Z badań nad pasożytnictwem *Colletotrichum atramentarium* występującego na pomidorach

II. Badania nad patogenicznością *C. atramentarium* w stosunku do pomidorów w doświadczeniach infekcyjnych

The investigation on the parasitism of *Colletotrichum atramentarium* on tomato plants

Part. II. The investigation on the patogenicity of *C. atramentarium* in the infection experiments on tomato plants

H. JAKUBCZYK

Dotychczasowe prace omawiające występowanie *C. atramentarium* na pomidorach zreferowano pokrótce w poprzedniej publikacji na temat biologicznych właściwości *C. atramentarium*. Zagadnienie patogeniczności tego drobnoustroju w stosunku do pomidorów nie było obszerniej badane w doświadczeniach infekcyjnych. Doświadczenia infekcyjne prowadził Bewley (1922). Uzyskał on jedynie infekcję z gleby przez korzenie i zanotował rozrastanie się grzybni w łodydze do wysokości 80 cm. Objawów więdnienia części nadziemnych nie obserwował, ale stwierdził porażenie owoców. Późniejsi autorzy (Kendrick i Walker 1948; Pantidou i Schroeder 1955; Younkin i Dimock 1944), uważając *C. atramentarium* za patogena owoców pomidora określali go jako *C. phomoides*. Poza owocami infekowali liście, łodygi i korzenie pomidorów otrzymując nekrozy na tych narządach i rozrastanie się w nich grzybni nie obserwując jednak objawów więdnienia ani innego ujemnego wpływu na rozwój rośliny. Hoffmann (1959) izolatami *C. atramentarium* z ziemniaka i konopi infekował rośliny pomidorów przez opryskiwanie zawiesiną zarodników wywołując nekrozy łodyg i liści oraz w wyniku opryskiwania owoców również ich porażenie. W badaniach Williamsa, Ebena i współpracowników (1929, 1950) dokonywano zawsze infekcji roślin pomidorów przez korzenie, przy czym notowano objawy na korzeniach, z których reizolowano *C. atramentarium*.

Ponieważ, jak widać z dokonanego przeglądu, dane z literatury dotyczące objawów chorobowych na pomidorach powodowanych przez

grzyb *C. atramentarium*, a następnie przebiegu procesu chorobowego i stosunków między patogenem a rośliną są fragmentaryczne, w pracy niniejszej podjęto się wyjaśnienia drogą doświadczalną następujących zagadnień:

Porównania objawów wywoływanych na roślinach pomidorów w wyniku infekcji czystą kulturą patogena w warunkach sterylnych z objawami obserwowanymi przy infekcji naturalnej.

Wyjaśnienia, czy objawy chorobowe obserwowane na różnych częściach rośliny są wynikiem lokalnych infekcji tych właśnie części, czy też ogólnego procesu chorobowego obejmującego cały organizm zakażonej rośliny.

Wyjaśnienia, czy są różnice w patogeniczności szczepów z pomidora i ziemniaka oraz szczepów z korzenia i owoców pomidora.

Zbadania wpływu różnych sposobów infekcji na przebieg procesu chorobowego, przy czym chodziło głównie o porównanie zakażenia przez korzenie z zakażeniem części nadziemnych.

Ustalenia rozwoju patogena w roślinie i przebiegu jego chorobotwórczej działalności w czasie.

W osobnym doświadczeniu przez porównanie tempa wzrostu i przyrostów masy roślin infekowanych i kontrolnych próbowano ustalić stopień szkodliwości *C. atramentarium* dla pomidorów w określonych warunkach ich wzrostu.

Wreszcie porównywano patogeniczność *C. atramentarium* w stosunku do odmian pomidorów: szklarniowej i gruntowej.

Na wstępie badań przeprowadzono obserwacje nad mechanizmem infekcji pomidorów przez *C. atramentarium*.

METODYKA DOŚWIADCZEŃ

Dla otrzymania zarodników do sporządzenia inokulum prowadzono hodowle na pożywce 2%-glukozowo-ziemniaczanej w temp. 28°. Konidia tworzyły się najobficiej w młodych 2—4-dniowych kulturach. Inokulum przygotowywano w następujący sposób. Do szalek z młodą kulturą nalewano 1—2 ml sterylnej wody i pocierano powierzchnię kultury pędzelkiem. Zlewany płyn cedzono przez podwójną warstwę sterylnej gazy. Pomimo tego zawiesina zarodników zawierała krótkie odcinki strzępek, ale na ogół brak było w niej sklerocjów. Z otrzymanej zawiesiny sporządzano przez rozcieńczenie inokulum o żądanej liczbie konidiów w 1 ml, którą ustalano przez bezpośrednie liczenie pod mikroskopem.

Oprócz tego w celu dobrania sposobów przygotowania inokulum do zakażenia gleby hodowano *C. atramentarium* na następujących pożywkach stałych: ziarno pszenicy, otręby pszenne, plewy pszenne, plewy

owsiane, ryż, płatki owsiane i cięte łądygi pomidora. Jeżeli chodzi o łądygi pomidora, to stosowano dwa rodzaje hodowli. Najczęściej cięto je na 10—12-centymetrowe odcinki i umieszczano w probówkach, w których je sterylizowano, zaszczepiano i inkubowano oraz przechowywano po przełożeniu grzybem. Przy drugim typie hodowli cięto łądygi pomidora na 1—2-centymetrowe odcinki, których warstwę o określonej objętości umieszczano w erlenmajerkach i sterylizowano je z niewielką ilością wody. W ten sam sposób przygotowywano również pozostałe wymienione wyżej materiały. Rozwój grzyba w takiej kulturze przebiegał z różną intensywnością, zależnie od rodzaju podłoża, przy czym tworzyły się sklerocja tak na górnej, jak i na dolnej stronie pożywki.

Jako inokulum do zakażenia gleby w doświadczeniach infekcyjnych wybrano jedynie łądygi pomidora i plewy, które to materiały w czasie wyjąławiania pozostają w całości i przez to zapewniają przez dłuższy czas rozwój grzyba w glebie.

Rośliny przeznaczone do infekcji hodowano w szklarni wysiewając nasiona zaprawiane sublimatem. Siewki pikowano i wysadzano do doniczek, w których były następnie zakażane. Naczynia, w których rosły rośliny, zawsze przed użyciem dezynfekowano formaliną, ziemię parowano. Inokulowano rośliny przy pomocy rozpylacza zużywając jednakową ilość zawiesiny na jedną roślinę.

Inne stosowane sposoby infekcji podano szczegółowo w poszczególnych doświadczeniach. Zarówno rośliny inokulowane, jak i kontrolne (opryskiwane sterylną wodą) przykrywano na 2—3 dni szklanymi skrzyniami wyłożonymi wilgotną bibułą. Wolne miejsca między doniczkami wypełniano mokrymi trocinami, którymi okładano również podstawy skrzyń z zewnątrz, uzyskując wilgotność powietrza bliską 100% wilgotności względnej. Po zdjęciu skrzyń obserwowano rozwój roślin i ewentualne ich zmiany, w razie potrzeby badając powstałe uszkodzenia tkanek pod mikroskopem i przeprowadzając izolację. Po określonym czasie rośliny wykopywano i po opłukaniu korzeni badano ich stan oraz występowanie na nich sklerocjów grzyba.

Obecność grzyba w tkankach łądyg stwierdzano następującą metodą: łądygę każdej badanej rośliny pomidora starannie obmytą wodą i wytartą alkoholem cięto poczynając od szyjki korzeniowej na 10-centymetrowe odcinki, które następnie ponownie odkażano powierzchniowo przez wytarcie alkoholem i opalenie nad płomieniem. Z tych odcinków łądyg sporządzano 100 mikroskopowo cienkich skrawków, które układano na pożywce brzezkowej w szalkach Petriego. Wyrosłe kolonie grzyba obliczano procentowo i w ten sposób uzyskiwano wskaźnik występowania *C. atramentarium* w łądydze na określonej wysokości.

Przy doświadczeniach infekcyjnych w szklarni starano się uwzględnić

Wykres 1. Przebieg temperatury i wilgotności względnej powietrza w szklarni.
The course of average week temperatures and relative humidity occurring in the greenhouse during the experimental work.

