękowski /21/ najbardziej odpowiednie do izolacji grzyba *Phoma* sp. są pożywki mające za źródło węgla - maltozę, a azotu organiczne jego związki. Agarowa pożywka powinna być zakwaszona kwasem organicznym do pH 5,6, co stwarza dodatkowo sprzyjające warunki środowiskowe do wegetacji i zarodnikowania tego grzyba.

Dorożkin, Bielskaja, Popow /3/ stwierdzili, że jeżeli chodzi o źródło węgla jakim są cukry, to z heksoz najbardziej przyswajalna dla grzyba *Phoma solanicola* f. *foveata* jest glukoza, z oligosacharydów maltoza i sacharoza. Mniej korzystne dla tego grzyba okazały się laktoza, galaktoza i ramnoza. Szybki wzrost kolonii grzyba obserwuje się na pożywce z rafinozą oraz wielocukrowej, zawierającej mannozę i sorbozę.

W doświadczeniach prowadzonych przez wyżej wymienionych badaczy do pożywki dodawano jako źródło azotu NaNO_3 , KNO_3 , $\text{Mg/NO}_3/2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, NH_2NO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ i pepton. Ustalono, że patogen może przyswajać azot w różnej formie, ale najlepszymi źródłami okazały się sole nitrowe i pepton. Gwałtowne zahamowanie wzrostu grzybnicy i tworzenie piknidiów wywołały sole amonowe. Tłumaczy się to podwyższoną zawartością w pożywce azotu i wydzieleniem amoniaku. Korzystny wpływ na wzrost grzyba wykazywał pepton, zawierający mieszaninę związków azotowych.

W celu znalezienia selektywnej pożywki dla *Phoma solanicola* f. *foveata* Bannon /1/ użył agaru maltozowego zawierającego PCNB-6 ppm, chloramphenicol - 400 ppm. Agar maltozowy stosowali także Denston, Mool, Jellis, Pietkie-wicz, Wilson i Fox /2,7,13,14,19/.

Dobry wzrost i zarodnikowanie grzyba *Phoma* sp. stwierdzono na agarze ziemniaczanym /10,11,17,20/. Agar glukozowo - ziemniaczany stosowany był także w doświadczeniach radzieckich badaczy /16/.

Malcolmson w swoich badaniach nad wzrostem i patogeniznością *Phoma* sp. stosowała obok agaru ziemniaczanego agar Dox bez karbohydratu, ale z dodatkiem glukozy, sacharozy lub laktozy. Stwierdziła, że dodatek karbohydratów powoduje intensywniejszą pigmentację /10,11/.

Dorożkin i inni /3/ w pracach prowadzonych nad wzrostem *Phoma solanicola* f. *foveata* oprócz poprzednio wspomnianych podłoży wykorzystali rzadko stosowaną pożywkę Czapska z glukozą. Zawartość azotu w pożywce była stała i wynosiła

0,33 g/l. W przeprowadzonym doświadczeniu autorzy zaobserwowali, że przy różnym stosunku C:N w pożywce zmienia się akumulacja biomasy grzybni, oraz stopień powstawania piknidiów.

Ponieważ wśród badaczy brak jest zgodności co do wyboru najodpowiedniejszej pożywki dla przygotowywania materiału infekcyjnego służącego do testów odpornościowych na fomozę, jak również ze względu na brak możliwości porównywania wyników w Zakładzie Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa przeprowadzono badania wzrostu grzyba *Phoma solanicola* f. *foveata* na różnych podłożach oraz ocenę jego patogeniczności w stosunku do bulw ziemniaka.

2. MATERIAŁ I METODA BADAŃ

A - Ocena wzrostu kolonii na różnych podłożach

W doświadczeniach laboratoryjnych stosowano dziewięć podłoży, różniących się składem chemicznym a mianowicie:

- | | |
|-------------------|---|
| 1. Czapek - Dox | 6. Henningera |
| 2. Raulin - Thoma | 7. Martina |
| 3. Numer - 3 | 8. Maltosowe |
| 4. Knopa | 9. AGZ /agarowo-glukozowo-ziemniaczana/ |
| 5. Prianisznikowa | |

Spośród nich osiem stanowiło podłoża syntetyczne, a dziewiąte podłoże było naturalne. Przy omawianiu wyników dla ułatwienia będzie stosowana numeracja pożywek.

Sterylnie przygotowane pożywki rozlewano do płytek Petriego o średnicy 10 cm, a następnie szczepiono kulturą *Phoma solanicola* f. *foveata*, pochodzącą z hodowli na pożywce AGZ.

Badania prowadzono w dwóch terminach: I - wiosenny /maj/, II - jesienny /listopad/. Każdorazowo w 4 powtórzeniach, po 7 płytek Petriego w powtórzeniu. Doświadczenie prowadzono przez 2 lata.

Zainfekowane podłoża przechowywano w temperaturze + 5°C. Co dwa dni prowadzono pomiary wielkości kolonii mierząc dwie prostopadłe do siebie średnice.

Do obliczeń statystycznych wykorzystano wyniki pochodzące z pomiarów wykonywanych w momencie gdy:

- 1 - jedna z płytek była całkowicie zarosnięta przez grzybną patogenną,
- 2 - wszystkie płytki danego podłoża zostały pokryte grzybną patogenną.

Uzyskane wyniki opracowano metodą pojedynczej analizy wariancji.

B - Ocena intensywności zarodnikowania grzyba *Phoma solanicola* f. *foveata*

Badania zarodnikowania przeprowadzono na pożywkach: maltosowej i AGZ. Na nich to bowiem obserwowano najszybszy wzrost grzyba *Phoma* sp.

Ocenę intensywności zarodnikowania patogena oceniano w następujący sposób: z każdej z płytek spłukiwano wytworzone zarodniki 10 ml wody destylowanej, zlewając zawiesinę do naczynia szklanego. Po dokładnym wymieszaniu dokonywano oceny liczby zarodników w 1 mm³ wykorzystując w tym celu komorę Thoma /5/.

C - Ocena wzrostu grzyba *Phoma solanicola f. foveata* na bulwach ziemniaka

W celu sprawdzenia patogeniczności grzyba *Phoma* sp. wyhodowanego na badanych podłożach, przeprowadzono doświadczenie, w którym zastosowano zmodyfikowaną metodę Langtona /9/. Polegała ona na sztucznej inokulacji uprzednio umytych i wysterylizowanych denaturatem bulw odmian: Certa, Kora, Lenino, Liwia, Pola, Reda i Tarpan.

Zakażenie bulw, które przeprowadzono w terminie jesiennym, polegało na tym, że korkoborem o średnicy 5 mm wycinano w części stolonowej i wierzchołkowej po 2 otwory o głębokości 5 mm. Następnie do wyciętych otworów wkładano 2 mm średnicy krążki grzybni *Phoma* sp., a w celu zabezpieczenia przed wyschnięciem, zatykano je wyciętym kawałkiem bulwy. Po 40 dniowym okresie przechowywania w temperaturze + 5°C przeprowadzono pomiary porażenia bulw. Jako podstawowe kryterium oceny porażenia przyjęto głębokość wnikania i średnicę porażenia. Głębokość porażenia czyli wzrost osiowo mierzono od powierzchni bulwy i najgłębszego punktu penetracji grzyba.

Średnicę porażenia - wzrost promieniowy - mierzono największą średnicą plamy na przekroju poprzecznym, prostopadłym do miejsca infekcji. Wyniki opracowano statystycznie metodą pojedynczej analizy wariancji.

