

**Wykorzystanie saprotroficznych form
Fusarium oxysporum Schlecht. ex Fr.
do zwalczania różowej zgnilizny korzeni pora
(*Allium ampeloprasum* ssp. *porrum* (L) J. Gay)**

Krzysztof Matkowski

**Wykorzystanie saprotroficznych form
Fusarium oxysporum Schlecht. ex Fr.
do zwalczania różowej zgnilizny korzeni pora
(*Allium ampeloprasum* ssp. *porrum* (L) J. Gay)**



WROCŁAW 2010

Autor
dr inż. Krzysztof Matkowski

Opiniodawca
prof. dr hab. Czesław K. Sadowski

Redaktor merytoryczny
prof. dr hab. inż. Zofia Spiak

Opracowanie redakcyjne
mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

Korekta
mgr Anna Piskor
Janina Szydłowska

Łamanie
Alina Gebel

Projekt okładki
Halina Sebzda

Monografie XCIX

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2010

ISSN 1898-1151
ISBN 978-83-7717-008-3

WYDAWNICTWO UNIwersYTETU PRZYRODNICZEGO WE WROCLAWIU

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel. 71 328-12-77
e-mail: wyd@up.wroc.pl

Nakład 100 + 16 egz. Ark. wyd. 3,6. Ark. druk. 3,5
Druk i oprawa: F.P.H. „ELMA”

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP	7
II. PRZEGLĄD LITERATURY	9
III. METODY BADAŃ	15
3.1. Kultury grzybów.....	15
3.1.1. Ocena specjalizacji pokarmowych	15
3.1.2. Przygotowanie materiału inokulacyjnego	15
3.2. Ocena wpływu saprotroficznych form <i>Fusarium oxysporum</i> na rozwój różowej zgnilizny korzeni pora	16
3.2.1. Uprawa w podłożu mineralnym	16
3.2.2. Uprawa polowa	16
3.2.3. Izolacja grzybów z korzeni	18
3.2.4. Oddziaływania biotyczne pomiędzy <i>Pyrenochaeta terrestris</i> i <i>Fusarium oxysporum</i>	18
3.3. Ocena aktywności enzymatycznej.....	18
3.3.1. Hodowla grzybów	18
3.3.2. Podłoża.....	19
3.3.3. Krzywe wzorcowe.....	20
3.4. Test zgodności wegetatywnej.....	20
IV. PRZEBIEG POGODY W OKRESIE TRWANIA DOŚWIADCZENIA	21
V. WYNIKI BADAŃ	23
5.1. Specjalizacja izolatów <i>Fusarium oxysporum</i>	23
5.2. Wpływ saprotroficznych szczepów <i>Fusarium oxysporum</i> na wzrost i plonowanie pora zakażanego przez <i>Pyrenochaeta terrestris</i>	23
5.2.1. Doświadczenie wazonowe	23
5.2.2. Doświadczenie polowe	25
5.3. Wyniki badań laboratoryjnych	33
5.3.3. Badania aktywności enzymatycznej.....	33
5.3.4. Oddziaływanie biotyczne <i>Fusarium oxysporum</i> na <i>Pyrenochaeta terrestris</i>	35
5.3.5. Test zgodności wegetatywnej	39
VI. DYSKUSJA	41
VII. WNIOSKI	44
PIŚMIENNICTWO	45

I. WSTĘP

Fusarium oxysporum Schlecht. ex Fr. jest grzybem ubikwistycznym, występuje głównie w glebie, we wszystkich strefach klimatycznych świata. Może żyć saprotroficznie jak i pasożytniczo, powodując przede wszystkim choroby roślin, niekiedy infekcje u zwierząt i ludzi. Z uwagi na przystosowania polifagiczne i związane z tym znaczne straty w różnorodnych uprawach rolniczych i leśnych opisywany gatunek ma istotne znaczenie ekonomiczne (Kistler 1997).

F. oxysporum, podobnie jak wiele innych gatunków w obrębie *Fusarium* spp., wykazuje dużą zmienność pod względem morfologicznym, jak i fizjologicznym (Kistler 1997, Rataj-Guranowska i Pieczul 2002). Ta różnorodność form stanowiła zawsze problem badawczy dla mikologów-systematyków i fitopatologów. Dlatego, w 1940 r. Snyder i Hansen, gatunki powodujące choroby naczyniowe z sekcji *Elegans* zredukowali do jednego – *F. oxysporum*, tworząc jednocześnie formy specjalne, których identyfikacja opierała się na selektywnej patogeniczności. Zarówno wtedy, jak i teraz przynależność do określonej formy specjalnej dokonywana jest na podstawie oceny podatności roślin na zakażenie (Rataj-Guranowska 1987).

Znaczne straty ekonomiczne powodowane przez formy specjalne, a także wysokie koszty i ograniczona skuteczność stosowanych metod ochrony roślin przed fuzaryjnym wędnięciem lub fuzaryjną zgnilizną skłaniają do szczegółowej analizy mechanizmów biologicznej aktywności i różnorodności w obrębie *F. oxysporum* (Appel i Gordon 1994, Woudt i in., 1995). Formy niepasożytnicze mogą indukować odporność u roślin zakażanych przez formy pasożytnicze tego gatunku, dlatego wiedza o przystosowaniu poszczególnych form *F. oxysporum* do pobierania pokarmu ma znaczenie praktyczne (Kroon i in. 1991, Kaur i Singh 2007). Grzyby te mogą oddziaływać nie tylko w strefie rizosfery, konkurując o pokarm, ale również nawiązywać latentny, a nawet symbiotyczny kontakt z korzeniami roślin. Zjawisko to jest znane u wielu gatunków roślin (Alabouvette 1990, Larkin i in. 1996, Rajendran i Ranganathan 1996).