1 — średnie tygodniowe wilgotności względnej powietrza z higrografu. the average weekly of the average relative humidity measured with hygrograph.	19 = 23.VIII	25 = 4.X	31 = 15.XI
2 — średnie tygodniowe wilgotności względnej powietrza w kabinie. the average weekly of the average humidity relative in the experiment cabin.	20 = 30.VIII	26 = 11.X	32 = 22.XI
3 — maksima tygodniowe wilgotności względnej powietrza z higrografu. the average weekly of maximal relative humidity measured with hygrograph.	21 = 6.IX	27 = 18.X	33 = 29.XI
4 — minima tygodniowe wilgotności względnej powietrza z higrografu. the average weekly of minimal relative humidity measured with hygrograph.	22 = 13.IX	28 = 25.X	34 = 6.XII
5 — średnie tygodniowe temperatury powietrza z termografu. the average weekly of the average temperature of the air measured with thermograph.	23 = 20.IX	29 = 1.XI	35 = 13.XII
6 — średnie tygodniowe temperatury powietrza w kabinie. the average weekly of the average temperature of the air in the experiment cabin.	24 = 27.IX	30 = 8.XI	36 = 20.XII
7 — maksima tygodniowe temperatury powietrza z termografu. the average weekly of the maximal temperature of the air measured with thermograph.			
8 — minima tygodniowe temperatury powietrza z termografu. the average weekly of the minimal temperature of the air measured with thermograph.			

37 = 27.XII	43 = 7.II	49 = 21.III	55 = 2.V	61 = 13.VI
38 = 3.I.58 r.	44 = 14.II	50 = 28.III	56 = 9.V	62 = 20.VI
39 = 10.I	45 = 21.II	51 = 4.IV	57 = 16.V	63 = 27.VI
40 = 17.I	46 = 28.II	52 = 11.IV	58 = 23.V	64 = 14.VII
41 = 24.I	47 = 7.III	53 = 18.IV	59 = 30.V	65 = 21.VII
42 = 31.I	48 = 14.III	54 = 25.IV	60 = 6.VI	66 = 18.VII

Kolejne tygodnie od inokulacji odpowiadają następującym datom:

The numbers of weeks of experimental work correspond with following dates:

warunki temperatury i wilgotności, w których znajdowały się rośliny doświadczalne. W tym celu zapisywano w kabinach, w których stały rośliny, temperaturę i wilgotność o godz 8 i 13. Poza tym w szklarni był jeden termograf i higrograf. Z danych ich zapisów za okres, w którym prowadzone były doświadczenia, wyliczono średnie dobowe (z 12) dla temperatury i wilgotności, a następnie średnie tygodniowe z tych średnich oraz maksimów i minimów dla tygodni ustalonych poczynając od dnia pierwszej infekcji, gdyż chodziło o scharakteryzowanie warunków wzrostu w kolejnych tygodniach od momentu infekcji. Ponieważ stwierdzono pewne rozbieżności między danymi dla poszczególnych kabin a otrzymanymi z przyrządów samopiszących, z porównania danych o godzinach 8 i 13 dla każdej kabiny wyliczono poprawkę do średniej dobowej i w ten sposób uzyskiwano średnią dobową dla kabiny aktualnie zajmowanej przez doświadczenie. Uzyskane średnie tygodniowe umieszczono na załączonym wykresie 1.

CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA

Badanie mechanizmu infekcji

W pierwszych dniach po inokulacji sporządzano preparaty mikroskopowe z łądy, liści i kerzeni pomidora i obserwowano pod mikroskopem zarówno proces atakowania komórek skórki tych narządów przez strzępki infekcyjne, jak i procesy obronne w komórkach żywiciela. Preparaty sporządzano ręcznie, barwiono błękitem bawełnianym w laktofenolu i oglądano w laktofenolu.

Stwierdzono silny rozwój epifityczny grzyba na powierzchni zarówno liści, jak i łądy. Strzępki przytwierdzają się apresoriami, następnie rozrastają się i tworzą skupienia wytwarzające zarodniki. Apresoria mają tendencję do przytwierdzania się w kątach między dwoma sąsiednimi komórkami skórki. Dopiero po silnym rozwoju strzępek dają się zauważyć zmiany w komórkach skórki. Jednakże proces brązowienia i nabrzmiewania błon komórkowych zachodzi dużo szybciej i powszechniej niż przebijanie błon. Ulegają tym zmianom również błony wewnątrz komórek skórki, a następnie błony sąsiednich komórek tkanki mechanicznej. Tak zmienione skupienia komórek są widoczne na zewnątrz w postaci brunatnych nekrotycznych plam. Błona komórkowa pod apresorium lekko nabrzmiewa i przyjmuje żółtawe zabarwienie. W tych miejscach następuje pod naporem strzępki infekcyjnej wyrastającej z apresorium wpuklanie się błony komórkowej do środka komórki, a później przerastanie strzępek infekcyjnych przez zmienioną błonę. Nie stwierdzono wnikania strzępek infekcyjnych przez szparki.

Gdy strzępki wnikną już do komórek skórki, zaczynają przerastać do dalszych komórek warstwy korowej i wypełniają je dość gęstymi splotami doprowadzając do ich zniszczenia. Komórek drewna strzępki nie wypełniają, przerastają one poprzez światła naczyń przechodząc do sąsiednich.

Stwierdzono szczególnie silne przerastanie strzępek przez promienie rdzeniowe o żywych, cienkościennych komórkach, przez które przedostają się całe wiązki strzępek.

Dane dotyczące mechanizmu infekcji *C. atramentarium* w stosunku do pomidora są zgodne zasadniczo z obrazem wnikania tego grzyba do tkanek ziemniaka, przedstawionym przez Schmiedeknecht'a (1956). Mianowicie zauważono podobną reakcję ze strony komórek żywiciela, to jest powstawanie wpukleń błon komórkowych. Obraz zmian w komórkach atakowanych tkanek, jak i sposób dalszego zasiedlania rośliny jest również zgodny z danymi przytaczanymi przez Hoffmanna (1959).

Badanie patogeniczności różnych szczepów

Po uzyskaniu czystej kultury grzyba wyizolowanego z korzenia pomidora, opryskano zawiesiną otrzymanych z niej zarodników kilka roślin pomidorów w warunkach laboratoryjnych. Objawy chorobowe na tych roślinach były w zasadzie zgodne z objawami notowanymi na pomidorach gruntowych z infekcji naturalnej. Obserwowano więc już w pierwszych dniach po inokulacji żółknięcie, więdnienie i zasychanie liści oraz na łodygach niektórych roślin wgłębione nekrozy, które jednak nie rozszerzały się w miarę rozwoju rośliny. Rośliny zakażone sztucznie, podobnie jak w wyniku infekcji naturalnej, wykazywały zahamowanie wzrostu. Liście opadały stale. Pomimo że rośliny zainfekowane rosły dość długo, kwiatostanów nie wykształciły, czego nie obserwuje się w warunkach naturalnych, w których ma miejsce jedynie zmniejszenie plonu owoców i przedwczesne kończenie okresu wegetacji.

U roślin zakażonych w wyniku infekcji zarówno sztucznej, jak i naturalnej występuje przede wszystkim porażenie korzeni. Objawy na korzeniach są dość różnorodne. Drobniejsze korzenie pod wpływem procesów gnilnych giną całkowicie i pozostają tylko ich szczątki. Korzenie porażone bądź ulegają zbrunatnieniu, bądź pojawiają się na nich nekrozy części korowej prowadzące do pęknięcia kory i powstawania wgłębionych ran. Na niektórych korzeniach zbrunatniała kora lekko grubieje na pewnym odcinku i ulega skorkowaceniu. Często występuje odstawanie i odpadanie części korowej od walca wewnętrznego. Wówczas warstwa korowa jest zazwyczaj przerośnięta czarnymi, drobnymi sklerocjami grzyba, których na ogół brak na korzeniach zbrunatniałych. Sklerocja

przerastają również drewno korzeni, które poza tym może przybierać fioletowe zabarwienie.

W opisywanym doświadczeniu wstępnym wystąpiło bardzo silne zniszczenie systemu korzeniowego. Z reizolacji zarówno z łodyg, jak i z korzeni roślin zakażonych otrzymano *C. atramentarium*.

W następnym doświadczeniu laboratoryjnym badano patogeniczność szczepu z korzenia w stosunku do owoców pomidora porównując objawy uzyskane w wyniku zakażenia tym szczepem z porażeniem owoców zakażonych szczepem z owoców pomidora. Owoce pomidora zdjęte z krzaka i umieszczone w wilgotnej komorze inokulowano zawiesiną zarodników wytworzonych w sztucznej kulturze. W wyniku tej inokulacji tylko w niewielkim procencie uzyskiwano obraz właściwej infekcji owocu, tj. wytworzenie się zakłęśniętej plamy pokrytej koncentrycznymi kręgami cielistych lub ciemnych punktów — złoż z zarodnikami. Na większości owoców grzyb rozwijał się jak na podłożu martwym. Stwierdzono, że szczep z korzenia jest zdolny do zakażania owoców pomidora nie w mniejszym stopniu niż szczep tego grzyba otrzymany z owocu. Przy doświadczeniach tych zauważono, że łatwiej uzyskać właściwą infekcję owoców przy zakażeniu ich zarodnikami niż sklerocjami. Następnie szczepami z owocu i korzenia zakażano rośliny pomidorów w szklarni stosując 3 różne sposoby infekcji (doświadczenie I). Zarówno pod względem obecności grzyba w łodygach (wykres 2), jak i porażenia korzeni (tab. 2) szczep z korzenia wykazywał przewagę nad szczepem z owocu.