3. WYNIKI BADAŃ

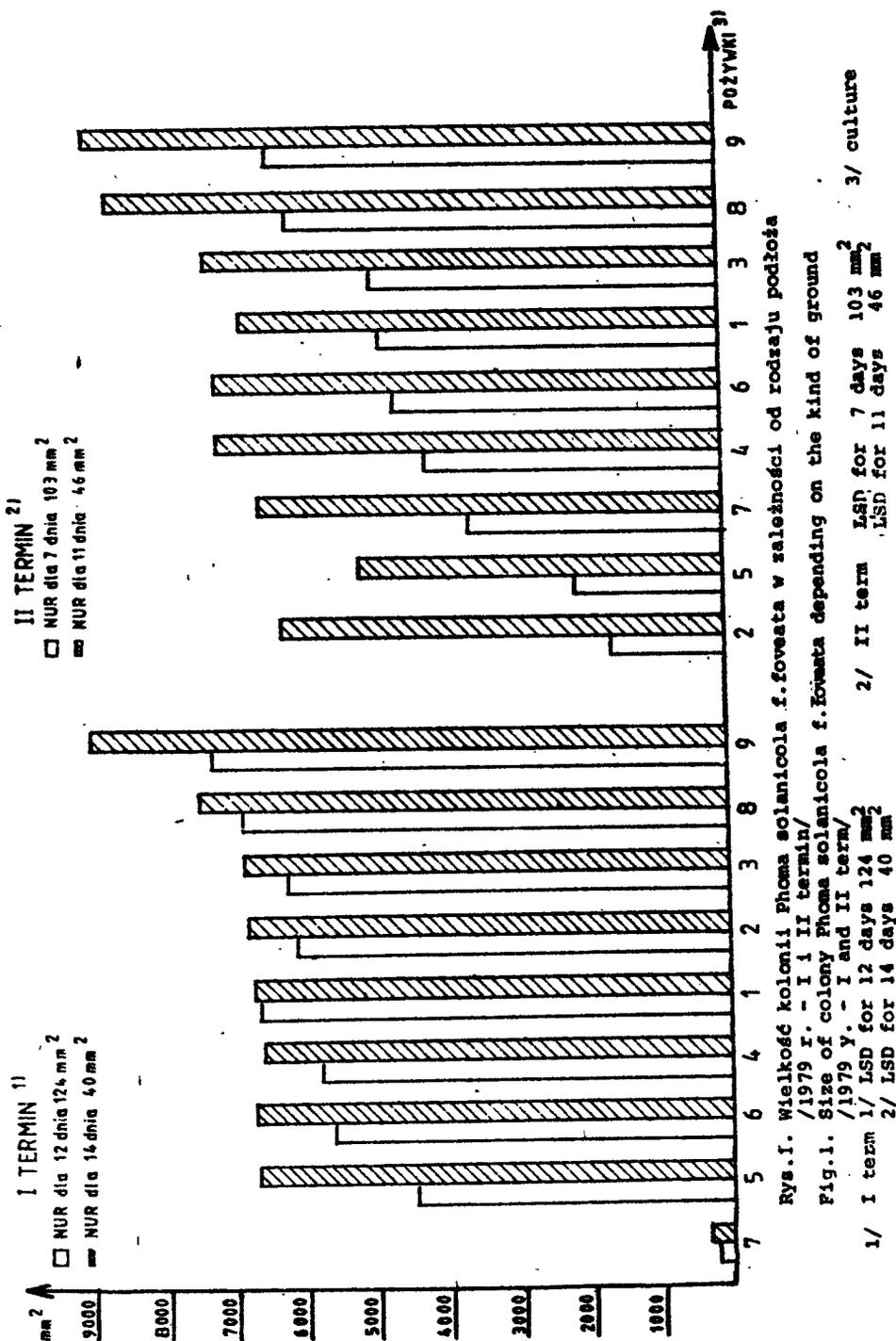
A - Ocena wzrostu kolonii

Obserwacje prowadzone nad wzrostem kolonii patogena na różnych podłożach wykazały różną szybkość jego wzrostu w latach i terminach badań, co przedstawia się następująco:

1979 r.	I termin - po 12 i 14 dniach
	II termin - po 7 i 11 dniach
1980 r.	I termin - po 8 dniach
	II termin - po 7 i 8 dniach

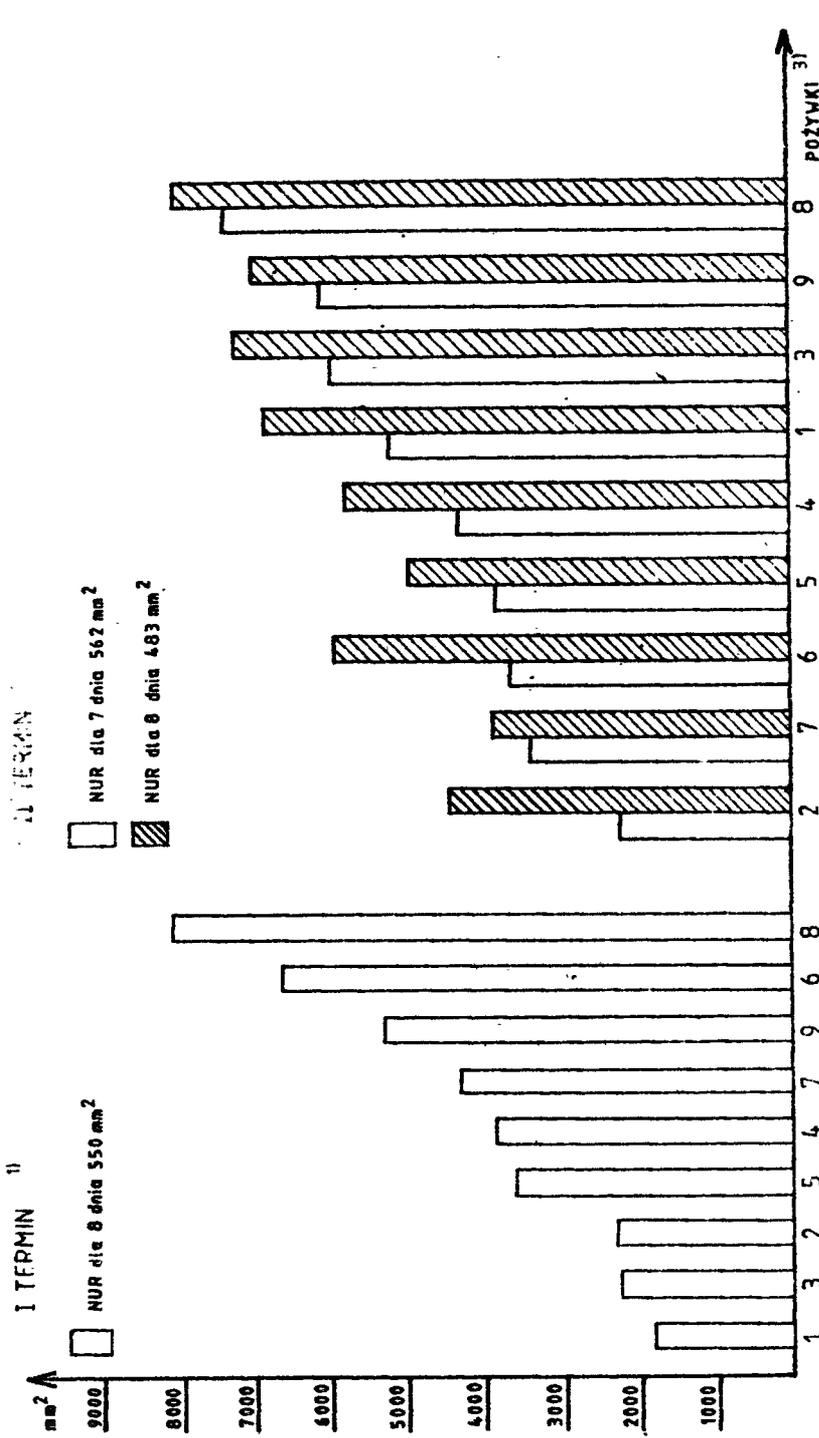
W drugim roku prowadzonych badań, całkowite zarośnięcie płytek nastąpiło w tym samym czasie tak w I, jak i II terminie badań, czyli w 8 dniu od momentu szczepienia. W pierwszym roku czas całkowitego zarośnięcia był istotnie dłuższy, wynoszący średnio około 13 dni.

Analiza statystyczna wyników wykazała, że w obu terminach badań wzrost grzybni był istotnie zróżnicowany, uzależniony od użytego do hodowli podłoża /rysunek 1 i 2/.



Rys. 1. Wielkość kolonii *Phoma solanicola* f. *foveata* w zależności od rodzaju podłoża /1979 I. - I i II termin/

Fig. 1. Size of colony *Phoma solanicola* f. *foveata* depending on the kind of ground /1979 Y. - I and II term/



Rys. 2. Wielkość kolonii *Phoma solanicola* f. *foveata* w zależności od rodzaju podłoża /1980r., - I i II termin/
 Fig. 2. Size of colony *Phoma solanicola* f. *foveata* depending on the kind of ground /1980 y.- I and II term/
 1/ I term LSD for 8 days 350 mm² 2/ II term LSD for 7 days 652 mm² 3/ Culture LSD for 8 days 483 mm²

Oceniając użyte do prowadzenia kultur *Phoma solanicola f.foveata* pożywki można stwierdzić, że najbardziej optymalną wielkość kolonii, istotnie wyższą od pozostałych, uzyskano na podłożu 9 /AGZ/ i 8 /maltozowym/, dla których średni procent zarosnięcia płytek wynosił odpowiednio 80 - 100% i 95-100%. Najslabiej rozwijał się patogen na podłożu 7 /Martina/, na którym kolonia zajmowała około 50% powierzchni oraz podłożu 2 /Raulin-Thoma/, gdzie stopień zarosnięcia powierzchni wynosił około 42% powierzchni płytki.

Dynamikę wzrostu patogena *Phoma solanicola f.foveata* w czasie trwania doświadczenia płytkowego na wybranych podłożach przedstawiono na rysunku 3.

B - Zarodnikowanie

Przeprowadzone badania intensywności zarodnikowania patogena na najbardziej optymalnych podłożach dla jego wzrostu wykazały istotne zróżnicowanie w ilości wytworzonych zarodników. Średnio w 1 mm³ badanej zawiesiny ilość zarodników wynosiła na podłożu AGZ-40000, natomiast na podłożu maltozowym-12000.

C - Patogeniczność *Phoma solanicola f.foveata*

Na podstawie analizy wariancji przeprowadzonej dla dwóch kryteriów oceny:

- 1/ głębokości wnikania,
- 2/ średnicy porażenia,

stwierdzono istotne zróżnicowanie w patogeniczności grzyba *Phoma* w stosunku do bulw ziemniaka, w zależności od rodzaju podłoża, na którym został wyhodowany /tabela 1/.

