

## Badania nad *Phytophthora infestans* (Mont.) de By na pomidorach w Polsce

Cz. I. Obserwacje nad wzrostem i zarodnikowaniem *Ph. infestans* na różnych podłożach oraz nad morfologią i biologią zarodników konidialnych

Investigations on the fungus *Phytophthora infestans* (Mont.) de By  
isolated from tomatoes

P.I. Development of the mycelium and sporulation on various media  
and the morphology and biology of the conidia and zoospores

H. KUBICKA

### WSTĘP

Uzyskanie czystych kultur grzyba stanowi podstawową konieczność w badaniach nad morfologią i biologią pasożyta.

Czystą kulturę *Phytophthora infestans* udało się uzyskać wielu badaczom już w końcu ubiegłego wieku. Początkowo używano świeżych roślin lub sporządzano z nich wywary, w okresie późniejszym materiały roślinne stanowiły podstawę pożywek zestalanych agarem lub żelatyną. Stosowano dynię, nasiona owsa w różnej postaci (Tacker 1933), a z nasion innych zbóż: pszenicę, żyto, jęczmień i kukurydzę (Śnieszko i wsp. 1947; Keay 1948, 1953; Henniger 1959 i in.). Stosowano również bulwy ziemniaka (Crosier 1933), nasiona motylkowych oraz suche części roślin, a zwłaszcza łodygi i liście ziemniaka (Keay 1953).

Pomimo dużej różnorodności materiałów mogących stanowić podłoże do hodowli *Phytophthora infestans* często natrafia się na trudności w uzyskaniu dobrego wzrostu grzyba. Trudności te wynikają ze specyficznych wymagań pokarmowych różnych szczepów grzyba. Wzrost i zarodnikowanie jednych szczepów mogą być niezadowalające na podłożu, na którym inne rosną i zarodnikują dobrze. Tak np. Śnieszko i współpracownicy (l. c.) hodowali z powodzeniem *Phytophthora infestans* na pożywce sporządzanej z nasion pszenicy i łusek strąków arachidowych, podczas gdy Keay (1948) uznała to podłoże za nie nadające się dla szczepów przez nią posiadanych. Ze specyficz-

nych wymagań pokarmowych szczepów rodzą się zatem nie tylko trudności w uzyskaniu dobrego ich wzrostu w warunkach sztucznych, lecz również sprzeczne opinie różnych autorów na temat jednej i tej samej pożywki. Także Henniger (l. c.) stwierdził zależność wzrostu i zarodnikowania grzyba nie tylko od podłoża, ale też od wymagań szczepu. Twierdzenie powyższe oparł autor na wynikach uzyskanych w badaniach przydatności wielu pożywek zbożowych dla wzrostu kilku ras *Phytophthora infestans*. Otóż w doświadczeniach tych poszczególne rasy fizjologiczne tego grzyba wykazały różny wzrost i zarodnikowanie na poszczególnych podłożach. Dlatego zdaniem wymienionego autora ocenę przydatności określonej pożywki oprzeć można jedynie na obserwacji wzrostu wielu różnych szczepów. Prace Hennigera, który badał wzrost *Phytophthora infestans* zarówno na podłożach organicznych, jak i na pożywkach syntetycznych wykazały, że o ile na pożywkach organicznych szczepy rozwijały się lepiej lub gorzej, o tyle na syntetycznych podłożach jedne rosły, inne nie rosły wcale.

#### IZOLACJA

Grzyb został wyizolowany z naturalnie porażonych owoców pomidorów zbieranych z plantacji CNOS-u oraz z prywatnych upraw. Materiał do izolacji zebrano z terenu województw: krakowskiego, rzeszowskiego, lubelskiego, łódzkiego, bydgoskiego, poznańskiego i warszawskiego.

Porażone owoce dokładnie myto, po czym odkażano 0,1% roztworem sublimatu, splukiwano wodą sterylizowaną i układano w słojach na małych płytkach Petriego. Na dno słoja nalewano nieco wody dla utrzymania potrzebnej do zarodnikowania wilgoci. Po kilku dniach na powierzchni plamy pojawiały się nalot trzonek konidialnych z zarodnikami, które w warunkach sterylnych przenoszono na pożywkę. Ze szczepów uzyskanych w powyżej opisany sposób sporządzano następnie jednozarodnikowe kultury według następującej procedury. Odrobiny grzybni wypłukiwano w wodzie destylowanej i kroplę tej zawiesiny przenoszono na szkiełko nakrywkowe, które umieszczano na podstawkowym szkiełku z wgłębieniem. Kroplę badano następnie pod mikroskopem i jeśli zawierała jeden zarodnik ścierano ją ze szkiełka na wycinek bulwy ziemniaczanej. Rozwiniętą grzybnię przenoszono na pożywkę. Do izolacji i dalszej hodowli używano pożywki ze śruty owsianej nadającej się dla większości posiadanych szczepów.

#### 1. Wzrost i zarodnikowanie szczepów *Phytophthora infestans* na podłożach sztucznych

Wszystkie izolaty z pomidorów, uzyskane w liczbie 251, oraz dodatkowo dla porównania 15 izolatów z ziemniaków hodowano w jednako-

wych warunkach temperatury na 8 pożywkach, w celu porównania intensywności ich wzrostu i zarodnikowania oraz dla oceny badanych podłoży dla rozwoju grzyba. Z wyjątkiem podłoży, przy których podano źródło ich pochodzenia, skład pozostałych został dobrany przez autorkę.

#### 1) Śrutowa owsiana

Suchą śrutę owsianą w ilości 4 gramy wsypywano do kolbki o pojemności 100 ml. Oddzielnie rozpuszczano w autoklawie agar (2%) w wodzie destylowanej w ilości potrzebnej na ogólną ilość kolb. Na kolbkę przeznaczano 40 ml tak sporządzonego płynnego agaru. Pożywkę sterylizowano trzykrotnie w aparacie Kocha.

#### 2) Śrutowa z nasion trzech zbóż

Proporcje na kolbkę takie jak wyżej. Odważoną ilość śrutę przypadającą na zaplanowaną ilość kolbek stanowi mieszanina śrutę pszennej, żytniej i owsianej wziętych w równych ilościach. Ilość płynu z agarem na kolbkę oraz sposób jego przyrządzania i sterylizowania — jak dla pożywki owsianej.

#### 3) Zbożowa wyciągowa według Jarmolińskiej

Woda destylowana	1500 ml
Nasiona pszenicy	150 g
Nasiona żyta	150 g
Glukoza	20 g
Agar	17 g

Nasiona zbóż, każde oddzielnie, pozostawia się zalane wodą destylowaną na 24 godz. w temp. pokojowej. Napęczniałe nasiona przenosi się do szalek i układa w warstwach 2—3 cm, a następnie umieszcza się w ciemnym pomieszczeniu o wilgotności powietrza 85—95%. Nasiona w naczyniach zrasza się wodą co kilka dni. W takich warunkach kiełkują one przez 3 tygodnie, przy czym w pierwszym tygodniu powinny przebywać w temp. 6—10°C, w drugim w temp. 14°C, a w trzecim w 16°C. Po skiełkowaniu nasiona zalewa się 1 litrem wody i gotuje w aparacie Kocha 1 godz. Ekstrakt z agarem rozpuszczonym w 0,5 l wody miesza się dodając glukozy. Mieszaninę sterylizuje się w aparacie Kocha.