W kolejnym doświadczeniu laboratoryjnym porównywano patogeniczność szczepów *C. atramentarium* z korzenia i owocu w stosunku do siewek pomidorów. W doświadczeniu tym siewki hodowano w probówkach następującą metodą. W probówkach umieszczono cylindry z bibuły filtracyjnej, dodano po 10 ml wody na każdą probówkę i wysterylizowano je w autoklawie. Na cylindrach umieszczono po 2 nasiona pomidorów odkażone sublimatem 1:1000. Probówki trzymano w statywie na świetle w temperaturze pokojowej. Kilkudniowe siewki inokulowano zawiesiną zarodników *C. atramentarium* wprowadzając pipetą po 1 ml zawiesiny na siewkę. Do inkubacji użyto 3 różnych szczepów z korzeni pomidora i 4 z owocu. Objawy były widoczne już po 3 dniach od momentu inokulacji, a mianowicie zbrunatnienie korzonków i brązowe plamy na łodyżkach. Po 6 dniach siewki zaczęły ginąć. W tym czasie zginęła połowa siewek zakażonych szczepem z korzenia, a zaledwie $\frac{1}{3}$ siewek zakażonych szczepami z owoców. Jednakże już po 16 dniach w obu seriach zniszczone były wszystkie siewki. Stwierdzono, że na podstawie zakażenia siewek trudno jest sądzić o różnicach w patogeniczności szczepów z korzenia i owocu.

Wykres 2. Procent izolatów *C. atramentarium* z różnych wysokości łodyg pomidorów inokulowanych różnymi sposobami. I — pomidory szklarniowe inokulowane szczepem z korzenia; II — pomidory gruntowe inokulowane szczepem z korzenia; III — pomidory szklarniowe inokulowane szczepem z owocu (Dośw. I)

Sposoby inokulacji: 1 — przez opryskiwanie zawiesiną zarodników; 2 — umieszczenie sklerocjów na łodygach; 3 — umieszczenie sklerocjów na głównym korzeniu; 4 — umieszczenie sklerocjów na korzeniach bocznych; 5 — podlanie roślin zawiesiną zarodników

Percentage of isolates of *C. atramentarium* from different heights of tomato stems. I — greenhouse tomatoes inoculated with the strain from tomato root; II — field tomatoes inoculated with the strain from tomato root; III — greenhouse tomatoes inoculated with the strain from tomato fruit.

Methods of inoculation: 1 — spraying with the spore suspension; 2 — placing of sclerotia on stems; 3 — placing of sclerotia on top roots; 4 — placing of sclerotia on side roots; 5 — watering the plants with spore suspension

W ostatnim doświadczeniu z tej serii porównywano patogeniczność szczepów *C. atramentarium* z pomidora i ziemniaka w stosunku do obu tych roślin. 17. III. zainokulowano przez opryskiwanie zawiesiną zarodników z pomidora 5 roślin pomidorów i 5 ziemniaków oraz zawiesiną zarodników szczepu z ziemniaka również po 5 roślin pomidorów i ziemniaków. Taką samą partię roślin pozostawiono jako kontrolną.

Doświadczenie zlikwidowano po 3 mies. Ziemniaki w tym czasie zarumieniały już całkowicie. Zaszkle łodygi pokryte były sklerocjami. Zauważono sklerocja na kawałkach stolonów przylegających do kłębów. Różnic między użytymi izolatami nie stwierdzono. Obecność grzyba w łodygach pomidorów zakażanych obydwoma szczepami ustalano przez izolację (tab. 1). Pod tym względem szczep z pomidora wykazywał wyraźną przewagę nad szczepem z ziemniaka. Korzenie w obu grupach były częściowo zniszczone i występowały na nich sklerocja. Można by jedynie określić ilość sklerocjów na pomidorach zakażonych inokulum z ziemniaka jako trochę mniejszą.

TABELA 1 - TABLE 1

Występowanie *C. atramentarium* w łodygach roślin pomidorów zakażonych szczepami z pomidora i ziemniaka po 3 miesiącach od inokulacji (średnia z 5)

The occurrence of *C. atramentarium* in the stems of tomato plants inoculated with strains from tomatoes and potatoes - 3 months after inoculation (average from 5)

Szczep Strain	Wys. roślin w cm Plants height in cm	Procent izolatów z łodygi na wys. cm Percentage of isolates on the height			
		10	20	30	40
Z pomidora From tomato	118,8	84	54,2	7,8	0,6
Z ziemniaka From potato	109,2	50,8	3,0	2,8	0

Wpływ różnych sposobów zakażenia na rozwój procesu chorobowego

W badaniach nad wpływem różnych sposobów zakażenia roślin pomidorów przez *C. atramentarium* na przebieg patogenezy porównywano głównie zakażenie przez korzenie i przez części nadziemne. Przy infekcji części nadziemnych stosowano albo zakażenie całej rośliny, albo wykluczano docieranie inokulum do korzeni. Umieszczano również inokulum w jednym określonym punkcie bądź korzenia, bądź łodygi. Stosowano różne sposoby wprowadzania inokulum do gleby. Sposoby infekcji opisano dokładnie w planach poszczególnych doświadczeń.

Doświadczenie I. W doświadczeniu tym inokulowano dwie odmiany pomidorów: szklarniową (Seelandia) i gruntową (Sława Nadrenii). Do inokulacji roślin odmiany szklarniowej użyto dwa szczepy grzyba: z korzenia i z owocu pomidora, przy czym grupę roślin zakażanych szczepem z korzenia (I) inokulowano 5 różnymi sposobami. Pierwsze 3 z tych sposobów zastosowano przy inokulacji roślin odmiany szklarniowej szczepem z owocu (III) i odmiany gruntowej szczepem z korzenia (II).

Szczepem z korzenia rośliny odmiany szklarniowej zakażano następującymi sposobami:

1. Przez opryskiwanie zawiesiną zarodników — 15 roślin.
2. Przez umieszczenie sklerocjów na łodydze tuż nad ziemią — 10 roślin.
3. Przez umieszczenie sklerocjów na głównym korzeniu — 10 roślin.
4. Przez umieszczenie sklerocjów na bocznych korzeniach — 10 roślin.

5. Przez wlanie zawiesiny zarodników (po 20 ml) do ziemi — 10 roślin.
6. Kontrolne — 10 roślin.

Inokulowano rośliny w fazie tuż przed kwitnięciem zawiesiną zawierającą ok. 1,5 mln zarodników w 1 ml zużywając 10 ml na roślinę. Po inokulacji rośliny trzymane w wilgotnej komorze przez 48 godz, przy średniej temperaturze 20—26°. W pierwszych tygodniach po inokulacji obserwowano jedynie szare plamki na liściach, z których izolowano *C. atramentarium*. Przebieg warunków temperatury i wilgotności w szklarni w okresie doświadczenia obrazują średnie tygodniowe zawarte na wykresie 1. Rośliny rozwijały się dobrze, nie zaobserwowano żadnego ujemnego wpływu infekcji na rozwój roślin ani skrócenia okresu wegetacji. Stan korzeni roślin i występowanie na nich sklerocjów notowano po 6 tygodniach i 3 miesiącach. Dane uzyskane z tych obserwacji zestawiono w tabeli 2. Po trzech miesiącach izolowano *C. atramentarium* z łodyg 5 roślin z poszczególnych kombinacji doświadczenia sposobem opisanym w metodyce. Wyniki obrazuje wykres 2.

Ani na podstawie porażenia korzeni, ani w oparciu o obecność grzyba w łodygach roślin nie stwierdzono istotnych różnic w podatności 2 odmian pomidorów, tj. szklarniowej i gruntowej na porażenie przez *C. atramentarium*.

Porównanie różnych sposobów zakażenia nasuwa następujące wnioski. Materiałem infekcyjnym mogą być zarówno zarodniki, jak i sklerocja. W tym doświadczeniu najsilniejsze porażenie korzeni i najintensywniejszy rozwój *C. atramentarium* w łodygach stwierdzono u roślin inokulowanych przez opryskiwanie zawiesiną zarodników. *C. atramentarium* izolowano w tym wypadku ze skrawków łodyg aż do wysokości 80 cm. Znaczniejszą ilość izolatów (30—50%) otrzymano tylko z odcinków łodyg do wysokości 25—40 cm, w wyższych partiach łodygi grzybni było coraz mniej. W wypadkach, w których korzenie i łodygi inokulowano sklerocjami, większy procent izolatów uzyskano jedynie z dolnych części łodyg (do 20 cm). Porażenie korzeni nastąpiło w wyniku wszystkich sposobów zakażenia w równym stopniu przy inokulacji przez opryskiwanie, jak i przy wyłącznej inokulacji korzeni, za to w tym ostatnim wypadku słabszy był rozwój grzyba w łodydze. Z tego doświadczenia wynioskowano również, że dla pomyślnej infekcji pomidorów tym patogenem konieczna jest obecność dużej ilości inokulum, zwłaszcza przy zakażaniu korzeni z gleby.