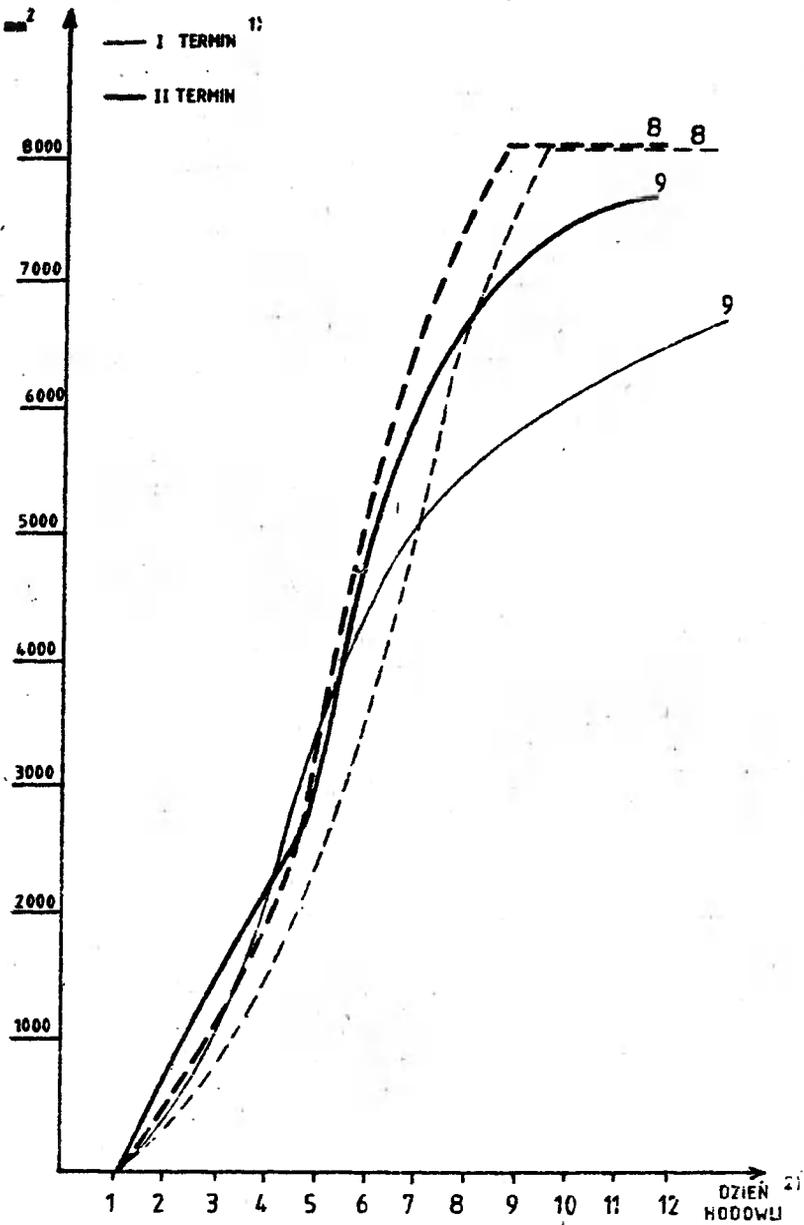
Stwierdzono również istotne zróżnicowanie uzyskanych wyników tylko dla głębokości wnikania patogena /1 kryterium/ w zależności od miejsca infekcji. Przy drugim kryterium oceny nie stwierdzono istotności różnic w zależności od miejsca infekcji.

Największą średnią głębokość porażenia uzyskano przy infekcji bulw grzybem wyhodowanym na podłożu 7 /Martina/. Wynosiła ona dla części wierzchołkowej 11,70 mm, dla stolonowej 11,86 mm.

Najmniejszą patogeniczność wykazał patogen prowadzony na podłożu 8 /maltozowym/. Głębokość wnikania wynosiła średnio dla części stolonowej 9,40 mm, dla wierzchołkowej 9,00 mm.

Najbardziej podatną odmianą na wnikanie patogena w głąb bulwy okazała się odmiana Pola, dla której średnia głębokość wnikania wynosiła : w części stolonowej 20,85 mm, w części wierzchołkowej 21,90 mm. Najbardziej odporną odmianą była odmiana Tarpan, u której porażenie części stolonowej dochodziło do 7,97 mm, zaś części wierzchołkowej do 8,03 mm.

Największą patogeniczność wykazał grzyb *Phoma solanicola f.foveata* rosnący na podłożu 7 /Martina/, dający przeciętną średnicę porażenia około 8,75 mm.



Rys. 3. Tempo wzrostu grzyba *Phoma solanicola* f. *foveata* na wybranych pożywkach w I terminie badań

Fig. 3. Growth rate of *Phoma solanicola* f. *foveata* on chosen cultures in I term of examinations

- 1/ I term
- II term
- 2/ day of cultivation

Tabela 1
Figure 1

Srednica porażenia i głębokość wnłkania grzyba *Phoma solanicolae* f. *foveata* w zależności od odmiany, pożytki i miejsca infekcji / w mm/
Contamination diameter and the infiltration depth of fungus *Phoma solanicolae* f. *foveata* depending on culture, variety and place of infection /in mm/

Pożyw- ka	średnica porażenia - contamination diameter						głębokość wnłkania - the infiltration depth							
	Liwia Reda	Jeninno	Kora	Certa	Tarpan	Pola	sred.	Liwia Reda	Lenino	Kora	Certa	Tarpan	Pola	śred.
Miejsce infekcji-cześć stolonowa Place of infection - stolon part														
1	5,00	5,25	7,25	5,88	5,00	10,12	6,25	9,12	8,00	8,88	9,50	7,25	16,13	9,71
2	5,62	5,00	5,13	5,38	5,13	10,12	5,95	8,00	7,50	9,75	8,75	8,25	16,13	9,60
3	5,00	5,75	5,13	5,38	5,75	5,62	12,88	6,50	8,38	8,37	8,75	7,38	24,25	10,59
4	5,62	5,38	5,25	5,50	5,38	9,37	5,96	8,50	8,13	8,37	8,82	8,25	14,38	9,46
5	6,38	5,62	5,38	5,38	5,88	5,00	16,37	7,14	9,00	8,50	8,75	7,00	25,00	10,86
6	6,00	5,38	5,38	6,50	6,38	5,13	12,25	6,71	8,25	8,00	9,25	8,63	22,12	10,75
7	7,00	6,25	8,00	11,00	6,87	5,50	18,13	8,96	8,37	11,25	10,00	9,13	7,50	25,63
8	5,00	5,50	6,13	5,50	5,25	9,38	6,00	5,88	7,62	7,82	8,38	8,75	18,37	9,40
9	5,25	5,62	5,25	5,88	5,88	5,25	13,75	6,70	7,62	7,98	8,25	8,75	25,63	10,98
śred.	5,65	5,53	5,67	6,36	5,86	5,25	12,49	8,13	8,36	8,91	9,11	9,05	7,97	20,85
Miejsce infekcji-cześć wierzchołkowa Place of infection - apical part														
1	5,00	5,50	5,50	8,13	6,25	5,13	9,75	6,46	8,12	8,00	9,38	9,00	7,50	20,50
2	5,88	5,25	5,13	5,13	5,75	5,00	10,12	5,96	8,50	8,12	9,38	9,00	8,12	16,63
3	5,00	5,50	5,13	5,50	5,75	5,25	12,62	6,39	8,88	7,87	9,13	7,82	7,50	29,50
4	5,88	5,50	5,25	5,38	5,38	8,75	6,04	8,50	8,25	8,37	8,63	10,13	8,25	14,62
5	5,38	5,50	5,25	5,25	6,13	5,00	18,50	7,29	9,00	9,00	8,50	8,38	6,75	28,63
6	5,62	5,62	5,25	5,88	6,25	5,38	10,87	6,41	7,50	8,38	9,38	9,88	8,37	16,88
7	7,75	6,00	6,75	8,25	6,50	5,62	18,87	8,54	9,00	9,87	9,25	8,63	8,50	28,50
8	5,00	5,50	5,75	6,00	5,25	5,25	8,75	5,93	7,13	7,75	7,62	8,25	8,50	15,25
9	5,88	5,38	5,38	5,00	6,62	5,38	16,62	7,18	7,62	7,25	8,75	7,88	8,38	24,63
śred.	5,68	5,53	5,50	6,14	5,92	5,26	12,76	8,25	8,28	8,86	8,61	9,04	8,03	21,90

Tabela 1

Różnice graniczne dla porównania badanych wyników least significant difference for compared of factors tested			
NUR dla miejsca infekcji LSD for the place of infection			0,05 mm
NUR dla pożywek LSD for cultures	0,04 mm	NUR dla miejsca infekcji LSD for the place of infection	0,05 mm
NUR dla odmian LSD for varieties	0,08 mm	NUR dla odmian LSD for varieties	0,09 mm
NUR dla interakcji m.infekcji x pożywka LSD for interaction place of infection x culture	0,13 mm	NUR dla interakcji m.infekcji x pożywka LSD for interaction place of infection x culture	0,15 mm
NUR dla interakcji m.infekcji x odmiana LSD for interaction place of infection x variety	0,12 mm	NUR dla interakcji m.infekcji x odmiana LSD for interaction place of infection x variety	0,13 mm
NUR dla interakcji pożywka x odmiana LSD for interaction culture x variety	0,25 mm	NUR dla interakcji pożywka x odmiana LSD for interaction culture x variety	0,28 mm
NUR dla interakcji m.infekcji x pożywka x odmiana LSD for interaction place of infection x culture x variety	0,35 mm	NUR dla interakcji m.infekcji x pożywka x odmiana LSD for interaction place of infection x culture x variety	0,39 mm

Przy omawianym kryterium najmniejszą przeciętną średnicę porażenia otrzymano przy infekcji patogenem wyhodowanym na podłożu 2 /Raulin Thom/, 4 /Knope i 8 /maltosowym/, wynoszącą około 5,95-6,00 mm.