#### 4) Fasolowa

Suche nasiona fasoli szerokoowocowej mielono na mąkę i rozważono po 4 g na kolbkę. 2% agar z wodą destylowaną oddzielnie autoklawowano, a następnie mieszano z mieloną fasolą w ilości 40 ml na kolbkę. Sterylizowano w aparacie Kocha.

#### 5) Drożdżowa

Drożdże gotowano w wodzie destylowanej (100 g na 1 l wody), dekantowano, wyciąg mieszano z 0,5 litrem 2% roztworu agaru rozpuszczonego w wodzie destylowanej. Dodawano 1% glukozy, rozlewano do kolbek i sterylizowano jak wyżej.

#### 6) Grochowo-ziemniaczana wg Świszczewskiej

Świeże strąki z nasionami słodkiego grochu wkładano do kolby, zalewano wodą destylowaną, tak by je przykrywała i gotowano w aparacie Kocha 1,5 godz. Sporządzano wywar z ziemniaków gotując kawałki bulw przez 20 min. Płyn łącono w jednakowej ilości dodając rozpuszczony oddzielnie agar i 1% glukozy. Po rozlaniu do kolbek sterylizowano w aparacie Kocha.

#### 7) Grochowa

Nasiona grochu suchego zalewano wodą destylowaną na 24 godz., gotowano do miękkości, wyciskano. Płyn z otrzymaną zawiesiną łącono z rozpuszczonym agarem i glukozą 1%, rozlewano po 40 ml w kolbkach i sterylizowano bez ciśnienia.

## 8) Kukurydziana wg Henniger

200 g kukurydzy 1 litr wody autoklawowano przez 60 min. Odcisnięty z wywaru płyn sączono i dodawano 10% żelatyny.

Do hodowli szczepów stosowano także bulwy ziemniaka odmiany 'Bintie' oraz owoce pomidorów. Zdrowe bulwy ziemniaka oraz owoce pomidorów po dokładnym obmyciu dezynfekowano powierzchniowo 0,1% roztworem sublimatu i splukiwano sterylizowaną wodą. Bulwy ziemniaka krajano w plastry, układano po dwa — jeden na drugim — w szalkach Petriego, następnie zaszczepiano grzybnią kładąc ją między plastry. Owoce pomidorów układano sterylnie w słojach na małych płytkach Petriego, nalewając na dno słoja nieco sterylizowanej wody. Grzybnię wprowadzano pod skórę owocu.

pH pożywek sprawdzano po ich ugotowaniu. Wynosiło ono od 5,4—5,8, tzn. mieściło się w granicach wymagań grzyba. Wzrost na różnych pożywkach opisywano prowadząc obserwację kultur dwutygodniowych, hodowanych w temp. 18—20°C. Rozwój grzybni oceniano na oko, porównując jej gęstość i wysokość u poszczególnych szczepów i klasyfikując według następującej skali: 1 — brak wzrostu, 2 — wzrost słaby, 3 — średni, 4 — dobry, 5 — b. obfity. Zarodnikowanie szczepów porównywano orientacyjnie pod mikroskopem (używając powiększenia 375 ×), na szkiełku podstawowym umieszczono w kropli wody nieco grzybni, starając się brać z każdej kultury jednakowe jej ilości. Krople wody odmierzano pipetą kalibrowaną. Ilość zarodników oceniano według skali: 1 — brak, 2 — zarodnikowanie słabe (ok. 20 zarodników w polu widzenia), 3 — średnie (ok. 100 zarodników), 4 — dobre (ok. 200 zarodników), 5 — b. obfite (cała powierzchnia pola usiana zarodnikami).

Na żadnym z zastosowanych podłoży nie uzyskano optymalnego wzrostu i zarodnikowania dla wszystkich badanych szczepów. Wyniki obserwacji wzrostu i zarodnikowania przedstawiono w tabeli 1 (str. 151). Z danych tych wynika, że na poszczególnych podłożach wystąpiły duże różnice zarówno we wzroście grzybni badanych szczepów, jak i w intensywności zarodnikowania. Rozwój grzybni nie jest bowiem skorelowany z wytwarzaniem zarodników. Biorąc pod uwagę najwyższy procent szczepów o wzroście dobrym i b. obfitym stwierdzić należy, że najlepszy rozwój grzybni uzyskano na podłożu owsianym, a dalsze miejsca zajęły: pożywka wyciągowa zbożowa, śrutowa z trzech zbóż, drożdżowa, fasolowa, dalej, ziemniaczano-grochowa i grochowa. Na pożywce kukurydzianej uzyskano tylko średni wzrost grzybni.

Należy podkreślić, że charakter wzrostu grzybni zależy również od pożywki. Śrutowe dawały grzybnię puszystą, łatwo oddzielającą się od podłoża, podczas gdy na miękkich, delikatnych pożywkach wyciągowych grzybnia powietrzna była zwarta, niższa, obficie rozwijająca się w podłożu, tak że wyjęcie jej bez warstwy agaru było często niemożliwe.

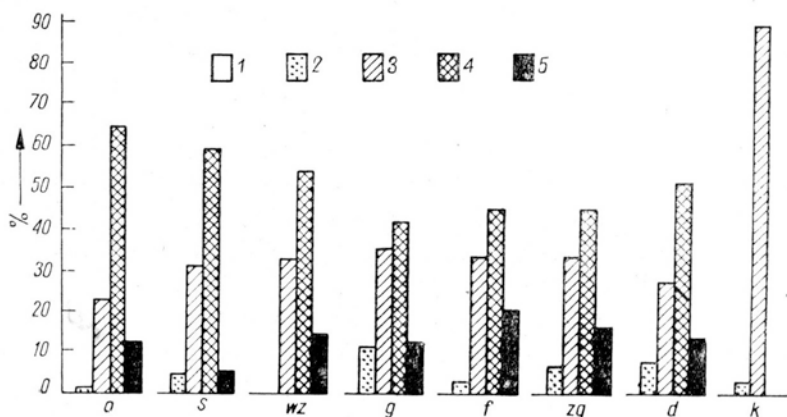
Tabela 1— Table 1

Rozwój grzybni i zarodnikowania na różnych pożywkach  
(oceniany wg 5-stopniowej klasyfikacji jakościowej)

Development of mycelium and sporulation on various media  
(estimated on the basis of 5-degrees of qualitative classification)