Doświadczenie II. W doświadczeniu tym badano obok zakażenia przez opryskiwanie roślin zawiesiną zarodników (1 wariant doświadczenia) różne sposoby zakażenia korzeni z gleby. Zwiększając ilość inokulum w porównaniu do poprzedniego doświadczenia wprowadzono do gleby zawiesinę kultury agarowej grzyba zawierającą zarodniki,

T A B Ł A 2 - T A B Ł E 2

Stan korzeni i występowanie na nich sklerocjów *C. stramentarium*
 The roots condition and occurrence of sclerotia of *C. stramentarium* on roots

Wariant doświadczenia Combination of exper.	Okres czasu od inokulacji w tygodniach Time after inoculation in weeks			występowanie sklerocjów Sclerotia occurrence
	6		12	
	stan korzeni roots condition	występowanie sklerocjów Sclerotia occurrence	stan korzeni roots condition	
I 1 *	Korzenie brunatne Roots brown	-	Korzenie zniszczone lub brunatne Roots rotted or brown	+++
II 1	Część korzeni zniszczonych lub brunat. Some roots rotted or brown	+	Jak wyżej As above	+++
III 1	Korzenie ornatne Roots brown	-	Część korzeni brunatnych Some roots brown	+
I 2	Początek brunatnienia The beginning of browning	+	Korzenie brunatne Roots brown	++
II 2	Odstawienie kory korzeni The injury of cortical layer of roots	+	Słabe zbrunatnienie Slight browning	+
III 2	Korzenie zdrowe Roots healthy	-	Część korzeni brunatnych Some roots brown	+
I 3	Korzenie zdrowe Roots healthy	+	Część korzeni brunatnych Some roots brown	++
II 3	Odstawienie kory korzeni The injury of cortical layer of roots	+	Część korzeni brunatnych i zniszczonych Some roots brown or rotted	++
III 3	Korzenie zdrowe Roots healthy	-	Korzenie brunatne Roots brown	++
I 4	Korzenie zdrowe Roots healthy	-	Część korzeni brunatnych Some roots brown	++
I 5	Lekkie zbrunatnienie Roots slight brown	+	Część korzeni brunatnych Some roots brown	+

grzybnię i sklerocja. Dokonywano tego przez maczanie w niej korzeni (2 wariant) lub podlewanie nią roślin (3) oraz umieszczanie w bryle korzeniowej kawałków łądyg pomidorów pokrytych sklerocjami (4). Wreszcie w wariacie 5 sztucznie zakażane łądygi mieszano z ziemią przed wysadzeniem roślin. Rośliny kontrolne (K) stanowiły 6 wariant doświadczenia. Uzyskane wyniki przedstawione są na wykresie 3.

Wykres 3. Procent izolatów *C. atramentarium* z różnych wysokości łądyg pomidorów zakażanych różnymi sposobami (Dośw. II)

Sposoby inokulacji: 1 — opryskiwanie zawiesiną zarodników; 2 — maczanie korzeni w zawieszynie kultury grzyba; 3 — podlewanie roślin zawiesiną z kultury grzyba; 4 — umieszczanie w bryle korzeniowej łądyg pomidora pokrytych sklerocjami; 5 — mieszanie łądyg pokrytych sklerocjami z ziemią; 6 — kontrolne

Percentage of isolates of *C. atramentarium* from different heights of tomato stems.

Methods of inoculation: 1 — spraying with spores suspension; 2 — soaking of roots in the suspension of mycelium mat; 3 — watering of plants with the suspension of mycelium mat; 4 — placing of inoculated tomato stems in contact with roots; 5 — soil mixed with inoculated tomato stems; 6 — control

Otrzymane dane nasuwają następujące wnioski: Najsilniejszy rozwój *C. atramentarium* stwierdzono w łądygach pomidorów zakażonych przez opryskiwanie zawiesiną zarodników. Korzenie roślin zostały zaatakowane poważnie w wyniku podlewania ich zawiesiną sporządzoną z kultury agarowej grzyba. Większy procent izolatów z łądygi otrzymano w wariacie 5, w którym wprowadzono do gleby kulturę grzyba na łądygach pomidorów, niż w wariantach, w których zakażono korzenie lub glebę kulturą agarową patogenu.

W wariacie 4 uzyskano bardzo znikomy rezultat, jeśli chodzi o rozwój *C. atramentarium* w łądygach zakażonych roślin. Ogólnie powodem słabego rozwoju grzyba przy wprowadzaniu go do gleby były prawdopodobnie warunki wilgotnościowe. Doświadczenie prowadzono w miesiącach letnich, inokulacji dokonano w czerwcu (warianty 1—4) i lipcu (wariant 5). Dość wysokie temperatury powietrza (maksymalna powyżej 30°) powodowały znaczne obniżenie wilgotności i wysychanie ziemi. Również początkowo zbyt wysokie, a później bardzo niskie temperatury powietrza nie sprzyjały rozwojowi grzybni.

Doświadczenie III. Porównywano w tym doświadczeniu następujące sposoby inokulacji: zakażenie części nadziemnej przez opryskiwanie zawiesiną zarodników grzyba łącznie z zakażeniem ziemi i bez dopuszczania inokulum do gleby. Ze względu jednak na zbyt niskie temperatury (poniżej 20°) w czasie trwania doświadczenia rozwój grzyba był zbyt słaby i uniemożliwił porównanie wyników. Zastosowane sposoby inokulacji powtórzono w następnym doświadczeniu, zachowano jednak numerację doświadczeń, gdyż wyniki tego doświadczenia wykorzystano przy omawianiu wpływu warunków zewnętrznych na rozwój grzyba w roślinach.

Doświadczenie IV. Celem tego doświadczenia było porównanie wszystkich stosowanych uprzednio sposobów inokulacji, a mianowicie:

1. Opryskiwanie całych roślin wraz z ziemią zawiesiną zawierającą 9 mln zarodników w 1 ml.
2. Opryskiwanie tą samą zawiesiną przy zastosowaniu kołnierzyków z papieru chroniących ziemię w doniczce.
3. Zmieszanie ziemi do wysadzania roślin z kulturą grzyba na plewach owsianych.
4. Maczanie korzeni w zawieszynie zarodników i sklerocjów.
5. Inokulowanie zawiesiną zarodników łodyg roślin na wysokości 10 cm od szyjki korzeniowej.
6. Kontrolne.

Temperatury średnie w szklarni w okresie inokulacji (19.IV) wynosiły $10-14^{\circ}$, maksymalne dochodziły do 30° . Skrzynie zapewniające wysoką wilgotność inokulowanym roślinom zdjęto po 3 dniach. U niektórych roślin opryskiwanych zawiesiną zarodników bez dopuszczenia inokulum do ziemi w miejscu dotykania kołnierzyka do łodyg wystąpiły plamy. Rośliny były dość wypłonięte ze względu na złe warunki rozwoju. Wystąpiło również *Cladosporium fulvum*. Po 3 miesiącach (15.VII) wszystkie rośliny wykopano, pomierzono, zanotowano stopień występowania sklerocjów na korzeniach i stan zdrowotny korzeni oraz dokonano reizolacji.

Występowanie sklerocjów na korzeniach: w 1 i 2 grupie stwierdzono dużo sklerocjów na korzeniach i niewiele na łodygach; w 3 choć były obecne sklerocja na korzeniach, to korzenie wyglądały dość zdrowo; w 4 grupie sklerocjów było dużo i korzenie silnie zniszczone, u kontrolnych korzenie były na ogół jasne, tylko w jednym przypadku wystąpiło niewiele sklerocjów.

Wyniki reizolacji *C. atramentarium* z łodyg pomidorów przedstawia wykres 4.

Rośliny zmierzono na początku i na końcu doświadczenia. Osłabienie wzrostu wskutek infekcji wykazywały jedynie rośliny z grupy zakażonej przez umieszczenie zawiesziny zarodników na łodydze na wysokości 10 cm

Wykres 4. Procent izolatów *C. atramentarium* z różnych wysokości łodyg pomidorów zakażonych różnymi sposobami (Dośw. IV)

Sposoby inokulacji: 1 — opryskiwanie zawiesiną zarodników; 2 — opryskiwanie zawiesiną zarodników z osłonięciem ziemi; 3 — mieszanie ziemi z kulturą grzyba na plewach; 4 — maczanie korzeni w zawieszynie kultury grzyba; 5 — inokulacja zawiesiną zarodników na wysokości 10 cm; 6 — kontrolne

Percentage of isolates of *C. atramentarium* from different heights of tomato stems.