Istnieją przesłanki świadczące o możliwości istnienia odporności krzyżowej, indukowanej przez niepatogeniczne formy *F. oxysporum* u pora (*Allium ampeloprasum* ssp. *porrum* (L.) J. Gay) i cebuli (*Allium cepa* L.), zakażanego przez *Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, Walker et Garson – przyczynę różowej zgnilizny korzeni. Na Dolnym Śląsku pierwsze znaczne nasilenie objawów tej choroby obserwowano w 1990 r. w Psarach koło Wrocławia (Matkowski 1992, 1994). Rozpoczęto wówczas systematyczne obserwacje zagrożonych upraw oraz badania, podczas których licznie izolowano z korzeni pora *P. terrestris* i *F. oxysporum* (Matkowski 1996). Liczebność drugiego z wymienionych grzybów zawsze przekraczała 70%, postanowiono ocenić jego rolę w przebiegu choroby, tym bardziej że tak liczne izolaty *F. oxysporum sensu lato* uzyskiwano również z korzeni niewykazujących objawów chorobowych. Podjęte badania miały na celu nie tylko bezpośrednią ocenę szkód powodowanych przez patogeny zakażające

z gleby, ale również poznanie zmian zachodzących w zbiorowiskach grzybów w uprawie pora, ze szczególnym uwzględnieniem roli stowarzyszonego z *P. terrestris* – *F. oxysporum*, gatunku będącego dominantem w korzeniach pora.

Formy saprotroficzne *F. oxysporum* spełniają szereg warunków, które musi posiadać mikroorganizm będący składnikiem patosystemu – potencjalnie chroniącym przed chorobą infekcyjną: są bardzo aktywne metabolicznie; wytwarzają dużą liczbę zarodników, jak również form przetrwalnikowych – chlamydospor, dzięki którym mogą przetrwać wiele miesięcy w niekorzystnych warunkach środowiska. W przypadku „gatunku zbiorowego”, a tak często określa się *F. oxysporum*, istnieje jednak problem oceny przystosowania poszczególnych izolatów czy szczepów do pobierania pokarmu, jak i problem ich umiejętnego doboru. W populacji mogą znajdować się zarówno formy saprotroficzne, jak i pasożytnicze, izolaty o zazwyczaj nieznannej ekspresji genów, mających wpływ na określone sposoby odżywiania i związaną z tym zdolność wytwarzania egzoenzymów. Nieznana jest też rola *F. oxysporum* w etiologii różowej zgnilizny korzeni (Lacy i Roberts 1982, Appel i Gordon 1996).

Celem pracy było:

- poznanie zależności biotycznych zachodzących pomiędzy *P. terrestris* a saprofitycznymi szczepami *F. oxysporum* wyizolowanymi z korzeni;
- charakterystyka zmienności populacji *F. oxysporum* uzyskanych z różnych zbiorowisk poprzez określenie sposobu odżywiania oraz ocenę zgodności wegetatywnej;
- ocena aktywności enzymatycznej izolatów *F. oxysporum* jako kryterium przystosowania do życia saprotroficznego i pasożytniczego;
- ocena antagonistycznego i ochronnego działania wyselekcjonowanych saprotroficznych form *F. oxysporum* w stosunku do *P. terrestris*, zastosowanych w postaci szczepionki glebowej w uprawie pora.

II. PRZEGLĄD LITERATURY

Różowa zgnilizna korzeni roślin uprawnych z rodzaju *Allium* jest chorobą łatwą do diagnozy. Zainfekowane korzenie zabarwione są na różowo przez należącą do antrachinonów cyanodontynę – barwnik wytwarzany przez *Pyrenochaeta terrestris* (Birch i in. 1961, Gunasekaran i Weber 1981, Bell i Wheeler 1986, Lazarovits i in. 1989). Z czasem korzenie stają się czerwono-brązowe, brązowe albo czarne. Niekiedy zabarwieniu na kolor różowy może ulegać również skrócona łodyga cebuli lub pora oraz zewnętrzne liście spichrzowe albo okrywowe tych roślin (Chupp i Sherf 1960, Smith i in. 1989). Obserwowane w organach spichrzowych procesy rozkładu są najczęściej efektem następczego porażenia przez grzyby z rodzaju *Fusarium*, które początkowo mylnie brano za jedną z przyczyn choroby (Kehr i in. 1962, Lacy i Roberts 1982).

Obecnie jednoznacznie uznaje się, że bezpośrednią przyczyną różowej zgnilizny korzeni jest grzyb *Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, Walker et Larson (Gorenz i in. 1948, Kehr i in. 1962, Levy i Gornik 1981, Schneider 1965, Smith i in. 1989). Jest to powszechnie występujący w środowisku glebowym mikroorganizm – należący do rzędu *Sphaeropsidales*, często izolowany ze zdrowych i niezabarwionych na różowo korzeni różnych gatunków roślin nienależących do rodzaju *Allium* (Sprague 1944, Tims 1955, Chupp i Sherf 1960, Schneider 1965, Krupa i Dommerques 1979). Z wieloma gatunkami roślin *P. terrestris* może tworzyć bardzo ściśle związki biotyczne, z mikoryzami włącznie (Shishkoff 1984).