Analizując wyniki dotyczące średnicy porażenia stwierdzono, że najbardziej podatną odmianą była Pola, dla której przeciętna średnica porażenia wynosiła 12,62 mm. Najodporniejsze odmiany wśród badanych to Tarpan i Reda, dla których średnica porażenia wynosiła od 5,25-5,53 mm.

4. WNIOSKI

1. Stwierdzono istotne zróżnicowanie w tempie wzrostu grzyba *Phoma solanicola f. foveata* w zależności od stosowanego podłoża.
2. Najintensywniejszy wzrost badanego patogena stwierdzono na pożywce AGI i maltosowej, najwolniej rozwijała się kolonia patogena na pożywce Martina.
3. Najbardziej intensywne wytwarzanie zarodników przez grzyb *Phoma solanicola f. foveata* stwierdzono na pożywce AGI.
4. Największą patogenność w stosunku do bulw ziemniaka wykazał grzyb *Phoma solanicola f. foveata* hodowany na pożywce Martina, na której obserwowano najwolniejszy jego wzrost.

LITERATURA

1. Bannon E., 1975: Selective isolation of *Phoma exigua* var. *foveata* and other species of *Phoma* from soil., European Association for Potato Research - Wageningen, Abstract of Conference Dopas., 34-35.
2. Denston T., 1958: A textbook of pharmacognosy. 5th ed, London.
3. Doroskin N.A., Belskaja S.I., Popov R.A., 1978: Vlijanie istonnikov ugle-rodnovo i azotnovo pitania na rost i rozvite *Phoma solanicola* Prill et Dal. Mycol. i Fitopatol., 12/4, 310-314.
4. Działuszycki S., 1972: Tomosa, jej objawy, namnażanie i patogenność., Informator Eksportowy Polcop 23,30.
5. Ewy Z., 1976: Zarys fizjologii zwierząt., PWN Warszawa
6. Fox R.A., Dashwood E.P., 1975: Observation on the relationships between viable counts on tubersphere and soils date from tuber boiling and in-ciolema in stored tubers of gangrene /*Phoma exigua* var. *foveata*/. Gth. Thien. Confer. EAPR-Wageningen, 24-25.
7. Jellis G.I., 1975: The susceptibility of potato tuber tissues to infection by *Phoma exigua* var. *foveata*., Potato Res., 18, 116-119.
8. Jellis G.I., 1978: Determining the susceptibility of potato clones to gangrene /*Phoma exigua* var. *foveata*/. Potato Res. 21,3, 135-143.
9. Langton F.A., 1971: The development of a laboratory test for assessing potato varietal susceptibility to gangrene caused by *Phoma exigua* var. *foveata*., Potato Res. 14, 29-38.

10. Malcolmson J.F., 1958: A consideration of the species of *Phoma* which parasitise potatoes., Trans. Brit. Mycol. Soc. 41, 413-418.
11. Malcolmson J.F., 1958: Some factors affecting the occurrence and development in potatoes of gangrene caused by *Phoma solanicola* Prill. et Del., Annals of Applied Biology 46, 639-650.
12. Malec K., 1968: Mało znany sprawca choroby *Phoma foveata* Foister bulw ziemniaka., Ochrona Roślin 8, 13-14.
13. Mooi J.C., Mosch W.H.M., 1975: Identification of gangrene of potato tuber, caused by *Phoma exigua* var. *foveata* by application of thin layer chromatography., 6th. Triennial Conference EAPR-Wageningen, 26-27.
14. Pietkiewicz J.B., Jellis G.I., 1975: Laboratory testing for the resistance of potato tubers to gangrene /*Phoma exigua* var. *foveata*/, Phytopat. 83 /4/, 289-295.
15. Połczyński R., 1967: Choroba łętów i kłębów wywołana przez grzyb *Phoma foveata* względnie *Phoma solanicola*., Biul. Branż. Hodowli Roślin i Nasienn. 6, 17-20.
16. Bokova K.V., Manekova V.K., Kovaleva L.V., 1974: Die *Phoma* Fäule der Kartoffel., Arch. Phytopath. u. Pflanzenschutz, Berlin 10 /2/, 89-101.
17. Ray R.P., 1974: Eine *Phoma* - Art die Flecken an Kartoffelstengel in Indien. Verursacht. Z. Pflanzenkrank. Pflanzenschutz. 81, 6/7, 407-408.
18. Wellving A., 1975: On methods for assessing resistance of potato to storage rot: caused by *Phoma foveata* and *Fusarium coeruleum*., 6 th. Triennial Conference EAPR - Wageningen, 32-33.
19. Wilson H.M., Fox R.A., 1975: Histological observations on the host-parasite relationships in the *Phoma exigua* complex in potatoes with special reference to *Phoma exigua* var. *foveata*., 6 th. Triennial Conference EAPR - Wageningen, 30-31.
20. Wnękowski S., 1968: Gangrena - nowa choroba ziemniaków sadzeniaków., Ochrona Roślin 12, 5-8.
21. Wnękowski S., 1970: Wstępne badania nad występowaniem i biologią grzyba z rodzaju *Phoma* na bulwach ziemniaka w Polsce., Biul. Inst. Ziem., Bonin 5, 113-120.

METHIOICAL ASPECTS OF LABORATORY EVALUATION OF POTATO TUBERS REACTION
TO PHOMA SOLANICOLA F.FOVEATA

I. Groth and Pathogenicity of Phoma Solanicola F.Foveata in Relarion
to Growing Medium

Summary

The growth and pathogenicity of Phoma solanicola f.foveata were tested on nine mediums under laboratory conditions. The pathogen sporification and growth on the mediums were observed first. Then the growth of Phoma was tested on potato tubers.

The most intensive growth of the fungus was noted on agarglucosepotato medium and maltose one. Sporification of the highest intenaity occurred on agar-glucose-potato medium.

The pathogen proved to be the most effective against potato tubers when grown on the Martin medium. Under these conditions, the growth of the pathogen was the slowest.

ВЛИЯНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ И ПАТОГЕННОСТЬ ГРИБА

Резюме

В лабораторных условиях исследовано рост и патогенность гриба Phoma solanicola f.foveata, который был выращен на 9 питательных средах. На первом этапе проведено наблюдение роста и образования спор патогена на отдельных средах.

Потом был оценен паралич клубней картофеля. Установлено, что наиболее интенсивный рост Phoma solanicola f.foveata выступает на средах: агарно-глюкозо-картофельной и мальтозовой. Наиболее интенсивно образование спор выступает на агарно-глюково-картофельной среде. Самую высокую патогенность по отношению к клубням картофеля проявляет патоген выращенный на среде Martina. На этой среде наблюдался самый медленный рост.

Bronisława Sas-Plotrowska
Elwira Słowińska
Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Instytut Rolniczy ATR
ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz



Bronisława Sas - Piotrowska
Halina Lachowska
Wojciech Piotrowski

METODYCZNE ASPEKTY LABORATORYJNEJ OCENY REAKCJI BULW ZIEMNIAKA
NA PHOMA SOLANICOLA F.FOVEATA

II. Wpływ głębokości zakażenia na
porażenie bulw

Doświadczenie przeprowadzono na bulwach 6 odmian ziemniaka: Giewont, Krab, Narew, Pola, Ryś i Sowa, które infekowano strzępkami grzyba *Phoma solanicola f. foveata* na głębokość 5 i 10 mm. Ocena porażenia prowadzono mierząc największą głębokość wnikania patogena i największą średnią porażenia.

Niezależnie od kryteriów oceny, szczepienie bulw na głębokość 5 mm wywoływało nieco niższe porażenie bulw przez *Phoma solanicola f. foveata* aniżeli szczepienie na głębokość 10 mm. Dawało ono jednak większe zróżnicowanie pomiędzy badanymi odmianami.

1. WSTĘP

W poprzednim opracowaniu /8/ stwierdzono istotną zależność pomiędzy rodzajem podłoża, a patogenicznością sprawcy, którą oceniano w doświadczeniach infekcyjnych.