Pożywki Media	Liczba szczepów No. of strains										Udział szczepów w produkcji grzybni Contribution of indi- vidual strains in the mycelium production					Udział szczepów w produkcji zarodników Contribution of indi- vidual strains in the spores production				
	wzrost grzybni growth of mycelium					zarodnikowanie sporulation					w stopniach in degrees					w stopniach in degrees				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Owsiana oat	0	1	59	174	32	0	30	74	131	31	0	0,4	22	65	12	0	11	28	49	12
Śrutowa z trzech zbóż mixed 3-cereal meal	0	11	83	160	12	12	25	90	121	18	0	4	31	60	5	5	9	34	45	7
Wyciągowa zbożowa cereal extract	0	0	85	144	37	8	79	132	47	0	0	0	32	54	14	3	30	50	17	0
Grochowa pea	0	28	92	113	33	7	81	77	79	22	0	11	35	42	12	3	30	29	30	8
Fasolowa bean	0	6	88	118	54	6	84	63	84	29	0	2	33	45	20	2	32	24	31	11
Ziemniaczano- -grochowa potato-peas	0	15	87	121	43	16	99	109	42	0	0	6	33	45	16	6	38	40	16	0
Drożdżowa yeast	0	18	71	140	37	12	81	101	72	0	0	7	27	52	14	5	30	38	27	0
Kukurydziana maize	0	8	258	0	0	8	145	45	52	16	0	3	97,0	0	0	3	55	17	19	6

- 1 — brak wzrostu grzybni lub zarodnikowania (lack of growth or sporulation)  
 2 — słaby wzrost grzybni lub zarodnikowania (weak growth or sporulation)  
 3 — średni „ „ „ „ (moderate growth or sporulation)  
 4 — dobry „ „ „ „ (strong growth or sporulation)  
 5 — b. obfity „ „ „ „ (exuberant growth or sporulation)



Ryc. 1. Wzrost grzybni *Phytophthora infestans* na ośmiu różnych pożywkach — w stopniach przyjętej klasyfikacji

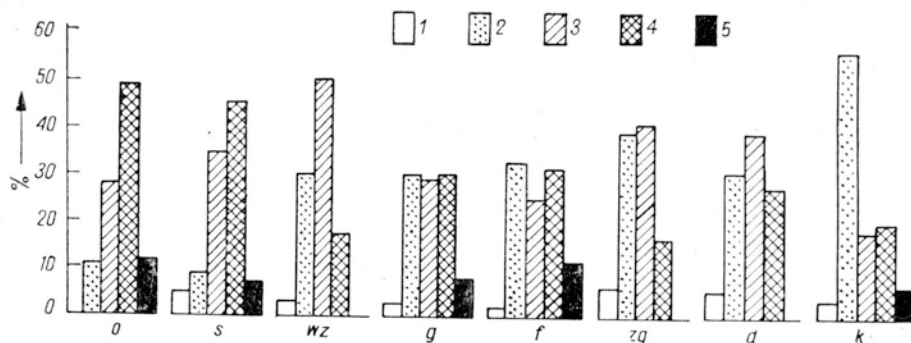
1 — brak wzrostu, 2 — wzrost słaby, 3 — wzrost średni, 4 — wzrost dobry, 5 — wzrost b. obfity

Pożywki: o — owsiana, s — śrutowa z trzech zbóż, wz — wyciągowa zbożowa, g — grochowa, f — fasolowa, zg — ziemniaczano-grochowa, d — drożdżowa, k — kukurydziana

Development of *Phytophthora infestans* mycelium on eight different media — in degrees of the classification adopted

1 — no growth, 2 — weak growth, 3 — moderate growth, 4 — strong growth, 5 — exuberant growth

Media: o — oat, s — mixed 3-cereal meal, wz — cereal extract, g — pea, f — bean, zg — potato-peas, d — yeast, k — maize



Ryc. 2. Zarodnikowanie *Phytophthora infestans* na ośmiu różnych pożywkach — w stopniach przyjętej klasyfikacji

1 — brak zarodnikowania, 2 — słabe zarodnikowanie, 3 — średnie zarodnikowanie, 4 — dobre zarodnikowanie, 5 — b. obfite zarodnikowanie

Pożywki: o — owsiana, s — śrutowa z trzech zbóż, wz — wyciągowa zbożowa, g — grochowa, f — fasolowa, zg — ziemniaczano-grochowa, d — drożdżowa, k — kukurydziana

Sporulation of *Phytophthora infestans* on eight different media — in degrees of the classification adopted

1 — no sporulation, 2 — weak sporulation, 3 — moderate sporulation, 4 — strong sporulation, 5 — exuberant sporulation

Media: o — oat, s — mixed 3-cereal meal, wz — cereal extract, g — pea, f — bean, zg — potato-peas, d — yeast, k — maize

Dla zarodnikowania również najlepsza okazała się pożywka owsiana, na której wszystkie szczepy zarodnikowały, a ponad 60% wytwarzała zarodniki konidialne w stopniu dobrym i bardzo dobrym. Dalej najwyższy procent szczepów dobrze i obficie zarodnikujących otrzymano na podłożu z trzech śrut zbożowych (52%), następnie na pożywce fasolowej (42%), grochowej (38%), drożdżowej (27%), kukurydzianej (25%), zbożowej wyciągowej (17%) oraz ziemniaczano-grochowej (16%). Średni stopień zarodnikowania dla największej ilości szczepów stwierdzono na pożywkach: zbożowej wyciągowej (50%), ziemniaczano-grochowej (40%), drożdżowej (38%), śrutowej z trzech zbóż (34%), grochowej (29%), owsianej (28%), fasolowej (24%), kukurydzianej (17%). Najmniejszą ilość szczepów pod względem słabego wytwarzania zarodników notowano na pożywkach: śrutowej z trzech zbóż (9%) i owsianej (11%). Na pozostałych pożywkach procentowy udział szczepów wykazujących się słabym zarodnikowaniem znacznie wzrasta: od 30—55%. O ile wzrost grzybni stwierdzono na wszystkich wymienionych pożywkach, to rozwój zarodnikowania wszystkich szczepów stwierdzono tylko na podłożu owsianym. Na pozostałych zaś pewna ilość szczepów nie zarodnikowała wcale.

Wzrost i zarodnikowanie szczepów *Phytophthora infestans* na bulwach odmiany 'Bintie' były niejednakowe, podobnie jak na podłożach sztucznych. U szczepów, które charakteryzowało słabe zarodnikowanie nawet na najlepszym z podłoży sztucznych: owsianym, nie stwierdzono również poprawy w zarodnikowaniu po kilkutygodniowej hodowli na świeżych bulwach ziemniaka, ani też na owocach pomidora, co pozwala sądzić, że zdolność zarodnikowania szczepów zależy nie tylko od warunków hodowli, lecz także stanowi cechę dziedziczną.

Stwierdzono, że najmniejsze zanieczyszczenia bakteryjne kultur powodują pogorszenie wzrostu grzybni i zarodnikowania. Przy znacznym zaś rozwoju bakterii w kulturze — następuje liza grzybni.

## 2. Porównanie wymiarów zarodników konidialnych różnych szczepów *Phytophthora infestans*

Zarodniki konidialne *Phytophthora infestans* wytwarzają się szczytowo, pojedynczo na rozgałęzionych trzonkach konidialnych dochodzących do 1 mm długości. Na szczycie trzonka konidialnego, gdzie powstaje zarodnik, tworzy się najpierw rozdęcie, powiększające się w miarę rozwoju i przybierające kształt owocu cytryny. Szczytowy zarodnik zostaje zepchnięty na bok przez boczne odgałęzienie trzonka, które rosnąc przybiera rolę odgałęzienia głównego (tzw. rozgałęzienie sympodialne).