Methods of inoculation: 1 — spraying with spores suspension; 2 — spraying with spores suspension preventing the inoculation of the soil; 3 — soil mixed with *C. atramentarium* culture on chaff; 4 — soaking of roots in the suspension of mycelium mat; 5 — placing of spores suspension on the stem, 10 cm. above the soil; 6 — control

od szyjki korzeniowej, skąd spływała ona w dół. Zastosowano ten sposób zakażenia i pomiar roślin w celu dowiedzenia się, w jakich kierunkach i na jakie odległości rozrasta się grzybnia w roślinie.

W doświadczeniu tym stwierdzono w wyniku większości sposobów zakażenia silne zniszczenie korzeni i pokrycie ich sklerocjami. Jedynie rośliny rosnące w ziemi zmieszanej z plewami owsianymi, infekowanymi sztucznie *C. atramentarium*, miały zdrowe korzenie i niewiele na nich

sklerocjów. Zastosowanie kołnierzyka nie wpłynęło na słabsze porażenie korzeni, a rozwój grzyba w dolnej części łodygi był nawet silniejszy niż u roślin opryskiwanych bez kołnierzyka, za to słabszy był rozwój grzyba w tych roślinach powyżej 20 cm. W roślinach opryskiwanych w zwykły sposób stwierdzono obecność *C. atramentarium* w łodygach w większym procencie do 30 cm (wysokość roślin w momencie inokulacji), w mniejszym do 50 cm wysokości, co sugerowałoby, że w ciągu 3 miesięcy grzyb był w stanie przerosnąć na odległość 20 cm. Dorastanie do 40 cm zanotowano w łodygach roślin zakażanych na wysokości 10 cm, co daje rozrastanie się grzyba na odległość 30 cm. Pojedyncze izolaty do wysokości 40 cm otrzymano również z roślin zakażanych przez dodanie do gleby inokulum z plew owsianych.

Jeżeli chodzi o porażenie korzeni przy inokulacji ich z gleby, to najslabsze było w wyniku wprowadzenia do gleby inokulum z plew owsianych, a najsilniejsze wskutek maczania korzeni w zawieszynie z kultury agarowej grzyba. Za to porażenie łodyg było silniejsze w pierwszym wypadku niż w drugim.

Badanie wpływu porażenia roślin na ich rozwój

W doświadczeniu V badano rozprzestrzenianie się *C. atramentarium* w łodygach i na korzeniach pomidorów w miarę wzrostu i rozwoju rośliny oraz próbowano uchwycić wpływ zakażenia roślin przez *C. atramentarium* na ich rozwój.

Doświadczenie objęło 50 roślin zakażonych przez opryskiwanie i 50 roślin kontrolnych. Pomidory odmiany Kondine Red wysadzano 24.II do wazonów wagnerowskich parafinowanych w ziemię gnojową z piaskiem (1 cz. piasku na 5 cz. ziemi) parowaną. Oznaczono maksymalną pojemność wodną ziemi użytej do napełniania wazonów — wynosiła ona 59%. Przy nasyceniu do 60% maksymalnej pojemności wodnej, woda stanowiła 33% ciężaru ziemi. W ciągu wegetacji podlewano wazon-y na wagę utrzymując wilgotność na poziomie 55% maksymalnej pojemności wodnej, aby wyeliminować możliwość wpływu zmian w wilgotności ziemi na rozwój roślin tak infekowanych, jak i kontrolnych.

Rośliny rozwijające 10—11 liść inokulowano 3.III zawiesziną zawierającą ok. 6 mln zarodników *C. atramentarium* w 1 ml, zużywając 6—7 ml na roślinę. Pozwoliło to na dobre pokrycie liści i łodyg, do ziemi w wazonie docierało tylko bardzo mało inokulum.

Ze względu na dużą ilość roślin wyłącznie rośliny inokulowane umieszczono pod szkrynią w atmosferze o wilgotności zbliżonej do 100% wilgotności względnej. Wilgotność względna powietrza w kabinie

wynosiła 73%, temperatura 15°. Skrzynie zdjęto po 3 dniach. Codziennie przy podlewaniu przestawiano rośliny kolejno na nowe miejsca w kabinie, aby uniknąć jednostronnego wpływu oświetlenia. Poczynając od 10.III co 10 dni mierzono wysokość wszystkich roślin. Przy pierwszym pomiarze stwierdzono, że rośliny inokulowane są wyższe od kontrolnych, a przy tym bardziej wyrównane we wzroście. Możliwe, że przyczyną tego było wyciągnięcie się roślin inokulowanych pod skrzyniami w warunkach wysokiej wilgotności. W chwili inokulacji prawie wszystkie inokulowane rośliny miały już pąki kwiatowe, a kontrolne w mniejszości.

Na liściach zakażanych widoczne były plamy po wyschniętych kropkach inokulum, ale nie zauważono plam w wyniku rozwoju grzybni jak w poprzednich doświadczeniach. Natomiast na 12 roślinach spośród inokulowanych zauważono na łodygach i ogonkach liściowych cokolwiek wgłębione, wydłużone w kierunku długości pędu, w środku jasnoszare, po brzegach ciemne, jakby zeschnięte plamy. Z plamy takiej reizolowano *C. atramentarium* (w 6 wypadkach na 30). Poza tym na ogonku liściowym z plamą, po włożeniu go do wilgotnej komory, stwierdzono zarodnikowanie *C. atramentarium* zarówno na plamie, jak i na zielonej jego części w pewnej odległości od plamy.

Stopniowo zwiększano wagę wazonów przy podlewaniu ze względu na przyrost masy rośliny. Po 4 tygodniach wykopano 15 roślin kontrol-

TABELA 3 - TABLE 3

Porównanie roślin inokulowanych (I) i kontrolnych (K) pod względem wysokości, masy, plonu owoców i występowania *C. atramentarium* w łodygach oraz porażenia korzeni w miarę upływu czasu od inokulacji
The inoculated plants (I) and the control ones (K) as compared with the height, weight, crops, occurrence of *C. atramentarium* in stems and roots injury

Okres czasu w tyg. Time in weeks	Wysokość w cm Height in cm		Świeża masa w g Fresh matter/g/		Plon owoców w g Crops in g		Procent izolatów na wysokości cm Percentage of isolates on the stem height in cm				Porażenie korzeni roślin inokulowanych The condition of roots of the inoculated plants
	I	K	I	K	I	K	I		K		
							5	10	5	10	
4	62,02	55,08	137,29	117,74	-	-	10	7,5	0	0	korzenie zdrowe Roots healthy
8	110,3	105,7	297,0	299,0	-	-	21	8,8	0	0	Początek zbrunatnie- nia Beginning of the browning
12	126,8	128,9	730,0	711,0	404,0	386,0	59	41	3	9	Sklerocja występują Sclerotia occur
16	130,2	152,2	398,0	436,0	615,0	659,0	74	42	1	0	Liczne sklerocja Numerous sclerotia

nych i 15 roślin inokulowanych, z których po 5 przeznaczono do reizolacji, a po 10 do oznaczania suchej masy roślin dla porównania roślin inokulowanych i kontrolnych.

Dokonano również pomiaru wysokości wykopanych roślin, obserwacji stanu korzeni i kontroli występowania *C. atramentarium* w łodygach przez reizolację. Podobnie postępowano — wykonując pomiar, ważenie, ocenę porażenia korzeni i reizolację z łodyg — z roślinami wykopywanymi po 4 spośród inokulowanych i kontrolnych, kolejno po 8, 12 i 16 tygodniach. Wyniki tych badań zestawiono w tabeli 3 i na wykresie 5.

Wykres 5. Procent izolatów *C. atramentarium* z różnych wysokości łodyg w zależności od czasu

Percentage of isolates of *C. atramentarium* from different heights of tomato stems depending on the time

Tabela nie zawiera pełnej oceny stanu roślin kontrolnych, trzeba więc dodać, że u roślin kontrolnych notowano pewne, aczkolwiek słabe zbrunatnienie korzeni i w sporadycznych wypadkach na nich sklerocja. Otrzymano również z jednej rośliny kontrolnej, w partii badanej po 3 miesiącach, reizolaty *C. atramentarium* z łodygi na wysokości 20 cm w ilości 9.

Charakterystyka warunków wilgotnościowych i temperatur
w szklarni w ciągu doświadczenia

Marzec (47—50 tygodnie na wykresie 1). Temp. średnie poniżej 20° , maksymalne do 24° , minimalne do 8° , wilgotność 70—80%.

Kwiecień (51—54). Temperatury średnie poniżej 18° , maksymalne do 24° , minimalne do 5° , wilgotność powyżej 75%.

Maj (55—59). Temp. średnie poniżej 20° , maksymalne do 33° , minimalne do 14° , wilgotność powyżej 70%.

Czerwiec (60—63). Temp. średnie 18 — 22° , maksymalne do 31° , minimalne do 10° , wilgotność średnia powyżej 65%, minimalna do 30%.