Zróżnicowana reakcja bulw ziemniaka na infekcję *Phoma solanicola f. foveata* uzależniona jest nie tylko od rodzaju podłoża, na którym prowadzono patogenę, ale również od innych elementów.

Badania prowadzone przez Jellisa /1/ nad zróżnicowaną odpornością na *Phoma solanicola f. foveata* tkanki miękiszowej i tkanki korowej wykazały większą podatność na infekcję tkanki miękiszu u wszystkich testowanych odmian ziemniaka.

Kranz /2/ i inni potwierdzają badania Jellisa wskazujące na większą odporność tkanki korowej na porażenie przez *Phoma solanicola f. foveata*. Stąd u odmian charakteryzujących się podwyższoną odpornością następuje lokalizacja patogena. Przy odmianach podatnych następowało szybkie rozprzestrzenianie się patogena w tkance korowej i miękiszowej, co powodowało głębsze wnikanie patogena obserwowane przy ocenie materiałów.

Do badań masowych w/g Malcolmson /4/, Pietkiewicza /7/, Malcolmson i Gray /6/ i innych stosowane są powszechnie takie metody jak:

- zanurzanie bulw w zawieszynie zarodników,
- otaczanie bulw inokulum z piaskiem,

- inokulacja punktowa bulw.

Ta ostatnia z wymienionych metod jest najbardziej rozpowszechniona, choć stosowana w różnych miejscach bulwy i na różnej głębokości.

Malcolmson /5/ w swoich testach nacięła skórkę bulwy ziemniaka w kształcie litery "V" umieszczając w tym miejscu wycięty krążek grzybni patogena z hodowli płytkowej. Jednak wyniki otrzymane przez autorkę nie były zadowalające.

Langton /3/ zmodyfikował nieco wyżej opisaną metodę. Rany robił za pomocą korkoboru o średnicy 5 mm i ograniczonej do 4,5 mm głębokości. W ranach umieszczał krążki grzybni *Phoma solanicola* f. *foveata*. Według autora stosowany przez niego sposób testowania dawał zgodne wyniki.

Jellis /1/ prowadził testowanie kilku odmian ziemniaka stosując uszkodzenia bulw:

- 1 - w tkance korowej na głębokość 2 mm,
- 2 - w tkance rdzeniowej na głębokość 10 mm.

Autor stwierdził, że szczepienie na głębokość 10 mm jest bardziej skuteczne, lepiej różnicuje badany materiał pod kątem odporności.

W celu wyboru najodpowiedniejszej głębokości szczepienia, przydatnej w testach masowych, przeprowadzono badania nad wpływem głębokości zakażenia na intensywność porażenia bulw ziemniaka przez wspomnianego patogena.

2. MATERIAŁ I METODA BADAŃ

Doświadczenie przeprowadzono na 6 odmianach ziemniaka: Giewont, Krab, Narew, Pola, Ryś, Sowa.

Materiałem infekcyjnym były strzępki grzyba *Phoma solanicola* f. *foveata* rozmnożone na pożywce agarowo - glukozowo - ziemniaczanej /AGZ/.

Bulwy wymienionych odmian dokładnie myto i odkażano denaturatem. Następnie za pomocą korkoboru o średnicy 5 mm wycinano po 2 otwory w części stolonowej i wierzchołkowej na głębokość 5 mm i 10 mm.

W otworach umieszczano krążki grzybni o średnicy 2 mm wycięte z kultur agarowych, a następnie przykrywano je wyciętymi kawałkami bulwy, zabezpieczając grzybnię przed wyschnięciem. Po inokulacji bulwy przechowywano w temperaturze nie przekraczającej 10°C. Po 40-dniowym okresie inkubacji przeprowadzono odczyt. Polegał on na mierzeniu na przekroju poprzecznym prostopadłym do miejsca infekcji

- największej głębokości wnikania patogena w mm,
- największej średnicy porażenia w mm.

Pomiary wykonano dla części stolonowej jak i wierzchołkowej. Doświadczenie przeprowadzono w terminie jesiennym w czterech powtórzeniach, stosując po 15 bulw na każdą kombinację.

Dla porównania wyników było konieczne zmniejszenie odczytu dla bulw szczepionych na głębokość 10 mm o różnicę głębokości uszkodzenia tj. o 5mm.

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie metodą analizy wariancji z pojedynczą klasyfikacją. Porównania średnich dokonano przy pomocy testu

Duncana.

3. WYNIK BADAŃ

Uzyskane wyniki badań pozwalają stwierdzić, że w większości wypadków analizowane czynniki wywierały istotny wpływ na porażenie bulw ziemniaka. Świadczą tym poniżej przedstawione dane:

Zmienność	Średnica plamy F	Głębokość wnika- nia F	Powierzcz- nia plamy F
głębokość zakażenia	4,26 ^{xx}	9,90 ^{xx}	6,14 ^x
odmiany	27,38 ^{xx}	38,38 ^{xx}	30,52 ^{xx}
miejsce infekcji	10,91 ^{xx}	3,57	8,94 ^x
interakcje:			
głębokość x odmiana	2,17	7,36 ^{xx}	3,83 ^{xx}
głębokość x miejsce infekcji	1,98	0,12	0,80
odmiana x miejsce infekcji	4,75 ^x	2,73 ^x	5,19 ^x
głębokość x odm. x miejsce infek.	2,08	0,26	0,83

Porażenie bulw ziemniaka zależało w omawianym doświadczeniu od głębokości umieszczania strzępek grzyba.

Zróżnicowanie wyników w zależności od głębokości szczepienia przedstawiało się następująco:

	średnica plamy	głębokość wnika- nia	powierzchnia plamy
szczepienie na 5 mm	6,22	6,68	42,70
szczepienie na 10 mm	6,54	7,09	47,50
różnica	0,32	0,41	4,80
NUR	0,30	0,26	3,83

Jak wynika z przytoczonych powyżej danych głębsze szczepienie wpłynęło silniej na rozprzestrzenianie się sprawcy w głąb bulw ziemniaka.

Różna reakcja użytych do stestowania odmian pozwoliła na ich następujące pogrupowanie w/g testu Duncana

Głębokość wnikania w mm		Średnica plamy w mm	
Narew	5,41 I	Narew	5,49
Ryś	6,18 I	Krab	5,83
Krab	6,69 I	Ryś	6,00
Sowa	7,16 I	Polá	6,15
Polá	7,78 I	Sowa	6,83
Giewont	8,09 I	Giewont	8,13
NUR	0,46	NUR	0,52

Przedstawione powyżej dane zdają się świadczyć, że stosując jako kryterium oceny głębokość rozrastania się patogena uzyskuje się większe zróżnicowanie odmian aniżeli przy średnicy plamy.

W wypadku jednak obu kryteriów oceny najmniej porażona była odmiana Narew, a najbardziej - odmiana Giewont. Uszeregowanie pozostałych odmian pod względem porażenia różniło się dla obu kryteriów oceny.

Dane wyjaśniające istotną dla głębokości wnikania interakcję: odmiana x głębokość szczepienia - są następujące:

Odmiany	Głębokość szczepienia		Różnica
	5,00 mm	10,00 mm	
Narew	5,39	5,44	0,05
Ryś	5,83	6,53	0,70
Krab	6,38	6,98	0,70
Sowa	6,41	7,90	1,49
Polá	7,39	8,16	0,77
Giewont	8,65	7,54	-1,11
średnia	6,68	7,09	-
NUR	-	-	0,64

Wskazują one na niejednakowo silną reakcję poszczególnych odmian na wzrost głębokości wprowadzania inokulum, jak również na odmienny kierunek tej reakcji u niektórych odmian /Giewont/. Wpłynęło to także na różne uszeregowanie odmian pod względem wrażliwości. Uszeregowanie to oraz sklasyfikowanie odmian w poszczególnych grupach jednorodnych /test Duncana/ przedstawia się następująco:

Głębokość szczepienia 5,00 mm	Głębokość szczepienia 10,00 mm
Narew I	Narew I
Ryś I	Ryś I
Krab I	Krab I
Sowa I	Giewont I
Polá I	Sowa I
Giewont I	Polá I

W przeciwieństwie do tego reakcja poszczególnych odmian na wzrost głębokości inokulacji, którą oceniano średnicą plamy, była zbliżona. Świadczy o tym tak brak istotności współdziałania pomiędzy tymi czynnikami, istotna korelacja $r = 0,769 > 0,661^{***}$ /, jak i przedstawione poniżej wyniki:

Odmiany	Głębokość szczepienia		Różnica
	5,00 mm	10,00 mm	
Narew	5,24	5,76	0,52
Krab	5,75	5,90	0,15
Pola	5,80	6,51	0,71
Ryś	6,20	5,80	-0,40
Sowa	6,25	7,39	1,14
Giewont	8,11	8,14	0,03
średnia	6,22	6,56	-

Stwierdzono także istotną zgodność wyników uzyskanych dla inokulacji na głębokość 5 i 10 mm przy ocenie wielkości porażonej powierzchni w mm^2 $r = 0,779 > 0,661^{***}$ /.