P. terrestris może być zarówno saprotrofem, jak i pasożytem (Glynne 1965). Luttrell (1974) precyzyjnie określa charakter patogenu, klasyfikując ten gatunek jako pasożyta względnego, który tylko w niekorzystnych warunkach rozwija się na martwej materii organicznej. Potwierdzają to badania Colemana i Ellerbrocka (1992). *P. terrestris*, wnikając do tkanek żywiciela, penetruje je zarówno mechanicznie, jak i enzymatycznie. Grzybnia początkowo rozrasta się międzykomórkowo, później patogen wytwarza ssawki wrastające do komórek. Z czasem *P. terrestris*, podobnie jak *F. oxysporum*, przerasstają do tkanki naczyniowej (Hess 1968, 1969). Korzenie odmian wrażliwych są w warunkach sztucznej inokulacji całkowicie zniszczone po około 20–25 dniach. U odmian tolerancyjnych opanowane zostają zazwyczaj tylko komórki epidermy i najbardziej zewnętrzne komórki kory pierwotnej (Struckmeyer i in. 1962).

P. terrestris, podobnie jak większość grzybów bytujących w glebie, jest trudny do opanowania. W Izraelu, USA, Australii powszechnie stosowanym zabiegiem przeciwko temu patogenowi jest solaryzacja gleby. Zabieg ten jest jednak skuteczny i opłacalny tylko w rejonach o silnym nasłonecznieniu. Bardzo często solaryzacja jest stosowana z jednoczesnym wprowadzaniem fungicydów do gleby (Porter i in. 1989, Hartz i in. 1989). Ważnym sposobem ochrony roślin cebulowych jest uprawa odmian odpornych na różową zgniliznę (Nichols i in. 1965). W rejonach o dużym zagrożeniu chorobą uprawia się odmiany posiadające odporność typu wielogenowego (Levy i Gornik 1981). Z analizy biochemicznej wynika, że odporność ta jest związana ze zdolnością tworzenia

cukrów w komórkach, co ogranicza poziom wytwarzanych przez grzyb enzymów rozkładających ścianę komórkową (Horton i Ken 1966). Z innych powszechnie stosowanych sposobów ochrony przed różową zgnilizną korzeni warto wymienić: odpowiednie następstwo roślin, uprawę na zakażonych polach odmian szybko dojrzewających ewentualnie uprawę takich odmian, które szybko potrafią zastępować porażone korzenie nowymi, co umożliwi zebranie zadowalającego plonu (Levy i Gornik 1981). Straty plonów, w uprawach odmian podatnych, mogą sięgać nawet 80%, dlatego nadal intensywnie poszukuje się nowych metod ochrony, koncentrując się również na metodach biologicznych (Nishimura 1986, Gordon i in. 1989, Sumner i in. 1997, Yong-Ki Kim 2003). W Polsce, doświadczalnie, próbowano ograniczać różową zgniliznę, stosując dogłębno szczepionki z *Trichoderma viride* (Biesiada i in. 2002). W przeglądanych pozycjach literatury nie znaleziono prac, w których do ochrony przed tą chorobą stosowano niepatogeniczne formy *F. oxysporum*.

Występowanie i szkodliwość *P. terrestris* jest w znacznym stopniu uzależniona od stosunków biotycznych panujących w glebie. Wiadomo, że patogen ten może bytować w glebie przez wiele lat – nawet w kilkudziesięcioletnich monokulturach cebuli, nie powodując strat w plonie, dopóki nie wystąpi zachwianie równowagi w środowisku, które może być spowodowane zarówno czynnikami biotycznymi, jak i abiotycznymi (Glynn 1965, Krupa i Dommergues 1979). Z licznych prac wiadomo, że obecność antagonistycznych grzybów i bakterii może ograniczać rozwój organizmów chorobotwórczych i wpływać na ich przeżywalność w glebie (Baker i Cook 1974, Dorenda 1983, Łacicowa i Pięta 1985, Truszkowska i in. 1986, Płaskowska 1991, Ellis i in. 2000, de Boer i in. 2003). Oddziaływania pomiędzy organizmami żyjącymi w glebie kształtują się różnie w zależności od warunków atmosferycznych, glebowych, od gatunku uprawianych roślin i ich następstwa (Hornby 1983, 1994, Paulitz 1990, Larkin i in. 1996).

W badaniach diagnostycznych różowej zgnilizny wyizolowanie czynnika chorobotwórczego może nastęrczać trudności. W sztucznych kulturach *P. terrestris* bardzo trudno wytwarza piknidia, a w trakcie izolacji jest „zagłuszany” przez grzyby szybko rosnące – głównie z rodzaju *Fusarium*. Są one silnie związane z porażonymi korzeniami i prawie zawsze izolowane razem z *P. terrestris*. Również odmiennie wyglądają objawy chorobowe powodowane przez *P. terrestris* i *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (Hanzawa) W.C. Snyder & H.N. Hansen. Pierwszy z patogenów silnie redukuje system korzeniowy, podczas gdy drugi powoduje głównie zgorzel naczyń oraz mokrą zgniliznę „piętki” i organów spichrzowych roślin (Lacy i Roberts 1982). Ponadto, w dostępnym piśmiennictwie, autorzy wyraźnie wiążą występowanie różowego zabarwienia z chorobą powodowaną przez *P. terrestris*, czego nie obserwowano w przypadkach zakażenia przez grzyby z rodzaju *Fusarium* (Hess i Vaughan 1962, Awuah i Lorbeer 1989).