Wyniki tego doświadczenia wskazują na wyraźne postępowanie procesów chorobowych w korzeniach pomidorów i rozwój *C. atramentarium* w łodygach w miarę upływu czasu od inokulacji. Dopiero po upływie 3 miesięcy notuje się znaczniejszy rozwój grzyba. Od tego właśnie momentu zaczynają występować różnice w rozwoju roślin infekowanych i kontrolnych. Różnice wysokości i masy pomiędzy roślinami zakażonymi i kontrolnymi uwidoczniły się jedynie w ostatnim terminie kontroli, po upływie 4 mies. od inokulacji.

Wpływ zakażenia przez *C. atramentarium* roślin pomidorów na ich rozwój w tym doświadczeniu wyraził się pewnym przyspieszeniem zakończenia wegetacji przez porażone rośliny wskutek osłabienia ich rozwoju w ostatnim miesiącu.

Wpływ warunków zewnętrznych na rozwój patogenu i choroby

Porównując rozwój *C. atramentarium* w łodygach oraz postępowanie procesów chorobowych na korzeniach pomidorów w wyniku zakażenia roślin przez opryskiwanie zawiesiną zarodników w różnych doświadczeniach (tab. 4 i wykres 6) i uwzględniając różnice w warunkach zewnętrznych możemy wysnuć pewne wnioski na temat wpływu tych warunków na przebieg procesów chorobowych.

W bardzo podobnym stopniu porażenie korzeni i rozwój grzyba w łodygach roślin stwierdzono w doświadczeniach II, IV i w osobnym doświadczeniu opisanym na końcu doświadczeń omawiających badanie patogeniczności różnych szczepów, oznaczonym na wykresie jako doświadczenie VI.

Z porównania warunków temperatury i wilgotności w szklarni w ciągu tych doświadczeń wynika, że były one zbliżone. Temperatury średnie nie przekraczały na ogół 20° , ale maksymalne w pewnych okresach sięgały do 30° , wilgotność zaś utrzymywała się ok. 80%. Za to w wy-

TABELA 4 - TABLE 4

Porównanie porażenia korzeni roślin inokulowanych przez opryskiwanie w różnych doświadczeniach
 The comparison of root injury of plants inoculated by spraying in different experiments

Dośw. Exper.	Czas od inokulacji w mies. Time after inoculation in mo.	Stan korzeni Roots condition	Występowanie sklerocjów Sclerotis occurrence
I	1,5 3	Początek zbrunatnienia - The beginning of browning Korzenie brunatne - roots brown	+ ++
II	2	Początki brunatnienia - The beginning of browning	+
III	3	Korzenie słabo brunatne - Roots slight brown	-
IV	3	Korzenie brunatne - roots brown	+++
V	2	Początek brunatnienia - The beginning of browning	-
	3	Brunatnienie postępuje - The browning develops	+
	4	Część korzeni brunatnych - Some roots brown	++
VI	3	Korzenie częściowo zniszczone - roots partly rotted	+++

Wykres 6. Procent izolatów *C. atramentarium* z różnych wysokości łodyg pomidorów po 3 miesiącach od inokulacji przez opryskiwanie zawiesiną zarodników w doświadczeniach I, II, III, IV i V a, oraz po 4 miesiącach w doświadczeniach V b i VI

Percentage of isolates of *C. atramentarium* from different heights of tomato stems 3 months after the inoculation with spores suspension in different experiments:
 I — V a, and V b — VI after 4 months

padku doświadczenia III, w którym rozwój patogenu był szczególnie słaby, temperatury w ogóle nie przekraczały 20°. W doświadczeniu zaś I o wyjątkowo znacznym rozwoju grzyba warunki były szczególnie sprzyjające, gdyż temperatury mieściły się przeważnie w granicach 20—25°, a maksymalne powyżej 30°, wilgotność z nielicznymi spadkami utrzymywała się przeważnie ok. 80%.

W doświadczeniu V warunki nie odbiegały od warunków doświadczenia VI, gdyż doświadczenia te trwały mniej więcej w tym samym czasie. Słabsze porażenie roślin w doświadczeniu V jest prawdopodobnie wynikiem intensywniejszego wzrostu roślin w tym doświadczeniu, gdyż rosły one w dużych wazonach i były stale jednakowo podlewane. Rośliny z doświadczenia VI rosły w mniejszych doniczkach, co nie zapewniało im dobrych warunków wzrostu.

W ten sam sposób mniej więcej grupują się wyniki omawianych doświadczeń pod względem porażenia korzeni po 3 miesiącach (tab. 4). Najsilniejsze zniszczenie korzeni i występowanie na nich sklerocjów zanotowano w doświadczeniach I, IV i VI, a najslabszą zgniliznę korzeni i brak sklerocjów w doświadczeniu III.

Badanie patogeniczności *C. atramentarium* w stosunku do pomidorów w polowych doświadczeniach infekcyjnych

Rośliny w tych doświadczeniach wysadzano po 6 na poletku przeznaczając po 3 poletka rozmieszczone losowo na każdy sposób zakażenia. Zastosowano następujące sposoby inokulacji: 1. maczano korzenie roślin przed wysadzeniem w zawiesinie sklerocjów z kultury, 2. przy wysadzeniu roślin umieszczano w bryle korzeniowej kawałki łądyg pomidora, na których hodowano *C. atramentarium*.

W drugim doświadczeniu prowadzonym w następnym roku plewy owsiane i kawałki łądyg pomidora porośnięte w warunkach sterylnych *C. atramentarium* zmieszano w proporcji 400 g na 1 kg ziemi sterylizowanej w autoklawie. Inkubowano tę ziemię w warunkach dużej wilgotności przez 3 dni i tak przygotowane inokulum wprowadzono do gleby przy wysadzeniu roślin przeznaczając 200 g pod roślinę. Badanie mikroskopowe przygotowanego inokulum wykazało silniejsze zarodnikowanie *C. atramentarium* w ziemi zmieszanej z łądygami pomidora.

Rośliny rosły od maja do października. W obu doświadczeniach nie stwierdzono objawów na nadziemnych częściach roślin i nie zauważono wpływu na ich rozwój. Rośliny rozwijały się normalnie, dały dobry plon i nawet nie stwierdzono wcześniejszego zakończenia wegetacji. Po wykopaniu roślin badano stan korzeni i przeprowadzano izolację z łądyg do wysokości 10 cm. Wynik izolacji we wszystkich wypadkach był znikomy.

Rozwój *C. atramentarium* w kulturze (a prawdopodobnie w roślinach również), pomimo starannej dezynfekcji powierzchniowej łodyg, był tłumiony przez inne grzyby porastające dolne części łodygi. Stwierdzono gatunki z rodzaju *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. i inne. Dość duży procent izolatów *C. atramentarium* otrzymano również z roślin kontrolnych.

Jeżeli chodzi o porażenie korzeni, to korzenie roślin kontrolnych były również zbrunatniałe i pokryte niewielką ilością sklerocjów. Korzenie roślin infekowanych były silnie zniszczone i miały dużo sklerocjów. Ogólnie silniej porażone były korzenie roślin zakażanych przy użyciu łodyg pomidora. Jednakże stwierdzono duże różnice stopnia porażenia między poszczególnymi potwórzeńiami w obu kombinacjach. W drugim doświadczeniu wyraźnie stwierdzono, że najsilniej porażone były rośliny z różnych kombinacji z kontrolnymi włącznie w powtórzeniach leżących w jednym pasie. Albo wchodziła tu w grę obecność *C. atramentarium* w tej części poletek w glebie, chociaż oba doświadczenia prowadzone były na różnych polach, na których ani ziemniaki, ani pomidory nie były uprzednio uprawiane, albo warunki glebowe na tych poletkach były mniej korzystne dla roślin, a sprzyjały rozwojowi inokulum.

Doświadczenia te jednakże pozwoliły na stwierdzenie, że w uprawie polowej możliwe jest nagromadzenie się w glebie na resztkach roślinnych inokulum tego grzyba i zakażanie przez niego korzeni roślin, chociaż w normalnych warunkach wzrostu roślin porażenie korzeni nie wpływa szkodliwie na ich rozwój.

DYSKUSJA

Dla zajęcia zdecydowanego stanowiska w sporze dotyczącym stopnia zdolności pasożytniczych i patogeniczności *C. atramentarium* wydaje się konieczne dokładne przeanalizowanie zdolności pasożytniczej tego mikroorganizmu w oparciu o charakterystykę tej właściwości dokonaną przez G ä u m a n n a (1949).

G ä u m a n n (l. c.) rozpatrując właściwości składające się na zdolność pasożytniczą wymienia: powinowactwo, agresywność i patogeniczność. Powinowactwo *C. atramentarium* w stosunku do pomidora jest losowe, gdyż grzyb występujący w glebie w formie przetrwalnikowej na szczątkach roślin oczekuje zjawienia się w swoim zasięgu korzeni pomidora.