Wykonano szereg porównawczych pomiarów długości i szerokości zarodników dla dziewięciu szczepów z każdego z siedmiu województw.

Tabela 2 — Table 2

Pomiary długości i szerokości zarodników konidialnych *Phytophthora infestans*  
Measurements of length and width of *Phytophthora infestans*

Nr szcze- pu No. of strain	Skrajne wymia- ry Extreme dimen- sions	Długość Length			Skrajne wymia- ry Extreme dimen- sions	Szerokość Width	Stosunek dł./szer. Ratio length/width					
		x̄	u	s				v	x̄	u	s	v
26	12-47	26,74	0,5	5,16	19,29	19,43	0,24	2,49	12,81	1,376		
159	12-40	27,55	0,61	6,18	22,43	16,79	0,17	1,79	10,66	1,613		
187	12-44	28,14	0,71	7,14	25,46	16,61	0,22	2,20	13,14	1,664		
189	12-44	28,17	0,64	6,44	22,86	16,48	0,21	2,12	12,86	1,692		
156	15-42	28,53	0,61	6,12	28,46	16,75	0,16	1,64	9,79	1,682		
158	15-45	28,66	0,57	5,72	19,95	17,03	0,18	1,89	11,09	1,664		
212	12-40	28,78	0,57	5,76	20,01	18,47	0,27	2,72	14,73	1,556		
155	15-42	28,99	0,53	5,38	18,52	17,31	0,21	2,10	12,13	1,676		
142	11-46	29,03	0,73	7,31	25,18	17,34	0,29	2,92	16,83	1,654		
154	15-42	29,33	0,60	6,09	20,42	17,07	0,19	1,94	11,36	1,697		
174	17-42	29,43	0,55	5,50	18,68	17,81	0,20	2,01	11,28	1,639		
229	14-47	29,81	0,80	8,0	26,80	17,91	0,24	2,49	13,90	1,640		
157	12-45	29,84	0,66	6,6	22,16	17,23	0,23	2,31	13,40	1,714		
163	15-42	29,98	0,58	5,85	19,51	17,73	0,2	2	11,51	1,705		
197	15-46	30,00	0,67	6,72	22,4	16,86	0,18	1,87	11,09	1,745		
241	15-49	30,10	0,69	6,95	23,08	18,39	0,20	2,07	10,71	1,628		
185	15-47	30,27	0,61	6,15	20,31	18,73	0,24	2,40	12,81	1,610		
86	15-54	30,33	0,62	6,22	20,50	19,04	0,25	2,58	13,55	1,594		
182	15-45	30,39	0,74	7,49	24,64	17,28	0,22	2,23	12,90	1,735		
238	15-50	30,69	0,73	7,34	23,91	17,93	0,24	2,46	13,16	1,681		
209	15-50	30,88	0,65	6,58	21,30	17,28	0,19	1,97	11,40	1,773		
178	17-42	30,95	0,47	4,76	15,37	18,91	0,19	1,97	10,41	1,636		
51	15-54	31,09	0,85	8,52	27,40	17,15	0,23	2,3	13,41	1,772		
179	20-50	31,10	0,55	5,53	17,94	22,44	0,33	3,33	14,83	1,393		
168	14-50	31,55	0,62	6,29	19,93	18,22	0,22	2,21	12,12	1,755		



25	14-52	31,59	0,72	7,25	22,95	11-25	18,03	0,25	2,51	18,03	1,728
160	19-46	31,65	0,58	5,80	18,34	15-22	17,37	0,19	1,98	10,46	1,662
151	17-45	31,64	0,55	5,59	17,67	14-21	18,90	0,18	1,82	10,48	1,820
183	16-46	31,67	0,67	6,72	21,21	12-25	18,39	0,23	2,35	12,77	1,706
191	15-45	31,77	0,65	6,50	20,45	12-25	17,82	0,23	2,31	12,96	1,765
147	15-55	31,86	0,76	7,69	24,14	12-22	16,42	0,21	2,10	12,79	1,932
82	15-47	32,04	0,72	7,24	22,59	12-25	18,23	0,22	2,24	12,28	1,737
193	19-42	32,03	0,53	5,57	17,36	15-27	19,14	0,23	2,38	12,43	1,666
140	15-60	32,10	0,67	6,76	21,05	15-25	18,90	0,25	2,53	13,38	1,696
161	15-42	32,20	0,49	4,92	15,27	14-24	18,54	0,17	1,74	9,38	1,734
78	15-55	32,30	0,77	7,72	23,80	11-25	17,96	0,26	2,26	14,97	1,785
207	14-47	32,47	0,72	7,25	23,32	12-25	18,03	0,22	2,20	12,20	1,769
195	17-52	32,59	0,75	7,57	23,22	12-31	18,29	0,27	2,73	14,98	1,774
128	17-44	32,74	0,60	6,05	18,47	15-24	19,31	0,22	2,27	11,75	1,687
62	20-46	33,10	0,53	5,36	16,19	15-26	19,91	0,63	6,33	33,29	1,668
211	19-49	33,10	0,60	6,0	18,14	14-25	18,67	0,24	2,49	10,81	1,767
232	17-52	33,19	0,61	6,13	18,16	14-27	18,92	0,20	2,02	13,16	1,750
141	15-50	33,63	0,69	6,9	20,51	10-24	18,73	0,27	2,72	14,52	1,780
137	17-50	34,84	0,61	6,15	18,17	12-27	18,92	0,25	2,53	13,37	1,759
76	15-55	33,85	0,85	8,52	25,16	12-27	19,24	0,20	2,09	10,86	1,759
172	14-52	34,05	0,80	8,06	23,67	11-25	18,94	0,24	2,45	12,93	1,757
43	20-52	34,32	0,58	6,86	19,98	14-25	17,69	0,22	2,21	12,49	1,933
181	16-50	34,69	0,72	7,24	20,87	12-22	17,74	0,19	1,94	10,94	1,936
125	15-50	34,75	0,65	6,57	18,90	15-29	20,5	0,28	2,89	14,09	1,697
77	17-77	35,01	1,46	14,67	41,90	12-27	19,09	0,32	3,21	16,80	1,813
169	12-47	35,12	0,66	6,66	18,80	11-27	20,76	0,26	2,65	12,76	1,685
88	15-50	35,15	0,55	5,51	15,67	15-25	18,56	0,21	2,14	11,53	1,888
176	21-51	35,50	0,75	7,57	21,32	15-27	20,53	0,22	2,22	10,81	1,712
58	21-49	36,15	1,24	12,41	34,33	14-25	18,48	0,22	2,29	12,39	1,958
170	20-50	36,18	0,57	5,78	10,44	15-29	18,81	0,22	2,21	11,15	1,818
33	24-52	36,48	0,58	5,89	16,14	17-30	21,92	0,23	2,33	10,62	1,659
74	15-64	36,87	0,68	6,84	18,55	15-27	19,72	0,22	2,22	11,25	1,862
80	21-62	36,96	1,14	11,45	30,98	12-29	18,82	0,34	3,40	18,06	1,925
84	20-50	37,21	0,72	7,26	19,51	15-29	21,18	0,20	2,05	19,87	1,749
136	17-75	37,40	0,75	7,57	20,24	12-25	18,98	0,20	2,09	11,01	1,948
-6	27-62	39,21	1,10	11,04	28,15	15-30	21,11	0,33	3,37	15,96	1,842
		41,81	0,76	7,6	18,17	19-29	23,23	0,22	2,29	9,85	1,768

x — skrajne wymiary średnie (mean extreme measurements)

u — błąd średnich (means error)

s — odchylenie (deviation)