Z korzeni roślin, obok *P. terrestris*, powszechnie izolowane są zarówno patogeniczne, jak i niepatogeniczne kultury *F. oxysporum*, co wskazuje na bardzo bliskie związki łączące obydwie gatunki (Hess i Vaughan 1962, Abawi i Lorbeer 1971a, 1972, Lacy i Roberts 1982). Zależności te nadal nie są dostatecznie poznane, podobnie jak nierozwiązany pozostaje problem określenia pierwotnego kolonizatora w przypadku wspólnych infekcji dokonywanych przez *P. terrestris* i *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. Według Kehra i in. (1962), Abawi i Lorbeer (1971b, 1972) *F. oxysporum* f. sp. *cepae* prawdopodobnie zakaża korzenie dopiero po infekcji przez *P. terrestris*. Z badań anatomicz-

nych przeprowadzonych przez Abawi i Lorbeer (1971a) wynika, że *F. oxysporum* może jednak niekiedy dokonywać pierwotnej kolonizacji nieuszkodzonych tkanek, co więcej, może je opanowywać, nie powodując widocznych uszkodzeń.

Doświadczenia dotyczące kompleksowego porażenia przez *P. terrestris* i *F. oxysporum* f. sp. *cepae* wykazały, że rośliny zainfekowane przez te grzyby rosną zazwyczaj podobnie, jak rośliny zainfekowane pojedynczo przez te gatunki – co oznacza, że obydwaj patogeny wprowadzone do podłoża równocześnie są mniej niebezpieczne dla roślin niż każdy z nich osobno (Hess i Vaughan 1962, Kehr i in. 1962, Lacy i Roberts 1982). Z porównawczych badań nad odpornością roślin w stosunku do obydwu patogenów wynika, że stopień odporności roślin wobec *P. terrestris* nie ma wpływu na poziom odporności tych samych roślin w stosunku do *F. oxysporum* (Kehr i in. 1962).

Jednym z podstawowych problemów spotykanych podczas badań nad chorobami roślin powodowanymi przez grzyby jest struktura ich populacji. Trudność w podziale na formy patogeniczne i niechorobotwórcze dotyczy wielu gatunków anamorficznym, w stosunku do których opracowanie jasnych kryteriów fizjologicznych i taksonomicznych jest trudne; między innymi ze względu na migracje genów pomiędzy pojedynczymi organizmami populacji, jak i pomiędzy populacjami (Kistler 1997). Różnorodność form zarówno fenotypowych, jak i genotypowych, związana między innymi ze zdolnością do kariogamii i kariokinezy, powoduje trudności w identyfikacji zarówno gatunków, jak i podjednostek systematycznych w obrębie gatunku (Rataj-Guranowska i Pieczul 2002).

Pierwsze próby usystematyzowania grzybów rodzaju *Fusarium* podjęli w 1935 r. Wollenweber i Reinking. Pięć lat później Snyder i Hansen (1940) dali podstawy nowemu systemowi taksonomicznemu, w którym kryterium fizjologiczne miało większe znaczenie niż cechy morfologiczne szczepów. Na podstawie selektywnego porażenia odrębnych gatunków roślin zostały wyróżnione formy specjalne i rasy. Z czasem, gdy dostrzeżono, że tylko nieliczne formy porażają wyłącznie jeden gatunek, stworzono pojęcie pierwszo- i drugorzędowego gospodarza, a podstawą badań stały się testy infekcyjne (Armstrong i Armstrong 1981).

W obrębie rodzaju *Fusarium*, pod względem genetycznym, najbardziej zróżnicowana jest sekcja *Elegans*, obejmująca grzyby o różnorodnych przystosowaniach ekologicznych. Do tej sekcji należy jeden gatunek – *F. oxysporum*, w obrębie którego wyróżniamy, w zależności od źródła, od 25 do ponad 70 form specjalnych lub ras (Booth 1971, Armstrong i Armstrong 1981). Za formę specjalną uważa się wyspecjalizowany wariant patogenu, zdolny do porażania określonego gatunku roślin, natomiast przez rasy porażane mogą być odmiany o podobnych głównych genach odporności (Nelson 1991, Simons i in. 1996).

Ze względu na polifagiczność i przystosowanie do życia w różnorodnych warunkach środowiska *F. oxysporum* jest gatunkiem szeroko rozpowszechnionym w świecie. Zarówno formy patogeniczne, jak i niepatogeniczne posiadają zdolność przeżywania w fazie saprotroficznej na organicznej materii w glebie (Nelson i in. 1981). Rola niepatogenicznych szczepów w warunkach naturalnych, w tym w glebach opornych, była przedmiotem licznych badań, których celem była ocena przydatności tych form jako czynników ochrony biologicznej, głównie przed formami patogenicznymi tego samego gatunku (Paulitz i in. 1987, Alabouvette 1990, Postma i Rattink 1992, Alabouvette i in.