Decydujące znaczenie ma agresywność, która w wypadku *C. atramentarium* będącego biotrofem warunkuje patogeniczność. Spróbujmy ustalić stopień agresywności *C. atramentarium* w stosunku do pomidora, rozpatrując kolejno składające się na nią czynniki w ujęciu G ä u m a n n a.

C. atramentarium ma pełną zdolność infekowania korzeni i łodyg

pomidora, przy czym udaje się mu przezwyciężyć reakcje obronne żywiciela, zasiedlać rośliny i korzystać z nich jako źródła pokarmu. Jest w stanie rozmnażać się i wytwarzać sklerocja na tkankach tych roślin. Nieskomplikowany cykl rozwojowy patogenu realizuje się w powiązaniu z pomidorem. Z omówienia czynników składających się na tę właściwość wynika, że *C. atramentarium* wykazuje pełną agresywność w stosunku do pomidora.

Ostatnia cecha — patogeniczność, objawiająca się szkodliwością dla rośliny-żywiciela, zależy w bardzo dużym stopniu od reakcji rośliny w powiązaniu z warunkami środowiska. Dotyczy to zwłaszcza takich objawów jak wędnięcie części nadziemnych. Ogólnie patogeniczność jego jest raczej słaba. Dla bardziej szczegółowego rozpatrzenia i obrazowego scharakteryzowania tej cechy w stosunku do pomidorów, konieczne jest uwzględnienie powiązań organizmu chorobotwórczego z rośliną-żywcielem i oddziaływania na ten układ warunków środowiska oraz zależność od innych drobnoustrojów spotykanych w środowisku. Proponowane ujęcie ułatwia również omówienie patogeniczności tego grzyba w stosunku do poszczególnych części rośliny pomidora.

C. atramentarium jest pasożytem fakultatywnym. Niezależnie jednak od zdolności saprofitycznego rozwoju na resztkach roślinnych w glebie, może on raczej znaleźć środowisko bytowania i pokarm mniej dostępny dla najliczniejszych konkurentów tylko w żywych roślinach i to dość żywotnych, ponieważ cechuje go duża wrażliwość na działanie antagonyistyczne innych drobnoustrojów glebowych.

Najłatwiejsze do opanowania dla organizmów, przechodzących od saprofitycznego trybu życia do pasożytnictwa, są części rośliny z bogatym zasobem substancji odżywczych znajdujące się w stanie osłabienia czynności życiowych, a więc organy spichlerzowe i owoce. Pomimo że *C. atramentarium*, jak wiele gatunków mu pokrewnych, jest zdolny do powodowania antraknozy owoców, to jednak analiza jego występowania na owocach pomidorów (Jakubczyk 1961) wskazuje, że gatunek ten nie wytrzymuje konkurencji z innymi grzybami, tak licznie zasiedlającymi owoce pomidora, i na owocach spotyka się go dość rzadko. Nie wydaje się, aby porażenie owoców stanowiło konieczny etap w cyklu rozwojowym grzyba, chociaż ze względu na łatwość zarodnikowania na tym substracie, wytwarzane masy zarodników mogą odgrywać pewną dość znaczną rolę w nagromadzeniu inokulum. Można przypuścić, że rozsiewające się z tych owoców zarodniki szczepów, bądź co bądź najbardziej przystosowanych do rozwoju saprofitycznego, kiełkują i rozwijają się jesienią na obumierających już resztkach roślin pomidorów i powodują tym silniejsze opanowanie ich przez grzyba i pokrycie sklerocjami, co zwiększa ilość przetrwalnikowych form grzyba w glebie.

Grzyb ten jest tak wyraźnie powiązany z glebą jako środowiskiem bytowania, że może to po części tłumaczyć, iż nie najłatwiej mu było trafić właśnie na owoce. Najbardziej dostępne dla organizmów glebowych są delikatne młode tkanki siewek. *C. atramentarium* przy sztucznej infekcji siewek wykazuje silną patogeniczność, ale bardzo trudno wyizolować go z siewek ginących w warunkach naturalnych. Najczęściej siewki są atakowane przez *Fusarium* sp., a nawet w dużym procencie przez *Rhizopus* sp., z którymi *C. atramentarium* widocznie nie wytrzymuje współzawodnictwa. Własny mechanizm infekcji umożliwia mu infekowanie zdrowych korzeni pomidora i wrastanie do wnętrza rośliny. Przy porażeniu korzeni towarzyszą *C. atramentarium* różne gatunki *Fusarium* i inne grzyby, których skład gatunkowy został scharakteryzowany w badaniach Williamsa, Ebena i współpracowników. Jednak wśród tych organizmów *C. atramentarium* wykazuje najsilniejszy stopień pasożytnictwa i wydaje się, że jest tym organizmem, który pierwszy atakuje zdrowe korzenie i toruje drogę organizmom współtowarzyszącym.

Korzenie, przez które grzyb wnika, zostają silnie zniszczone. W łodygach pomidora *C. atramentarium* może rozwijać się przez czas dłuższy bez szkody dla rośliny. Przy infekowaniu łodyg, a szczególnie liści, zwraca uwagę obfity i długotrwały rozwój epityficzny na ich powierzchni, przy którym następuje zarodnikowanie przed wnikiem do komórek gospodarza. Widocznie organy te stawiają pasożytowi dość duży opór i mikroorganizm musi się silnie rozwinąć, aby zebrać siły do przełamania tego oporu i wnिकnięcia do wnętrza tkanek, dlatego widocznie ważna jest obecność dużej ilości inokulum w jednym miejscu rośliny. Przy rozwoju na powierzchni łodyg i liści tworzą się zarodniki mogące stanowić źródło dalszych infekcji.

Szkodliwość *C. atramentarium* dla pomidorów polega głównie na niszczeniu ich systemu korzeniowego i zakłócaniu przez to gospodarki wodnej. Zniszczenie to zaczyna być istotne w okresie, gdy zapotrzebowanie rośliny na wodę silnie wzrasta. Jednakże dla wystąpienia nieodwracalnych objawów wędnięcia i w ich wyniku obumierania i zaschnięcia rośliny konieczne jest współdziałanie warunków zewnętrznych wpływających na wzrost roślin. Zagadnienie zgnilizny korzeni w okolicach suchych i różnorodność czynników wpływających na porażenie korzeni w takich warunkach oraz na wystąpienie objawów wędnięcia, jak również wzajemne powiązanie między nimi, naświetla bardzo wyczerpująco i wielostronnie Bremer (1954). Wydaje się, że takie ujęcie zagadnienia jak najbardziej odpowiada przebiegowi tych procesów w wypadku porażenia pomidorów przez *C. atramentarium*.

Bremer nie uwzględnia zupełnie obecności grzyba w łodydze rośliny.

ny, jedynie porażenie korzeni. W miarę jak wzrasta zasiedlenie tkanek łodygi przez grzybnie i pobieranie przez nią pokarmów oraz jej destruktywna działalność na komórki, musi się potęgować ujemny wpływ tych procesów na rozwój rośliny. Niszczenie części korowej łodygi i zużywanie pewnej części związków pokarmowych służących do zaopatrywania korzeni wzmaga osłabienie tych ostatnich i zahamowanie regeneracji systemu korzeniowego.

Dane zawarte w poprzedniej publikacji na temat biologii patogena i powyższe rozważania co do jego szkodliwości dla roślin stanowią przesłanki do opracowania pewnych sposobów zwalczania tego grzyba. Główne źródło infekcji — resztki roślinne trafiające do gleby — sugeruje przede wszystkim zwrócenie uwagi na unikanie nagromadzenia ich w glebie. W tym celu trzeba przestrzegać niszczenia resztek roślinnych i odkażania gleby w szklarniach. W związku z tym, że *C. atramentarium* jest bardzo rozpowszechniony na polach, na których uprawia się ziemniaki, a liczni autorzy stwierdzili łatwość przechodzenia *C. atramentarium* z innych roślin na pomidory, wpływa konieczność przestrzegania płodozmianu przy uprawie polowej i przy braniu ziemi do szklarni z pola. W wypadku gdy stwierdzi się już obecność grzyba w glebie, w której uprawia się pomidory, szczególnie przy uprawie pod szkłem, ważne jest odpowiednie zaopatrywanie roślin w wodę, aby zapewnić jak najlepszy rozwój ich korzeni i nie dopuścić do zakłócenia gospodarki wodnej w roślinie. Wreszcie, już jako zabiegi zwalczające można stosować np. wyściełanie ziemi między roślinami torfem, czy inne sposoby sprzyjające regeneracji systemu korzeniowego (G i e r a s i m o w i O s n i c k a 1958).

Na zakończenie zasługuje jeszcze na podkreślenie fakt, że w wielu wypadkach więdnienia pomidorów w szklarniach, które się coraz powszechniej przypisuje *C. atramentarium*, rośliny pomimo występowania na nich tego grzyba są dodatkowo porażane głównie przez różne gatunki z rodzaju *Fusarium* oraz w mniejszym procencie również przez *Sclerotinia libertiana* i *Didymella lycopersici*. Bardzo interesujące jest zagadnienie, jaki jest współudział *C. atramentarium* w takich infekcjach mieszanych i o ile istotnie wpływa on na przebieg choroby. Szczególnie ciekawe byłoby zbadanie wzajemnych związków między drobnoustrojami przy infekcji mieszanej *C. atramentarium* i gatunków *Fusarium*, gdyż obserwowano wyjątkowo częste wspólne występowanie tych gatunków.