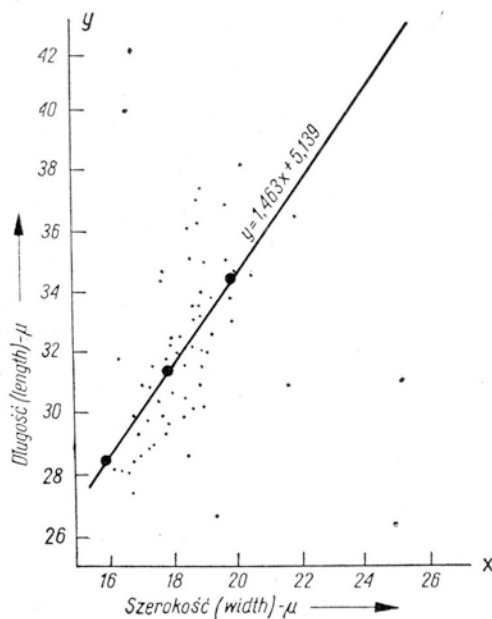
v — zmienność (variance)

Liczba pomiarów dla każdego poszczególnego szczepu była stała i wynosiła 100. Wszystkie mierzone zarodniki pochodziły z dwutygodniowych kultur hodowanych na agarze owsianym, w temp. 18—20°C.

Otrzymane długości i szerokości zarodników konidialnych mieszczą się w granicach: 26,74—41,81 × 16,42—23,23 μ (tab. 2). Za najczęstsze, a więc najbardziej typowe, należy uznać wymiary mieszczące się między 28 × 16 μ a 36 × 19 μ. Aby uzyskać jeden wskaźnik charakteryzujący wielkości zarodników wyliczono średni stosunek długości do szerokości, a dane uszeregowano według wielkości wzrastającej, co umożliwiło ustalenie czterech zasadniczych klas wielkości. Częstość występowania średnich wartości stosunku długości zarodników konidialnych do ich szerokości w poszczególnych klasach wartości przedstawia się następująco:

od 1,376 do 1,393	—	3,2%
„ 1,556 „ 1,594	—	3,2%
„ 1,610 „ 1,785	—	74,6%
„ 1,813 „ 1,958	—	19%

Najliczniej jest reprezentowana klasa trzecia, co wskazuje na znaczną przewagę występowania zarodników o kształcie wydłużonym. Korelacja między długością a szerokością zarodników jest wysoce istotna i równa 0,676. Zależność ta jest prostolinijna, wyrażona funkcją  $y = 1,463x + 5,139$ , gdzie  $y$  jest długością, a  $x$  szerokością, co ilustruje załączony wykres (ryc. 3). Wraz ze wzrostem szerokości wzrasta długość,



Ryc. 3. Wykres korelacji długości i szerokości zarodników *Phytophthora infestans*  
Correlation between length and width of *Phytophthora infestans* spores

dzięki czemu najczęściej obserwowanym kształtem zarodników jest kształt wydłużony. Wypadki szczególnego wydłużenia lub szczególnego wyokrąglenia zarodników spotykane są rzadko.

### 3. Obserwacje nad morfologią i biologią zarodników pływkowych *Phytophthora infestans*

Zarodniki konidialne *Phytophthora infestans* w środowisku wodnym, w granicach temperatur od 9 do 25°C, spełniają funkcje zarodni, w których tworzą się pływki (Crosier 1933). Optimum temperatury dla tworzenia się pływek wynosi — jak podaje Crosier — 13°C, co mieści się w zakresie temperatur optymalnych 10—15°, podawanych przez N a u m o w ą (1961). Zakres zaś cytowanych przez tę autorkę temperatur granicznych dla tworzenia się pływek znajduje się między 10 a 20°C. W temperaturach ponad 15°C stwierdzono u nieznacznej liczby obserwowanych zarodników konidialnych kiełkowanie strzępką rostkową. Natomiast temperatura przewyższająca 25°C całkowicie hamuje wytwarzanie się pływek, pobudzając zarodniki konidialne do kiełkowania rostkami. Pewien wpływ na tworzenie się pływek ma długość życia zarodników, z których one się tworzą. Młodsze, 2—3-dniowe na ogół dają w większym procencie pływki, starsze zaś w większej liczbie przypadków kiełkują rostkami (N a u m o w a 1961).

W procesie tworzenia się zarodników pływkowych plazma zarodni dzieli się, przy czym obserwuje się stopniowo, coraz wyraźniejsze oddzielanie się od siebie uformowanych porcji protoplazmy i kształtowanie się zarysów zarodników pływkowych. Jednocześnie tworzą się narządy ruchu — wici. Gdy pływki są już ukształtowane, przeciskają się na zewnątrz przez powstały w szczytowej części zarodni otwór.

Szybkość uwalniania, a także ilość uwolnionych zarodników pływkowych świadczą o żywotności, która nie jest jednakowa u wszystkich szczepów. Pewien procent izolatów wyróżniał się większym rozciągnięciem w czasie tego procesu. W celu konkretnego uchwycenia tych różnic zbadano uwalnianie się zarodników pływkowych u 80 szczepów tego samego wieku, hodowanych na tym samym podłożu, w temp. 18°C.

Zawiesinę zarodników konidialnych przygotowywano w sposób następujący. Kultury hodowano przez 14 dni w temp. 18°C w kolbkach o pojemności 100 ml zawierających jednakową ilość pożywki. Dwutygodniową grzybnię zbierano z podłoża, płukano w wodzie. Dla otrzymania pływek płyn z zarodnikami konidialnymi umieszczano na 2 godz. w temp. 13°C. W tym czasie, dla uchwycenia momentu rozpoczęcia się procesu uwalniania się pływek pobierano krople zawiesiny do obserwacji mikroskopowej. Po dwu godzinach przenoszono płyn do temp. ok. 20°C i obserwowano szybkość uwalniania się pływek w trzech kolejno

pobieranych kroplach. Obserwację powtarzano po upływie 3 i 4 godz. Dla każdego szczepu wyniki w postaci średniego procentu zarodni pustych, obliczonego z ogólnej ilości zarodni w polu widzenia (pełnych i pustych), przedstawia poniższe zestawienie (w rubrykach uwzględniono ilość szczepów uwalniających zarodniki pływkowe w podanym procencie i czasie):

% pustych zarodni po 2, 3 i 4 godz.	30			40			50			60			70			80			90					
po godzinach:	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4
liczba szczepów	2			3 4			5 6			6 9			3 6 1			7 2 2			2 2 2					

Ze względu na różnice w ilości wytwarzanych zarodników konidialnych przez poszczególne szczepy, wielkości kropli dobierano w ten sposób, by ilość zarodników (zarodni) w polu widzenia mikroskopu była mniej więcej jednakowa dla wszystkich przebadanych szczepów. Dla wielu szczepów proces uwalniania się zarodników pływkowych zaczynał się mniej więcej po 60 minutach od wstawienia płynu do temperatury 13°C, nasilał się znacznie po 2 godz., a po 3 osiągał największą ilość uwolnionych zarodników pływkowych, po 4 zaś stan ilościowy był prawie taki sam jak po 3 godz.