1996). Antagonizm pomiędzy formami *F. oxysporum* najczęściej tłumaczy się konkurencją o pokarm i miejsca kolonizacji korzeni (Couteaudier i Alabouvette 1990, Eparvier i Alabouvette 1994, Olivain i in. 2006). O ile stosunkowo łatwo w układach doświadczalnych oraz w uprawach na podłożach sztucznych wykazać efektywność ochrony z udziałem *F. oxysporum*, to w naturalnych warunkach uprawy – w glebie tego typu biologiczna ochrona nie zawsze jest wystarczająco skuteczna, między innymi ze względu na złożoność i niepowtarzalność czynników środowiska: zmienność warunków pogody, skład fizykochemiczny gleby i wpływ przedplonu. Na stopień zróżnicowania *F. oxysporum* mogą mieć wpływ cechy fizjologiczne roślin żywicielskich, na przykład wydzieliny korzeni. Nieznane lub bardzo trudne do oceny są również interakcje pomiędzy patogenem a innymi mikroorganizmami, nie tylko z grzybami, ale również obecnymi w glebie rizosferze i korzeniach bakteriami. Ich rola w patogenezie jest istotna i zależy zarówno od składu gatunkowego, jak i liczebności poszczególnych komponentów (Miller i in. 1989, Gordon i in. 1989, Lamanceau i in. 1995, Salerno i in. 2004).

Posługując się molekularnymi metodami, opartymi na badaniu konserwatywnych regionów jądrowego i mitochondrialnego DNA, wykazano, że różnorodne formy patogeniczne mogą pochodzić od wspólnego przodka (Guadet i in. 1989). Oznacza to, że w przeszłości zróżnicowanie w obrębie populacji *F. oxysporum* było znacznie mniejsze. Bogactwo obecnych form specjalnych jest wynikiem koewolucji – wieloletniej interakcji genetycznej różnych linii, mniej lub bardziej powiązanych z rośliną-żywiciele. W wyniku złożonych procesów patogenezy nastąpiła prawdopodobnie wymiana i rozproszenie stałych cech pierwotnych, co doprowadziło do powstania licznych heterogenicznych i polifiletycznych form specjalnych. Formy te są powszechne, w przeciwieństwie do niespotykanych obecnie form monofiletycznych (Gordon i Martyn 1997).

Związki filogenetyczne pomiędzy licznymi izolatami należącymi do pięciu form specjalnych *F. oxysporum* (f. sp.: *cucumerinum*, *lagenaria*, *luffae*, *melonis* i *niveum*) zakażających dyniowate zostały zbadane przez Kim i in. (1993). Stosując RFLPS, u każdej z form specjalnych, rozpoznano 14 unikalnych haplotypów mitochondrialnego (mt) DNA, z których tylko jeden wzorzec był typowy dla każdej z form. Dwa haplotypy mtDNA były charakterystyczne dla czterech z pięciu form. Haplotyp najczęściej uzyskiwany dla *F. oxysporum* f. sp. *niveum* był obecny u co najmniej jednego z izolatów każdej z pozostałych form specjalnych, z wyjątkiem f. sp. *luffae*. Z badań wynikało, że izolaty należące do tych samych form specjalnych były bardziej zróżnicowane genetycznie niż należące do form odmiennych.

Podobnie dużą zmienność karyotypów, jak i zróżnicowanie pomiędzy grupami zgodności wegetatywnej (VGC) wykazano, stosując statystyczną analizę elektroforetyczną (Bohem i in. 1994, Migheli i in. 1995). Tylko w przypadku *F. oxysporum* f. sp. *albedinis*, analizując polimorfizm DNA (RAPD), stwierdzono wysokie, 80% podobieństwo izolatów. W tym przypadku zaobserwowano również korelację z liniami VGC (Fernandez i Tantaoui 1994).

Testy zgodności wegetatywnej są bardzo często stosowane jako uzupełniająca, a niekiedy podstawowa metoda oceny i klasyfikacji form specjalnych (Puchalla 1981, 1985, Rataj-Guranowska i in. 1993, Rataj-Guranowska 2002, Kistler 1997, Kistler i in. 1998). Zdolność tworzenia heterokarionów przez mutanty „nit” nie jest ograniczona tylko do izolatów w obrębie form specjalnych. Wynika to z faktu posiadania przez

grzyby wspólnych genów patogeniczności (Rataj-Guranowska i Walkowiak-Cagara 1994). Według Kistlera (1997), ze względu na dużą zmienność populacji *F. oxysporum*, test VGC nie jest najlepszą metodą oceny stopnia zróżnicowania genetycznego w obrębie izolatów tego gatunku, co nie oznacza, że testu tego nie można stosować do oceny ich genetycznego podobieństwa. Szczególnie w tym przypadku, gdzie reprodukcja przez mitospory i brak mejozy znacznie ogranicza rekombinacje genów.

P. terrestris, mimo że nie wykazuje tak dużej zmienności jak *F. oxysporum*, nie należy do gatunków o stałych cechach genetycznych i morfologicznych. Ferreira i in. (1991) oceniając metodą elektroforezy izolaty pochodzące z różnych rejonów, wydzielili w obrębie gatunku *P. terrestris* pięć elektroforetycznych typów, różniących się patogenicznością oraz zdolnością tworzenia barwników i enzymów.