Istotność interakcji: odmiana x głębokość inokulacji - wynika z różnej relacji pomiędzy wzrostem głębokości inokulacji, a wzrostem porażenia przy zbliżonym uszeregowaniu odmian pod względem wrażliwości. Na podstawie analizy uzyskanych wyników stwierdzono ponadto, że przy wprowadzaniu inokulum na głębokość 5 mm reakcja odmian na infekcję *Phoma solanicola* f. *foveata* korelowała dla obu kryteriów oceny silnej $r = 0,823 > 0,661^{***}$ / aniżeli przy inokulacji na głębokość 10 mm $r = 0,662 > 0,661^{***}$ /.

4. WNIOSKI

Niezależnie od kryteriów oceny, szczepienie bulw na głębokość 5 mm wywołuje nieco niższe porażenie bulw przez *Phoma solanicola* f. *foveata* aniżeli szczepienie na głębokości 10 mm, daje jednak większe zróżnicowanie pomiędzy badanymi odmianami.

LITERATURA

1. Jellis G.J., - 1975: The susceptibility of potato tuber tissues to infection by *Phoma exigua* var. *f.foveata*. *Potato Res.*, 18, 116-119
2. Kranz J., - 1978: Untersuchungen über die *Phoma*, fäule der Kartoffel - knolle unter besonderer Berücksichtigung des Wirt-Parasit-Verhältnisses *Phytopathologische Zeitschrift*, 33, 153-196
3. Langton F.A., - 1971: The development of a laboratory test for assessing potato varietal susceptibility to gangrene caused by *Phoma exigua* var. *foveata*. *Potato Res.*, 14, 29-38

4. Malcolmson J.F., 1958 a: A consideration of the species of *Phoma* which parasitize potatoes., *Trans.Brit.Mycol. Soc.*, 31/4, 413-418
5. Malcolmson J.F., 1958 b : Some factors affecting the occurrence and development in potatoes of gangrene caused by *Phoma solanicola* Prill. *Delacr. Ann. Appl. Biol*, 46/4, 639 - 650
6. Malcolmson J.F., Gray E.G., - 1968: The incidence of gangrene of potatoes caused by *Phoma exigua* in relation to handling and storage. *Ann. Appl. Biol.*, 62, 89-101
7. Pietkiewicz J.B., Jellis G.J., - 1975: Laboratory testing for the resistance of potato tubers to gangrene /*Phoma exigua* var. *foveata*/. *Phytopath. Z* , 83, 289-295
8. Sas-Piotrowska B., Śliwińska E.: Metodyczne aspekty laboratoryjnej oceny reakcji bulw ziemniaka na *Phoma solanicola* f. *foveata*. I - Wpływ podłoża na wzrost i patogeniczność grzyba. *Zeszyty Naukowe ATR - Bydgoszcz* / w druku/

METHODICAL ASPECTS OF LABORATORY EVALUATION OF POTATO TUBERS REACTION
TO PHOMA SOLANICOLA F. FOVEATA

II. The Influence of the Infiltration Depth on the Contamination of
Tubers

Summary

The experiment was made on tubers of the six potato varieties: Giewont, Krab, Narew, Pola, Ryś, and Sowa which were infected with *Phoma solanicola* f. *foveata* shreds on the depth of 5 and 10 mm.

The estimation of contamination was performed by measuring the biggest depth of the patogene penetration and the biggest contamination diameter.

Independently of the estimation criteria, the inoculation of the tubers on the depth of 5 mm. evokes a slightly smaller infection with *Phoma solanicola* f. *foveata* than the inoculation on the depth of 10 mm. It gives, however, a bigger differentiation among the analyzed varieties.

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ОЦЕНКИ РЕАКЦИИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ НА

II. ВЛИЯНИЕ ГЛУБИНЫ ЗАРАЖЕНИЯ НА ПОРАЖЕНИЕ КЛУБНЕЙ

Резюме

Эксперимент проведен на клубнях 6 сортов картофеля: Giewont, Krab, Narew, Pola, Ryś и Sowa, которые инфицировано ломочками гриба *P. solanicola* f. *foveata* на глубину 5 и 10 мм. Оценку поражения проведено измеряя самую большую глубину проникания патогена и самый большой диаметр поражения.

Независимо от критериев оценки, инфицирование клубней поврежденных на глубину 5 мм вызывало меньшее поражение клубней *Phoma solanicola* f. *foveata*, чем прививка на глубину 10 мм. Дает оно однако большее дифференцирование между исследованными сортами.

Wojciech Piotrowski
Halina Łachowska
Bronisława Sas-Piotrowska

METODYCZNE ASPEKTY LABORATORYJNEJ OCENY REAKCJI BULW ZIEMNIANKA
NA PHOMA SOLANICOLA F.FOVEATA

III. Kształtowanie się porażenia
bulw w różnych terminach jego
oceny

W trzyletnim doświadczeniu laboratoryjnym oceniono kształtowanie się porażenia bulw przez *Phoma solanicola* f. *foveata* po 21, 42 i 90 dniach ich inkubacji.

Stwierdzono, że przedłużenie okresu inkubacji przyspieszało się do wzrostu przeciętnego porażenia sztucznie zakażanych bulw ziemniaka a także do wyraźniejszego zróżnicowania badanych odmian pod względem porażenia przez *Phoma solanicola* f. *foveata*.

1. WSTĘP

Bulwy są przechowywane w okresie jesienno-zimowym przez okres około sześciu miesięcy. W tym czasie po zajęciu infekcji nastąpić może tak lokalizacja patogena w tkankach i zahamowanie jego rozwoju, jak i jego dalsze rozprzestrzenianie się. Zahamowania rozwoju sprawcy spowodowane może być zadziałaniem przedlub poinfekcyjnych czynników warunkujących odporność bulw /8/ lub optymalnymi z fitosanitarnego punktu widzenia warunkami przechowywania /2/.

Przy zaistnieniu warunków korzystnych dla sprawcy rozwija się on masowo w styczniu, powodując ubytki wagowe wahające się od 20 - 30% /9/. W tym to okresie, o ile uzyska się w nim dostatecznie dobre zróżnicowanie materiałów pod względem odporności na *Phoma solanicola* f. *foveata*, winno się prowadzić badania odpornościowe.

Pietkiewicz i Jellis /6/ prowadząc ocenę porażenia bulw po 1, 2, 3 i 4 tygodniach od inokulacji stwierdzają, że zróżnicowanie badanych materiałów pod względem ich reakcji na *Phoma* sp jest po 2 tygodniach silniejsze, niż po 4 tygodniach. W przeciwieństwie do tego Langton /3,4/ uzyskał dużą powtarzalność wyników i dobre zróżnicowanie materiałów prowadząc obserwacje po 4 tygodniach. Malcolmson /5/ prowadziła natomiast odczyty po 6 tygodniach od inokulacji.

W niniejszych badaniach podjęto próbę określenia terminu prowadzenia obserwacji, w którym to możliwe jest uzyskanie najlepszego zróżnicowania

odmian pod względem ich odporności na *Phoma solanicola f. foveata*.

2. MATERIAŁ I METODA BADAŃ

Badania prowadzono w latach 1978, 1979 i 1980 odpowiednio na 13, 7, i 8 odmianach ziemniaków. Odmianami, które badano przez 3 lata były Merkur, Ronda, Janka i Sokół, a przez 2 lata - Osa, Pola i Uran.

W badaniach wykorzystano metodę inokulacji punktowych całych bulw, która została opisana w poprzednim opracowaniu /7/. Głębokość wycinanych otworów wynosiła 5 mm. Inokulację bulw prowadzono w tych latach w miesiącu styczniu, a wyniki odczytywano w trzech terminach, a mianowicie:

I termin - po 21 dniach

II termin - po 42 dniach

III termin - po 90 dniach od inokulacji.

W roku 1978 ocenę porażenia bulw przeprowadzono po 24 i 90 dniach.

Ze względu na wykorzystanie w poszczególnych latach badań różnych odmian, opracowanie statystyczne wyników przeprowadzono dla każdego roku oddzielnie.

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ

Uzyskane wyniki badań oraz ich statystyczna analiza wykazały, że stopień opanowania bulw ziemniaka przez *Ph.sol.f.foveata* zależał od długości okresu, jaki upływał od momentu inokulacji do momentu prowadzenia odczytów /tab.1/.

Tabela 1

Porażenie bulw ziemniaka w poszczególnych terminach
oceny
The infection of potato tubers in different terms
of their estimation.

Wzrost poosiowy - axial growth				
	I	II	III	NUR LSD
1978	-	8,46	9,36	0,66
1979	6,43	6,89	7,23	0,29
1980	7,80	8,45	8,82	0,31
Wzrost promieniowy - radial growth				
1978	-	8,19	9,31	0,56
1979	7,73	7,50	8,08	0,28
1980	9,00	9,20	9,50	0,33

Wskazują one, że zarówno w 1979, jak i 1980 roku przeciętne promieniowe rozprzestrzenianie się patogena w bulwach było po 42 dniach inkubacji istotnie silniejsze niż po 21 dniach. Nie zostały udowodnione różnice pomiędzy tymi terminami, gdy określano penetrację patogena w głąb bulw. Przy dalszym przedłużaniu okresu inkubacji do 90 dni obserwowano dalsze promieniowe rozprzestrzenianie się *Phoma solanicola f. foveata* w bulwach. Przeciętna średnica porażenia była w tym terminie istotnie wyższa aniżeli po 42 dniach od inokulacji. Postępowała również dalsza penetracja patogena w głąb bulw, przy czym w 1978 i 1979 roku udowodnione zostały różnice pomiędzy II i III terminem testowania, a w 1980 roku pomiędzy terminami I i III.