U pewnej grupy szczepów zarówno procesy podziału protoplazmy zarodni, jak i uwalniania pływek trwały dłużej w porównaniu do izolatów wyżej wspomnianych. I tak np. początek procesu uwalniania rozpoczynał się po dwóch lub trzech godzinach, a po czterech godz. notowano dla nich stosunkowo niski procent pustych zarodni. Dane powyższe uwypuklają różnice w żywotności szczepów wyrażające się niejednakową zdolnością i tempem uwalniania zarodników pływkowych.

Pływki odznaczają się dużą ruchliwością przy znacznym zróżnicowaniu form tego ruchu — od drgań czy ruchu postępowego lub kołowania do lekkiego kołowania lub ruchu obrotowego tak szybkiego, że zacierającego kontury ich ciała. Długość okresu ruchu zależy od temperatury otoczenia, jak również od właściwości szczepów. Temperatura ma zasadniczy wpływ na długość trwania ruchu. Według Crosier ruch pływek w temperaturze 3°C obserwuje się przez 22 godz., a w temp. 24°C przez 30 minut.

Zarodniki pływkowe (fot. 1—9) po wydostaniu się z zarodni są ameboidalne, wkrótce jednak przybierają kształt zbliżony do kulistego z wgnieceniem z jednej strony (fot. 6) i nieznacznym wydłużeniem się przedniej ich części (fot. 2 — pływka wewnątrz zarodni). Wgniecenie to jest lepiej widoczne w materiale utrwalonym. Po utracie zdolności poruszania się zarodniki pływkowe przybierają kształt kulisty.

Narządami ruchu zarodników pływkowych są dwie wici niejednakowej długości. W a t e r h o u s (1962) podaje wyniki badań kilku auto-

rów nad ultrastrukturą wici u grzybów wytwarzających pływki. Wici te zbudowane są z różnej grubości włókien protoplazmatycznych. Wszystkie te włókna — z których jedno, osiowe, umieszczone jest w środku, a pozostałe rozmieszczone równolegle wokół włókna głównego — odchodzą od ciała podstawowego. Tworzą one więc jednolitej grubości lub — jeśli włókna otaczające włókno główne biegnąc ku końcowi stopniowo urywają się — dają w efekcie szpiczaste zakończenie. Autorka ta podaje, że prawdopodobnie u *Phytophthora infestans* obydwie wici są cienko zakończone.

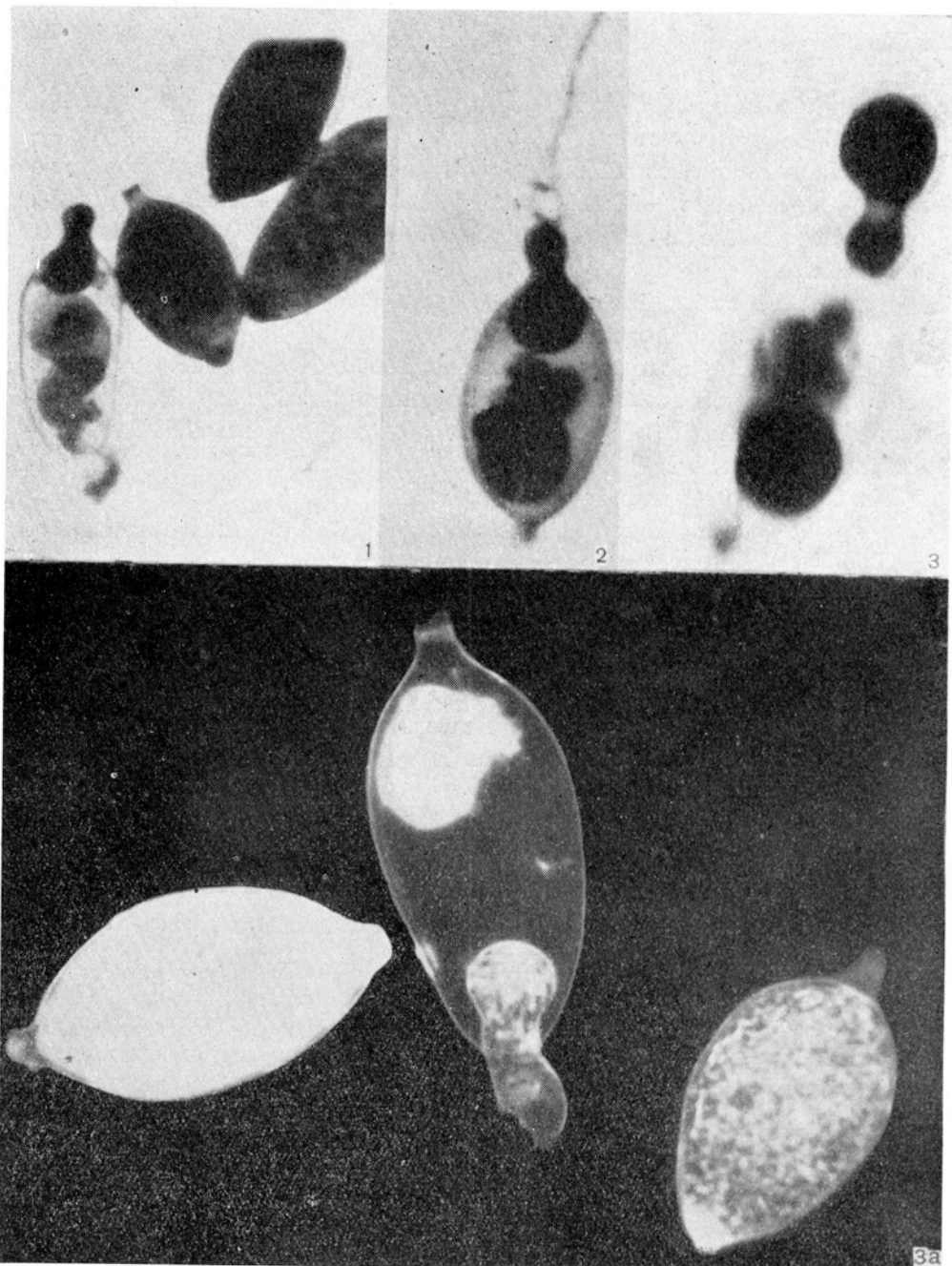
Badania Ferris, Rogers i Lyon (1954) wykazały, że krótsza wic jest orzęsiona, a dłuższa nie.

We własnych badaniach prowadzonych nad uwalnianiem się zarodników pływkowych zwrócono uwagę na charakterystyczny szczegół występujący na końcach wici. Mianowicie obydwie wici zarodników pływkowych zakończone są jakby dyskowatymi utworami.