Enzymy pełnią złożoną rolę w patogenezie. Dzięki tym związkom, w pierwszych fazach choroby, w większości przypadków jest możliwe проникnięcie czynnika chorobotwórczego do komórek lub tkanek. Ten etap działania enzymów hydrolitycznych rozkładających celulozę, pektyny, a potem białka i lipidy jest ważny, ale i łatwo zauważalny poprzez zazwyczaj widoczny rozkład tkanek (Subramanian 2009). Drugą istotną rolę enzymów jest ich działanie regulacyjne. Związki te stymulują lub są represorami licznych procesów biochemicznych zachodzących w trakcie infekcji w tkankach rośliny. Oksydazy: polyfenolaza i peroksydaza wzmagają reakcje obronne rośliny-gospodarza na czynnik chorobotwórczy. Obecność tych enzymów może doprowadzać do syntezy białek PR, lektyn lub związków tworzonych *de novo* – fitoaleksyn – będących reakcją na obecność czynnika chorobotwórczego (Ashraf i in. 2005). Czasem, jeśli to pobudzenie jest wystarczająco gwałtowne, powoduje nadwrażliwość – szybką śmierć komórek żywiciela (Ray i in. 1998, Montesinos i in. 2002, Dowd i Johnson 2005). W układach złożonych patogen-saprotrof wydzielane enzymy: peroksydazy, proteazy chitynaza i β -glukanaza mogą być istotnym czynnikiem ograniczającym wzrost patogenu (Gajera i in. 2008).

Zaburzenia w układzie białek i lipidów w membranach plazmatycznych, powodowane przez enzymy lipolityczne i proteolityczne, mogą mieć znaczenie dla pierwotnych reakcji obronnych komórki, decydujących o stopniu odporności roślin. Na powierzchni błon znajdują się miejsca recepcji elicytorów – związków odpowiadających za rozpoczęcie procesów obrony w komórkach. Membrany plazmatyczne są rezerwuarem biologicznie aktywnych lipidów oraz miejscem tworzenia prekursorów kwasu jasmonowego – przekaźnika wywołującego systemiczną odporność – SAR (Shah 2005, Li i Yen 2008).

W rozkładzie ścian komórkowych aktywny udział biorą celulazy i poligalaktouronazy. Pierwszy z tych związków większą rolę odgrywa w kolonizacji martwej tkanki, drugi enzym jest aktywniejszy w momencie penetracji żywych korzeni pora (Horton i Keen 1966, Keen i Horton 1966). Enzymy te otwierają drogę do dalszego rozkładu substancji znajdujących się wewnątrz komórek. Jedną z nich jest skrobia, która pełni funkcję substancji zapasowej w roślinach, a w wyniku działania amylaz jest rozkładana do glukozy (Brown 1984, Le Cam i in. 1996, Shell 2000).

F. oxysporum f. sp. *cepae* wnika do rośliny przy udziale enzymów pektynolitycznych: egzo-polygalaktouronazy i endo-pektynotranseliminazy (endo-PTE). Pierwszy z enzymów niszczy tkanki łodygi rzekomej pora i cebuli w początkowych fazach

choroby, a następnie współdziała z endo-PTE – intensywnie wytwarzanym około 2 tygodni po infekcji. W wyniku działania obydwu enzymów następuje maceracja tkanek i wyciek soku komórkowego z apoplastu i symplastu. Obecność łatwo dostępnych cukrów sprzyja rozwojowi grzyba, jak również jego reprodukcji (Holz i Knox-Davies, 1985 i 1986).

Szybkość i intensywność wytwarzania enzymów przez organizmy chorobotwórcze decyduje często o stopniu rozwoju choroby, dlatego aktywność enzymatyczna grzybów może być czynnikiem różnicującym izolaty w populacji, jak również wskaźnikiem stopnia przystosowania do pasożytniczego sposobu życia. (Brown 1984, Urbanek i Yirdaw 1984, Zalewska-Sobczak 1989, Favaron i in. 1992, Le Cam i in. 1996, Mbwaga i in. 1996, Turco i in. 1999, Posada i in. 2001, Jorge i in. 2006).

III. METODY BADAŃ

3.1. Kultury grzybów

3.1.1. Ocena specjalizacji pokarmowych

Kultury grzybów użyte w doświadczeniach zostały wyosobnione z korzeni pora w latach 1997–1999: izolaty saprotroficzne *Fusarium oxysporum* (F2, F4, F13, F345, F675 i F2567) – z korzeni niewykazujących objawów chorobowych; formy patogeniczne – *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (Fspc) i *Pyrenochaeta terrestris* (Pt368) – z korzeni uszkodzonych. W celu określenia przystosowań pokarmowych, a w szczególności oceny wirulencji wyżej wymienionych izolatów, wykonano szalkowy test infekcyjny.

Zdezynfekowane przez 1 minutę w 0,5% NaClO nasiona: pora (odmiany Wila), cebuli (Sochaczewska), ogórka (Krak F1), pomidora (Juhas), paryki (Elf) i sałaty (Nochowska) podkiełkowano i umieszczono w szalkach Petriego wyłożonych sterylną bibułą, nasączoną wodą destylowaną. Końce korzeni, o długości około – 2,0 cm, przykryto 3 mm krążkami grzybni, wyciętymi z 10-dniowych kolonii *F. oxysporum* i *P. terrestris*. Wykonano 3 powtórzenia z 50 skielkowanymi nasionami. Po 7 dniach mierzono korzenie uszkodzone przez grzyby, a stopień uszkodzeń oceniono za pomocą skali:

- 0 – brak uszkodzeń;
- 1 – uszkodzenia korzenia do 5 mm długości;
- 2 – uszkodzenia > 5 do 10 mm;
- 3 – uszkodzenia długości > 11–15 mm;
- 4 – uszkodzenia > 16 mm.