Istotną okazała się także reakcja odmian na infekcję *Phoma solanicola f. foveata* przy zmianie długości okresu inkubacji. Dotyczy to szczególnie różnic między wynikami odczytywanymi po 42 i 90 dniach od inokulacji. Przy opóźnieniu terminu odczytu wyników z 21 do 42 dni u niemal wszystkich odmian badanych przez dwa lata nie stwierdzono istotnych różnic w promieniowym i poosiowym rozprzestrzenianiu się patogena w bulwach ziemniaków.

Przy dalszym wydłużaniu okresu inkubacji, to jest prowadzeniu odczytów po 42 i 90 dniach, daje się zaobserwować odmienną reakcję badanych odmian na *Phoma solanicola f. foveata*. Szczególnie wyraźne różnice obserwowano w pierwszym roku badań /rys.1/.

Znacznym wzrostem porażenia bulw, mierzonym tak promieniowym, jak i poosiowym rozprzestrzenianiem się sprawcy zareagowały takie odmiany jak Merkur, Ronda i Janka, a nieco słabiej - Noteć i Tarpan. Nie zostały natomiast udowodnione różnice w stopniu porażenia bulw w tych terminach w wypadku takich odmian jak Certa, Osa, Narew, Nysa i Uran.

W drugim roku badań /rys.2/ na wydłużenie okresu inkubacji z 42 do 90 dni zareagowały odmiany Poła i Janka wzrostem porażenia bulw, mierzonego obu kryteriami, a w trzecim roku badań /rys.3/ odmiany Giewont i Poła. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w porażeniu odmian Osa, Ronda i Merkur.

Reakcja pozostałych odmian na przedłużanie okresu inkubacji była różna. Obserwowano mianowicie, że:

- szybkość rozprzestrzeniania się patogena w bulwach była w zależności od odmiany większa lub mniejsza w okresie dzielącym I i II termin aniżeli w okresie pomiędzy II i III terminem obserwacji,
- odmienna była w niektórych przypadkach reakcja bulw na *Phoma solanicola f. foveata* w różnych terminach w zależności od tego czy określono promieniowanie czy też poosiowe rozprzestrzenianie się sprawcy. Podobną reakcję obserwowano po 21 dniach od inokulacji Jelis /1/ u odmian zróżnicowanych pod względem odporności.

W celu sprawdzenia powtarzalności reakcji odmian na *Phoma solanicola f. foveata* poniżej zestawiono wyniki uzyskane dla odmian badanych przez 2 i 3 lata, zaznaczając znakiem "+" istotnie różną ich reakcją na zmianę terminu obserwacji z 42 na 90 dni:

	1978		1979		1980	
	średni- ca	głęb- kość	średni- ca	głęb- kość	średni- ca	głęb- kość
Merkur	+	+	-	-	-	-
Ronda	+	+	-	-	-	-
Janka	+	+	+	+	+	+
Sokół	+	-	-	-	+	+
Osa	-	-	-	-	nie badano	
Uran	-	-	-	-	nie badano	
Pola	nie badano		+	+	+	-

Stwierdzono, że wydłużenie okresu inkubacji polegało różnicie między odmianami bardziej wrażliwymi na *Phoma solanicola f.foveata* /Janka, Pola^x/, a odmianami pozostałymi, przy - w przeważającej większości wypadków - zgodnym ich uszeregowaniu, tak w poszczególnych terminach badań, jak i przy ocenie porażenia prowadzonej przy pomocy obu kryteriów /tab.2/.

Tabela 2

Wartości współczynników korelacji dla reakcji odmian na infekcję *Phoma solanicola f.foveata*

Coefficient of correlation for reaction of the varieties concerning *Phoma solanicola f.foveata* infection

A. Zgodność reakcji odmian w terminie badań

A. Agreement of the varieties reaction in terms of examinations

Terminy	1978	1979	1980
---------	------	------	------

Wzrost pociosowy - axial growth

I x II	-	0,948 ^{XX}	0,975 ^{XX}
I x III	-	0,650	0,986 ^{XX}
II x III	-0,019	0,789 ^X	0,980 ^{XX}

Wzrost promieniowy - radial growth

I x II	-	0,945 ^{XX}	0,968 ^{XX}
I x III	-	0,886 ^{XX}	0,990 ^{XX}
II x III	0,169	0,944 ^{XX}	0,985 ^{XX}

B. Zgodność reakcji odmian określanej dwoma kryteriami

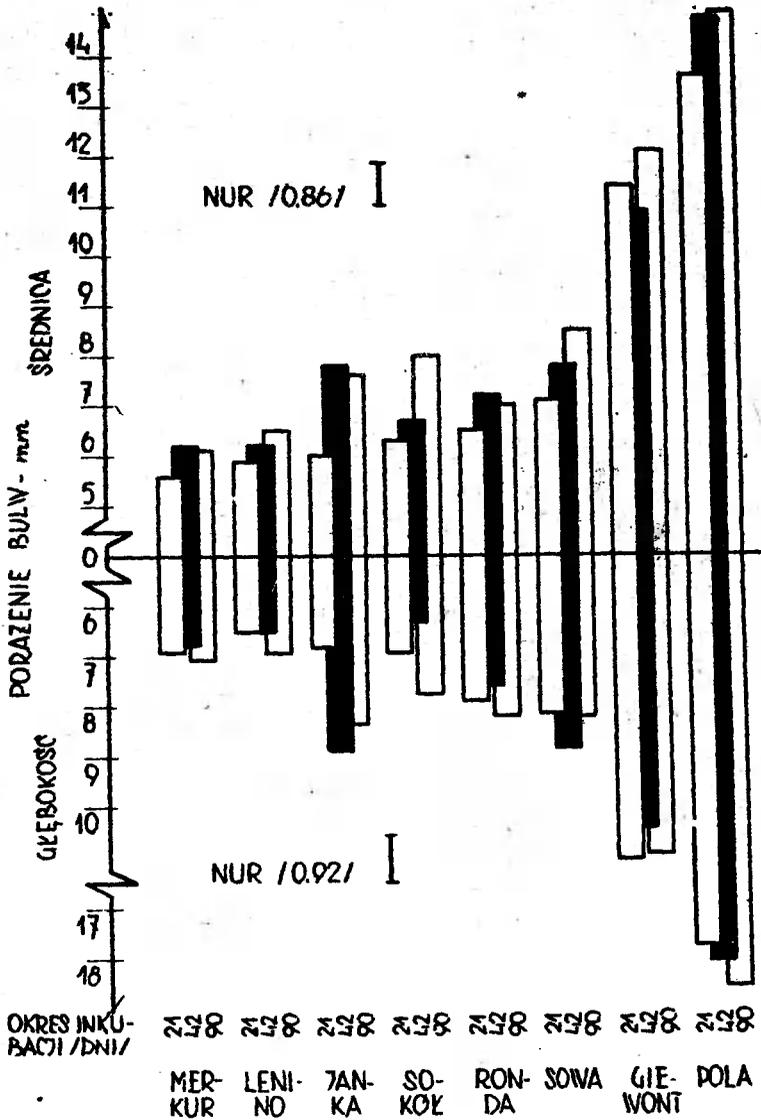
B. Agreement of the varieties reaction determination two criteria

I	-	0,649	0,955 ^{XX}
II	0,853 ^{XX}	0,876 ^{XX}	0,975 ^{XX}
III	0,852 ^{XX}	0,898 ^{XX}	0,940 ^{XX}

r graniczne

0,05	0,514	0,666	0,632
0,01	0,642	0,798	0,765

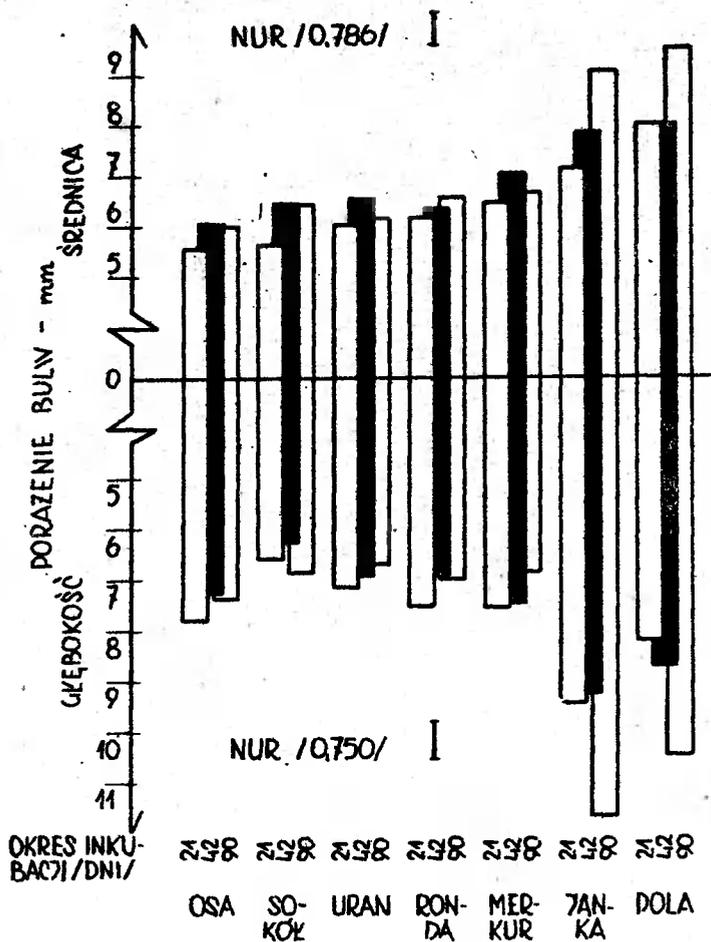
x - charakterystyka odporności odmian zrejonizowanych podana zostanie w kolejnym opracowaniu.