Krupko (1934) w pracy nad pływkami u *Phytophthora nicotianae* obserwował podobne zakończenia i zinterpretował ten fakt następująco: „...,często rzęski pływek mają swój cienki koniuszek zagięty w pętelkę, co jednak wcale nie utrudnia ich ruchów. Prócz takich zagięć mają rzęski tendencję do łatwego tworzenia skrętów lub szerszych pętli w środku mniej więcej ich długości. Zdaje mi się, że jest ona przeważnie objawem zamierania, gdyż zjawia się bardzo często po różnych utrwalaczach, np. po utrwalaczu Nawaszyna. Skręcone w taką pętlę rzęski, na preparatach zamkniętych w balsamie wydają się z góry luźnymi kólkami”...

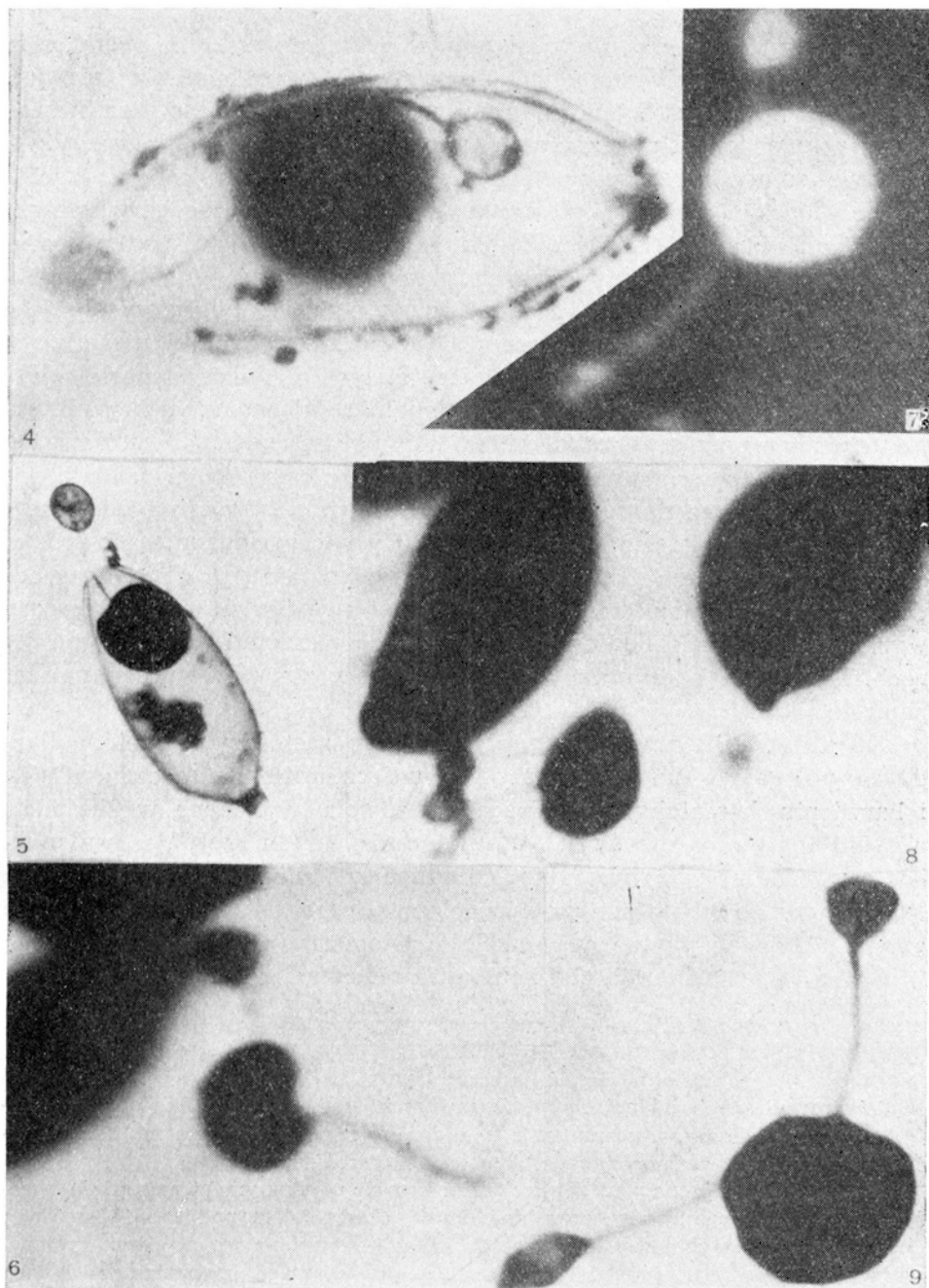
Dyskowate zakończenia wici u grzybów z rodzaju *Phytophthora* opisywało później wielu autorów próbując wyjaśnić mechanizm powstawania tych utworów. Ferris, Rogers i Lyon (l. c.) uważają te struktury za wynik zwijania się końca wici do środka i że tak zwinięta wic zostaje potem oderwana. Kole i Horstra w 1959 r. (cyt. Colhoun 1966) w badaniach swych nad zarodnikami pływkowymi u *Phytophthora infestans* zwrócili uwagę, że samo tylko zwinięcie końca wici nie może stanowić wystarczającego wyjaśnienia obecności struktur dyskowatych. Sugerują oni, że zakończenia te powstają przez rozdęcie końca osłonki wici, co powoduje zwinięcie się końcowego odcinka osi. Autorzy ci jednak wiążą również obecność zakończeń z końcową fazą ruchu zarodników pływkowych.

We własnych badaniach prowadzono obserwacje mikroskopowe materiału żywego i utrwalonego. Materiał żywy obserwowano w zwykłym oraz w ciemnym polu widzenia, a także w kontraście fazowym. Najczęściej stosowano powiększenia 400 lub 600-krotne. Dyskowate zakończenia wici u pływek *Phytophthora infestans* widziano bardzo często w czasie ich ruchu, a także w czasie opuszczania zarodni (fot. 5) przez



Zarodniki pływające *Phytophthora infestans*  
Zoospores of *Phytophthora infestans*  
Fot. 1—3a. Różne fazy uwalniania się pływaków  
Various phases of zoospores emergence

Tablica II — Plate II



Fot. 4—9. Dyskowate struktury na końcach wici pływek  
Disc-structures in of the flagella endings of zoospores

zarodniki pływkowe. Zakończenia te można obserwować stale przy ich poziomym ustawieniu się, co pozwala wnioskować, że są to twory nie efemeryczne, lecz stale występujące, widoczne tylko w określonym położeniu wici (fot. 4—9). Obecność ich nie tylko nie utrudnia ruchu, lecz wręcz mu pomaga. Poziome bowiem ustawienie zakończenia jest, jak się zdaje, wykorzystywane przez zarodnik pływkowy do hamowania ruchu szybkiego. Ustawienie zaś zakończenia jak steru, w płaszczyźnie pionowej, ułatwia bardzo szybkie ruchy, przy których jest ono zupełnie niewidoczne. Oglądane na żywo, w ruchu, niczym nie barwione zarodniki pływkowe posiadały zakończenia dyskowate, a w dodatku obserwowano je u żywych pływek wewnątrz zarodni (fot. 4) lub w czasie opuszczania zarodni (fot. 5), co dowodzi, że nie są to twory występujące pod wpływem bodźców chemicznych, jakimi są odczynniki utrwalające czy barwiące, lecz twory o charakterze stałych elementów morfologicznej budowy wici pływki, twory funkcjonalnie związane z ruchem. Interpretację Krupki, że zakończenia wici zjawiają się po zastosowaniu różnych utrwalaczy, tłumaczyć należy tym, że czynniki te działają po prostu paraliżująco na ruch pływek, co ułatwia dostrzeżenie zakończeń. Także w końcowej fazie ruchu pływek, gdy wici wciągane są do środka komórki, zakończenia dyskowate bywają szczególnie wyraziste. Przy odpowiednim ustawieniu się wici, zakończenia te stają się również bardzo wyraźne i po zadziałaniu na pływkę odczynnikami blokującymi jej ruch. Do takich odczynników stosowanych w niniejszej pracy należał chlorek niklu.