Indeks porażenia obliczono, posługując się wzorem Townsenda i Heubergera (1943), a uzyskane wyniki oszacowano testem statystycznym HSD Tukeya ($\alpha=0,05$).

3.1.2. Przygotowanie materiału inokulacyjnego

Trzy krążki, o średnicy 0,5 mm, wycięte z dwutygodniowych kolonii *F. oxysporum* i *P. terrestris* (rozd. 3.1.1), wprowadzano do kolb zawierających 500 g ziarniaków pszenicy, uprzednio wysterylizowanych z 200 ml wody. Po 3 tygodniach inkubacji w temp. 22°C – przerośnięte grzybnią ziarniaki liofilizowano i rozdrobniono w blenderze. Otrzymany homogenizat wymieszano najpierw z piaskiem kwarcowym, w stosunku wagowym – 1:5, potem rozprowadzono równomiernie, w odkażonym termicznie torfie odkwaszonym (pH 6,5) – w proporcji 1:20 (metoda własna).

3.2. Ocena wpływu saprotroficznych form *Fusarium oxysporum* na rozwój różowej zgnilizny korzeni pora

3.2.1. Uprawa w podłożu mineralnym

Doświadczenie, w trzech powtórzeniach, przeprowadzono w doniczkach wypełnionych 1600 cm³ sterylnego vermikulitu (26 x 10 x 9 cm), podlanego 300 cm³ wody. Podłoże wymieszano z 50 cm³ inokulatu zawierającego jeden z testowanych gatunków grzybów (rozd. 3.1.2) i z 50 cm³ sterylnego torfu odkwaszonego o pH 6,5. Przy równoczesnym wprowadzaniu do podłoża testowanych izolatów obydwu gatunków grzybów (wg układu przedstawionego w tab. 2, rozdz. 5.2.1), do doniczek dodawano tylko po 50 cm³ szczepionki. W kombinacjach bez grzybów dodawano do vermikulitu 100 cm³ sterylnego torfu.

Do doniczek wysiewano po 100 nasion odmiany Wila i przykrywano 15 mm warstwą sterylnego podłoża. Doniczki umieszczono pod fotostatem, z 16-godzinnym dobowym czasem naświetlania, w temperaturze 20°C nocą i 24°C w dzień ($\pm 0,5^\circ\text{C}$). Pory były podlewane pożywką Hoaglanda.

Po 40 dniach zmierzono wysokość roślin w doniczkach, po czym pory wyjęto z podłoża i umyto. Uszkodzenia korzeni, spowodowane przez obydwie testowane gatunki grzybów, oceniono, posługując się następującą skalą porażenia:

- 0 – zdrowe, białe korzenie,
- 1 – korzenie różowe (*P. terrestris*) (lub brunatne – *F. oxysporum*) i uszkodzone do 25%,
- 2 – korzenie różowe (lub brunatne) i uszkodzone od 26 do 50%,
- 3 – korzenie różowe (lub brunatne) i uszkodzone od 51 do 75%,
- 4 – korzenie zniszczone > 75%.

Indeks porażenia, dla każdej kombinacji, obliczano jak w rozdz. 3.1.1. Uzyskane wyniki oszacowano testem statystycznym HSD Tukeya ($\alpha=0,05$).

Z zebranych roślin pobierano losowo po dwa korzenie (bez względu na występowanie lub brak objawów chorobowych), otrzymując próbki do reizolacji grzybów (rozd. 3.2.3).

3.2.2. Uprawa polowa

Doświadczenie założono w Psarach koło Wrocławia metodą losowanych bloków, w czterech powtórzeniach, w latach 2000–2003. Corocznie, przed posadzeniem roślin, analizowano zbiorowiska grzybów w glebie, ze szczególnym uwzględnieniem obecności *P. terrestris* i *F. oxysporum*. Próby glebowe (100 g) pobierano z 10 miejsc, z głębokości 10–15 cm. Po wymieszaniu, z próby zbiorczej, do analizy mikologicznej pobierano 1 g gleby. Izolację grzybów wykonywano metodą Mańki (1974, 1990), wysiewając mieszaninę glebowo-piaskową na 150 szalek. W 50 szalkach podłożem hodowlanym było podłoże wg Komada (1975), w 50 agar glukozowo-ziemniaczany (PDA), w pozostałych szalkach pożywka z sorbozą i TBZ (2-(4'-thiazolyl) benzimidazol) o składzie:

0,3% NaNO₃, 0,1% MgSO₄ * 7H₂O, 0,5% sorbozy, 250 µg/ml chloramphenicolu, 2% agaru (Sneh i in. 1974). Po czterech dniach inkubacji, na każdą z szalek, atomizerem nanoszono 0,5 ml roztworu zawierającego 0,5 µg TBZ. Po 10 dniach liczone różowo wybarwione kolonie *P. terrestris*. Wszystkie kolonie wyrastające na PDA odszczepiano i zidentyfikowano. Z pożywki Komada odszczepiano na skosy z agarem glukozowo-ziemniaczanym tylko kolonie wykazujące cechy typowe dla *F. oxysporum*. Uzyskane z gleby kolonie oznaczono do gatunku lub rodzaju wg następujących monografii: Abawi i Grogan (1979); Ames (1961); Arx (1957); Barron (1972); Booth (1971); Brown i Smith (1957); Carmichael (1962); Chidambaram i in. (1973); Domsch i Gams (1970); Dorenbosch (1970); Ellis (1971); Gams (1971); Gilman (1959); Gorenz i in. (1948); Grebenjuk i Kuzniecowa (1971); Łacicowa (1993); Malone i Muskett (1964); Neergaard (1945); Nelson i in. (1983); Nirenberg (1981); Parmeter (1970); Raper i Fennell (1965); Raper i Thom (1949); Reinecke i Fehrmann (1979); Rifai (1969); Simmons (1964); Sivanesan (1987); Sutton (1980); de Vries (1952); Zycha i Siepmann (1969).