Rys.1. Porażenie bulw ziemniaka w terminach jego oceny w zależności od odmiany - 1978

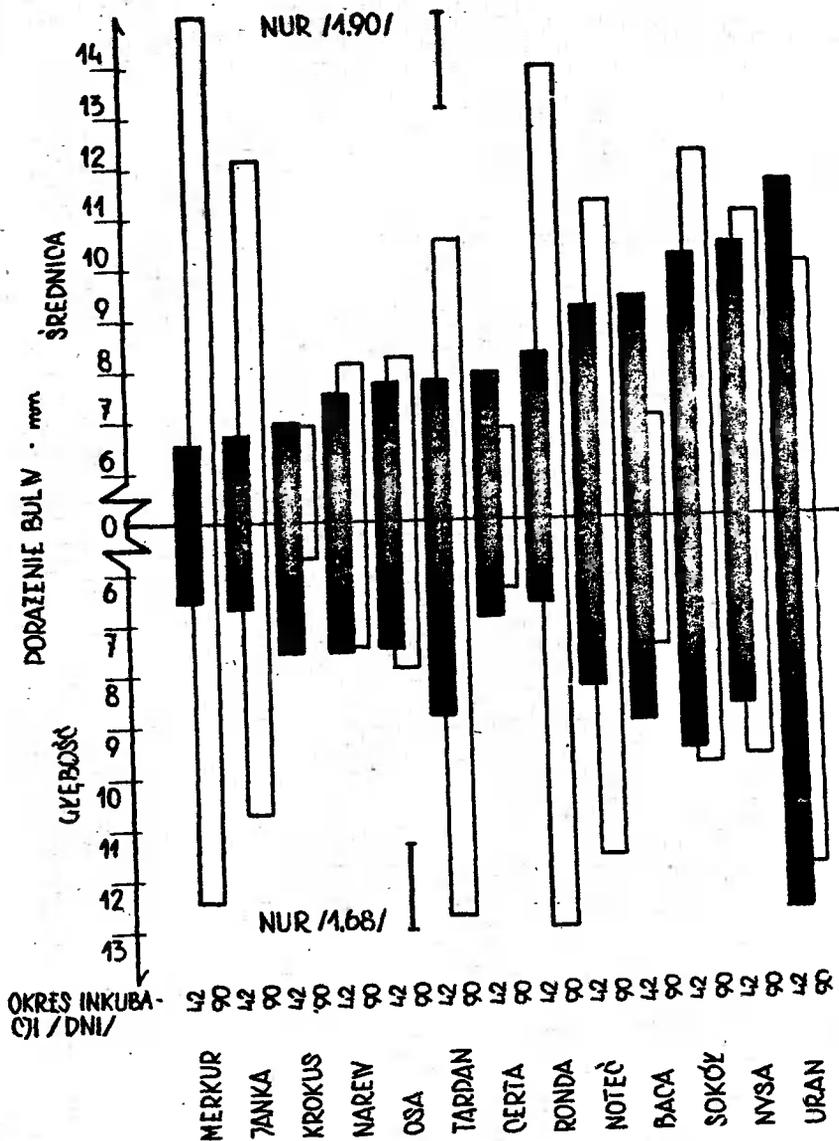
The infection of potato tubers in terms of its estimation, depending on the variety-1978

- porażenia bulw - the infection of the tubers
- głębokość - depth
- średnica - diameter
- NUR - LSD
- okres inkubacji/dni/-incubation period /days/



Rys.2. Porażenie bulw ziemniaka w terminach jego oceny w zależności od odmiany - 1979
The infection of potato tubers in terms of its estimation, depending on the variety - 1979

porażenie bulw - the infection of the tubers
 głębokość - depth
 średnica - diameter
 NUR - LSD
 okres inkubacji /dni/ - incubation period /days/



Rys.3. Porażenie bulw ziemniaka w terminach jego oceny w zależności od odmiany - 1980

The infection of potato tubers in terms of its estimation, depending on the variety-1980

- porażenie bulw - the infection of the tubers
- głębokość - depth
- średnica - diameter
- NUR - LSD
- okres inkubacji /dni/ - incubation period /days/

WNIOSKI

1. Wydłużenie okresu inkubacji przyczyniło się do wzrostu przeciętnego porażenia bulw przez *Phoma solanicola* f. *foveata*. Było ono najwyższe po 90 dniach inkubacji.
2. Reakcja poszczególnych odmian na sprawcę fomozy zależała od terminu prowadzenia obserwacji. Wydłużenie okresu inkubacji przyczyniło się do wyraźniejszego zróżnicowania badanych odmian pod względem odporności na *Phoma solanicola* f. *foveata*.

LITERATURA

1. Jellis G.J.: 1975, The susceptibility of potato tuber tissues to infection by *Phoma exigua* var. *foveata*. *Potato Res.*, 18, 116-119
2. Kubicki K., Kuźniiewicz M.: 1978, Entwicklung der Lagerfäulen /Fusarium-Trocken-, Nass-, Misch- und Phoma Fäule/ in Abhängigkeit von Sorten und Lagerungsbedingungen. *Tag.-Ber., Akad.Landwirtsch.-Wiss., DDR, Berlin*, 157; 147-150
3. Langton F.A.: 1971, The development of a laboratory test for assessing potato varietal susceptibility to gangrene caused by *Phoma exigua* var. *foveata* *Potato Res.*, 14, 29-38
4. Langton F.A.: 1972, The reliability of a laboratory test for assessing gangrene susceptibility. *Potato Res.*, 15, 226-269
5. Malcolmson J.F.: 1958, Some factors affecting the occurrence and development in potatoes of gangrene caused by *Phoma solanicola* Prill. *end Delacr.*, *Ann.Appl.Biol.*, 4, 639-650
6. Pietkiewicz J.B., Jellis G.J.: 1975, Laboratory testing for the resistance of potato tubers to gangrene /*Phoma exigua* var. *foveata*/. *Phytopath. Z.*, 83, 289-295
7. Sas-Piotrowska B., Śliwińska E.: Metodyczne aspekty laboratoryjnej oceny reakcji bulw ziemniaka na *Phoma solanicola* f. *foveata*. I. Wpływ podłoża na wzrost i patogeniczność grzyba. *Zesz.Nauk.ATR - w druku*
8. Trzebiński J.: 1970, Biochemiczne podstawy odporności roślin na choroby. *Post.Nauk Roln.*, 6, 63-80
9. Wnękowski S.: 1968, Gangrena - nowa choroba ziemniaków sadzeniaków. *Ochrona Roślin*, 12, 5-8.

METHEICAL ASPECTS OF LABORATORY EVALUATION OF POTATO TUBERS REACTION
TO PHOMA SOLANICOLA F.FOVEATA

II. The Formation of Tubers Contamination in Different Terms of Its
Evaluation

During the period of three-year laboratory research, the contamination of tubers with *Phoma solanicola f.foveata* was estimated after 21, 42, and 90 days of incubation.

It was stated that a prolongation of incubation contributes to the growth of the average contamination of artificially infected tubers as well as to a greater differentiation of the analyzed varieties in reference to the sensitivity of this pathogene.

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ОЦЕНКИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ НА

III. ОБРАЗОВАНИЕ ПОРАЖЕНИЯ КЛУБНЕЙ В РАЗНЫХ ТЕРМИНАХ ЕГО ОЦЕНКИ

Резюме

В 3-летнем лабораторном эксперименте проведена оценка образования поражения клубней *Phoma solanicola f.foveata* после 21, 42 и 90 дней их инкубации.

Подтверждено, что продолжение периода инкубации способствует росту среднего поражения искусственно зараженных клубней картофеля, а также более отчетливому разграничению исследованных сортов в отношении восприимчивости к этому патогену.

Wojciech Piotrowski
Zakład Chemii Rolnej
ul. Seminaryjna 5
85-326 Bydgoszcz

Halina Łachowska
Bronisława Sas-Piotrowska
Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
Instytut Rolniczy ATR
ul. Bernardyńska 6
85-029 Bydgoszcz

Cena zł 76,—