Do utrwalania zarodników pływkowych zastosowano metodę Parducza polegającą na szybkim działaniu czterotlenkiem osmu ( $OsO_4$ ) i barwieniu hematoksyliną. Praca ta została wykonana w Zakładzie Biologii Instytutu Nenckiego. W materiale w ten sposób utrwalonym znaczny procent wici lub tylko ich zakończeń ulegał zniszczeniu przez odrywanie się. Odrywanie się tych elementów obserwowano także dość często u żywych pływek w trakcie fizjologicznej czynności wciągania wici do wnętrza komórki, pod koniec fazy ruchu.

#### STRESZCZENIE

W prowadzonych badaniach porównawczych nad grzybem *Phytophthora infestans* (Mont) de By, izolowanym z pomidorów, zwrócono uwagę na wzrost, zarodnikowanie oraz na morfologię i biologię tego pasożyta.

Badania prowadzono nad 251 izolatami grzyba uzyskanymi z naturalnie porażonych owoców pomidorów oraz dodatkowo obserwacjom poddano 15 szczepów pochodzących z ziemniaków. Materiał do izolacji zebrano z województw: krakowskiego, rzeszowskiego, lubelskiego, łódzkiego, bydgoskiego, poznańskiego i warszawskiego.

Izolaty hodowane na ośmiu pożywkach sztucznych wykazały różnice we wzroście grzybni i w intensywności zarodnikowania oraz brak korelacji między



rozwojem grzybni i wytwarzaniem zarodników. Najlepszy wzrost grzybni i największą ilość wytwarzanych zarodników konidialnych stwierdzono na pożywce owsianej.

Dla scharakteryzowania przydatności pożywki dla wzrostu konieczne jest przebadanie na niej wzrostu różnych szczepów.

Pomiary 63 szczepów *Phytophthora infestans* pochodzących z siedmiu województw wskazały, że najczęstsze średnie wymiary zarodników mieszczą się w granicach  $28 \times 16$  do  $36 \times 19 \mu$ .

Badanie szybkości tworzenia i uwalniania się pływek wykazało, że poszczególne szczepy różnią się znacznie pod tym względem. Uznając intensywność i szybkość procesu uwalniania pływek oraz ich ruchliwość za kryterium żywotności szczepów można na tej podstawie scharakteryzować jedne szczepy jako wybitnie żywotne inne jako mniej żywotne.

W osobno prowadzonych obserwacjach nad morfologią wici pływek stwierdzono na podstawie zastosowanej metody utrwalania, barwienia i fotografii występowanie na końcach wici dyskowatych utworów, które odgrywają rolę w ruchu zarodników pływkowych.

Profesorowi dr Józefowi Kochmanowi składam wyrazy wdzięczności za pomoc i opiekę w czasie wykonywania niniejszej pracy.

Zakład Ekologii PAN  
Pracownia Fitopatologii

(Wpłynęło dnia 15.4.1968)

#### SUMMARY

In the investigations on the fungus *Phytophthora infestans* (Mont) de By isolated from tomatoes particular attention was directed to the development of the mycelium, sporulation and to the morphology and biology of this parasite.

The material for isolation consisted of naturally infected tomato fruits from a plantation of the Seed and Gardening Cooperative (CNOS) and private cultures in the Cracow, Rzeszów, Lublin, Łódź, Bydgoszcz, Poznań and Warsaw Districts.

The isolates (251) were cultured on eight natural media. It was found that on different media wide differences occur in the development of mycelium and the intensity of sporulation. The growth of the mycelium was not correlated to spore production. The most intensive mycelial growth and sporulation were obtained on an oat nutrient medium and the poorest results on maize medium.

Measurements of spore dimensions proved that the most frequent and typical sizes lie within the limits of  $28 \times 16$  and  $36 \times 19 \mu$ , thus elongated spores prevail.

In studies on the morphology and biology of *Ph. infestans* the process of liberation of zoospores (swarmspores) from conidial spores which in an aqueous medium play the role of sporangia, was observed. The largest number of zoospores was obtained after 3 hrs of exposure of the liquid medium to  $13^{\circ}\text{C}$ . The swarm spores, at first ameboidal, take on later a spherical shape with a depression anteriorly on one side, and after losing their motility they become completely spherical.

During movement of the spores, disc shaped endings of flagella were observed which aided the zoospores in moving.

#### LITERATURA

Colhoun J., 1966, The biflagellate zoospore of aquatic *Phycomycetes* with particular reference to *Phytophthora* sp. [in:] The Fungus Spore, Proc. XIX Symp. Colston. Res. Soc. p. 85—92.

- Crosier W., 1933, Culture of *Phytophthora infestans*, *Phytopathology* 23: 713.
- Ferris, Rogers V., Lyon H. H., 1954, The flagella of swarmspores of *Phytophthora infestans* as viewed with the phase of electron microscopes, *Phytopathology* 44 (9): 487.
- Henniger H., 1959, Versuche zur verschiedener Rassen von *Phytophthora infestans* (Mont) de By. auf Kunstlichen Nahrboden, *Phytopathol. Z. B.* 34, H. 3: 285.
- Jarmolińska-Adamczewska H., 1962, Studies of the methodics of cultivation of *Phytophthora infestans* (Mont) de By. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences* 10 (7): 261.
- Keay M. A., 1948, Growth of *Phytophthora infestans* (Mont) de By on artificial media, *Nature* 162. 162.
- Keay M. A., 1953, Media for the culture of *Phytophthora infestans*, *Plant Pathology*. V. 2.
- Krupko St. 1934, O plywkach u *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, *Acta Soc. Bot. Pol.*, 5, XI suppl.
- Naumowa N. A., 1961, *Fitoftora kartofielia*, Leningrad.
- Snieszko S. F., Carpenter J. B., Lowe E. P. and Jakob J. G., 1947. Improved methods for the cultivation and storage of *Phytophthora infestans*, *Phytopathology* 37.
- Tucker C. M., 1931, *Taxonomy of the genus Phytophthora* de Bary, Columbia, Missouri.
- Waterhouse G. M., 1962, The zoospore, *The British Mycological Society Transaction* 45: 81.