WNIOSKI

1. Chociaż *C. atramentarium* powoduje infekcje lokalne, to jednak może rozrastać się wewnątrz tkanek na pewne odległości, np. przerastać z korzeni do łodyg i w przeciwnym kierunku.

2. Źródło infekcji może stanowić inokulum nagromadzone na porażonych resztkach roślinnych pozostających w glebie lub na jej powierzchni, przy czym zakażenie występuje równie dobrze przy bezpośrednim zetknięciu się materiału stanowiącego źródło infekcji z organami rośliny, jak również przez przenoszenie się zarodników.

3. Zawsze ulegają porażeniu korzenie i łodygi roślin.

4. Różne sposoby zakażenia części nadziemnych rośliny i formy, w jakich wprowadzono inokulum do gleby lub na korzenie, wpływa na różną intensywność rozwoju *C. atramentarium* w korzeniach i łodygach pomidorów. Na ogół najsilniejszy rozwój grzyba w roślinie notowano w wyniku inokulacji całych roślin przez opryskiwanie zawiesiną zarodników. Zakażenie korzeni bezpośrednio lub przez glebę prowadzi zazwyczaj do słabszego rozwoju grzyba w łodygach roślin.

5. Duży wpływ na stopień rozwoju patogena w roślinie ma ilość inokulum zgromadzonego w bezpośredniej styczności z jej organami. Jest to istotne, zwłaszcza w przypadku zakażenia przez glebę. Najpomyślniej zachodzi infekcja, gdy zostanie zgromadzona na pewien czas duża ilość inokulum, nawet w jednym punkcie rośliny.

6. W wyniku zainfekowania roślin pomidorów przez *C. atramentarium* następuje zawsze zniszczenie korzeni i w mniejszym lub większym stopniu rozwój grzyba w łodygach.

7. Na zainfekowanych liściach i łodygach powstają nekrozy, które mogą doprowadzić do zniszczenia tych organów jedynie w warunkach bardzo wysokiej wilgotności względnie w przypadku zaatakowania b. młodych tkanek rośliny.

8. Na zainfekowanych owocach pomidora pojawiają się plamy antraknozowe i rozwija się zgnilizna mięszu. Infekcja owoców następuje w przypadku istnienia zewnętrznego źródła infekcji w czasie dorastania i dojrzewania owoców. Nie wydaje się prawdopodobne wrastanie *C. atramentarium* z łodyg do owoców.

9. Szczep *C. atramentarium*, wyizolowany z owocu pomidora, jest w stanie infekować korzenie i łodygi roślin, chociaż rozwój w nich tego szczepu jest słabszy w porównaniu do rozwoju szczepów wyizolowanych z tych narządów. Szczep tego drobnoustroju wyizolowany z korzenia pomidora wywołuje objawy porażenia na owocach.

10. Na zakażenie pomidorów przez *C. atramentarium* i dalszy rozwój procesu chorobowego mają bardzo duży wpływ temperatura i wilgotność, szczególnie od tych czynników zależy zarodnikowanie i kiełkowanie zarodników grzyba.

11. Sporadycznie w czasie prowadzenia doświadczenia infekcyjnego obserwowano osłabienie wzrostu roślin. Należy przypuszczać, że więdnienie części nadziemnych roślin pomidorów występuje w przypadku szcze-

gólnie niekorzystnych warunków wzrostu roślin porażonych przez *C. atramentarium*.

12 Rozwój *C. atramentarium* w roślinach pomidorów, w warunkach raczej pomyślnych dla roślin, przebiega stosunkowo wolno, również proces niszczenia korzeni trwa parę miesięcy (2—3). Stąd też ujemny wpływ infekcji przez tego patogena uwidacznia się dopiero pod koniec wegetacji i najczęściej polega na zniszczeniu systemu korzeniowego, na osłabieniu wzrostu i na przedwczesnym obumieraniu roślin.

Pracownia Fitopatologiczna

Zakładu Ekologii PAN

Kierownik prof. dr J. Kochman

(Wpłynęło: 22.11.1961)

SUMMARY

The aim of this work was to investigate in infection experiments the pathogenicity of *Colletotrichum atramentarium* in tomato.

Observations of the mechanism of infection showed that *C. atramentarium* penetrated into the leaves, the shoots, and the roots of tomato even when the tissue was undamaged; it overpowered the resistance of the plant manifested by the swelling and the browning of the tissue, and the bulging of cell walls. Inside the stems and the roots the fungus occupied mainly the cortical parts where it could form spores or sclerotia; it occurred less abundantly in the conductive vessels penetrating to the core through the medullary rays.

Experiments were carried out to check the pathogenicity of the fungus isolated from various organs, in particular from the roots and the fruit, towards these organs and towards seedlings. The isolates from the fruit attacked the roots and the stems, but the infection in the stems was much weaker than by strains isolated from stems. The isolates from roots attacked the fruit. The isolates from the roots as well as from the fruit were under sterile conditions very strongly pathogenic towards tomato seedlings killing them rapidly.

In other experiments tomato plants were inoculated with isolates of *C. atramentarium* obtained from tomato and from potato; the isolates from tomato were more vicious in their effects.

Numerous experiments were carried out in a greenhouse to study the influence of the methods of inoculation on the course of pathogenesis: the most frequent procedure was to spray a suspension of spores onto the aerial parts of the plants and to infect the roots by introducing the inocula into the soil. Inocula consisting of sclerotia or suspensions of spores were also placed on various parts of the plants. These experiments

showed that the fungus caused local infections of leaves and stems, but it also could penetrate over some distance inside the tissues. All the methods of inoculation led to the development of the pathogen in the stems and the attacking of the roots. The fruit were only attacked locally and by infections coming from outside. Infection could equally well take place by direct contact of the inoculum with the plant organs as by the transportation of spores. The most severe infections were always caused by spraying the whole plants with a suspension of spores and much milder ones by infecting the roots directly or through the soil.

The increase of the weight of plants grown in optimum conditions were recorded so as to assemble data about the influence of *C. atramentarium* infections on the growth of plants. It was found that the development of the fungus inside the plants was rather slow; the roots were not seriously damaged till 2—3 months after inoculation and only then the harmful effects of the pathogen became apparent: growth was strongly reduced and premature death occurred. The appearance of the symptoms in the aerial parts of the plants was strongly influenced by the conditions in which the plants grew. The development of the disease was specially favoured by the factors weakening the root system and disturbing the water economy of plants.

The conclusion drawn from these observations was that, though the ability of *C. atramentarium* for saprophytic development was rather high, the aggressiveness of the fungus towards tomato was high but its pathogenicity was weak this last trait being determined by the influence of environmental conditions on the state of plants.

In connection with the observed properties of the fungus the report discussed the methods of its control.

LITERATURA

1. Bewley W. F., 1922, Mycological Report Eighth Ann. Rept. Cheshunt Exper. and Res. Sta. Hertfordshire. 8, 34 (RAM, 23, 489).
2. Bremer H., 1954, Beobachtungen zur Wurzelfäule in Trockenklima, Z. Pflanzenkrankh. 61(11):575.
3. Gäumann E., 1959, Nauka o infekcyjnych chorobach roślin, PWRiL.
4. Gierasimow B. A. i Osnicka J. A., 1958, Szkodniki i choroby warzyw, PWRiL.
5. Hoffmann G. M., 1959, Untersuchungen über die Anthraknose des Hanfes (*Cannabis sativa* L.), Phytopath. Ztschr. 35(1):31.
6. Kendrick J. B. and Walker J. C., 1948, Anthracnose of tomato, Phytopath. 38:247.
7. Pantidou M. E. and Schroeder W. T., 1955, Foliage as a source of secondary inoculum for tomato anthracnose, Phytopath. 45:338.

8. Schmiedeknecht M., 1956, Untersuchungen des Parasitismus von *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. an Kartoffelstauden (*Solanum tuberosum*), Phytopath. Ztschr. 26.
9. Younkin S. B. and Dimock A. W., 1944, Foliage infections of *Lycopersicon esculentum* by *C. phomoides*. Phytopath. 34:976.
10. Williams P. H., 1929, Fungi occurring in tomato roots, Rept. Exp. Res. Sta. Cheshunt. 14:42.
11. Williams P. H., Ebben M., Read W. H., Smith R. J., Howles R., Messing J. H. L., Owen O., Massey D. M., 1950, Plant diseases, Chemical investigations, Rep. Exp. Res. Sta. Cheshunt. 20—34, 57—61 (RAM, 52, 222).