Dziesięciodniową rozsadę pora, podatnej na chorobę odmiany Wila, wysadzano do gleby w drugiej dekadzie maja. Każdego roku przedplonem była kapusta głowiasta. Rośliny sadzono w rozstawie 20 x 50 cm na poletkach o powierzchni 12 m², w czterech powtórzeniach.

Rozsadę uprawiano w doniczkach, w podłożu składającym się z ziemi gliniastej, torfu odkwaszonego (pH 7,2) i piasku, w proporcjach 7:3:1. Substrat odkażano termicznie. Po posadzeniu roślin nie stosowano zabiegów chemicznych. Nawozy: Mis 2 i saletra azotowa stosowane były tylko przedsiwnie, w dawkach obliczanych corocznie na podstawie analizy chemicznej zasobności gleby w makroelementy. Zakładano jednakowy poziom NPK na wszystkich poletkach, przyjmując następującą końcową zawartość składników pokarmowych w glebie: N – 100 mg w 1 dm³, P – 70 mg w 1 dm³, K – 175 mg w 1 dm³.

Po 20 dniach od wysadzenia roślin, w trzech środkowych rzędach poletka, w odległości 3 cm od łodyg rzekomych pora, przy każdej roślinie wykonywano zagłębienie narzędziem w kształcie stożka o średnicy – 4 cm i 8 cm wysokości. Otwór w połowie wypełniano warstwą torfu ze szczepionką, wykonaną tak jak opisano w rozdz. 3.1.2, zawierającą struktury propagacyjne szczepów saprotroficznych *F. oxysporum* oraz *F. oxysporum* f.sp. *cepae* (Fspc), po czym zasypywano glebę.

W 30. dniu od posadzenia rozsady, na części poletek, z drugiej strony łodyg rzekomych pora, w analogiczny sposób wprowadzano do gleby *P. terrestris* (Pt368). Poletka inokulowano w układzie przedstawionym w tabeli 2. Obiektami kontrolnymi były poletka: z wprowadzonym substratem bez grzybów; inokulowane tylko *P. terrestris* lub *F. oxysporum* oraz poletka inokulowane *P. terrestris* i chronione preparatem Topsinem M70 WP – w ilości 50 ml 0,1% roztworu pod jedną roślinę. Preparat aplikowano po 20 dniach od posadzenia rozsady.

Na przełomie sierpnia i września z każdego poletka pobierano po 60 roślin, które wazono. Stopień porażenia korzeni oceniono w ten sam sposób jak w doświadczeniu wazonowym (3.2.1). Z każdej rośliny wykopanej z poletek pobierano losowo do analizy mikologicznej po dwa korzenie.

3.2.3. Izolacja grzybów z korzeni

Izolację *Pyrenochaeta terrestris* i *Fusarium oxysporum* z powierzchni korzeni wykonano metodą popłuczyn według Mańki (1974). Z każdej zbiorczej próbki korzeni odważano 5 g porcję, którą wytrząsano w kolejnych dziesięciu kolbach Erlenmayera zawierających po 70 cm³ sterylnej wody. Do dziewiątej kolby dodawano 30 g sterylne- go piasku kwarcowego, ułatwiającego usunięcie z powierzchni korzeni grzybów anato- micznie z nimi niezwiązanych. Po wyjęciu korzeni z ostatniej płuczki suszono je na bibule. Pozostałe korzenie odkażano 20 s, w 0,1% NaClO, po czym płukano w sterylnej wodzie. Wszystkie korzenie cięto na 5 mm odcinki i wykładano na szalkach: 100 inoku- łów na półselektywną pożywkę Komada (1975) – dla identyfikacji *F. oxysporum*; oraz 100 na pożywkę z sorbozą i TBZ (podłoże selektywne dla *P. terrestris*). Wyrastające kolonie odszczepiano na skosy z PDA i oznaczono do gatunku.

3.2.4. Oddziaływania biotyczne pomiędzy *Pyrenochaeta terrestris* i *Fusarium oxysporum*

Wszystkie izolaty *F. oxysporum* uzyskane z korzeni pora w doświadczeniu polo- wym uznano za formy saprotroficzne. Określono je jako grzyby testowe. Grzybami testowanymi były: patogeniczny dla pora *P. terrestris*, a w przypadku kombinacji kon- trolnej również szczep *F. oxysporum* f.sp. *cepae*. Test wykonano na pożywce PDA w czterech powtórzeniach, każdorazowo w każdym roku badań dla wszystkich izolatów populacji *F. oxysporum*. Po 10 dniach odczytywano efekt biotyczny wg zasad i skali podanej przez Mańkę (1974, 1993). Za autorem metody przyjęto założenie, że ujemna wartość efektu biotycznego oznacza, że grzyb testowany (patogen) – *P. terrestris* lub *F. oxysporum* f.sp. *cepae* uzyskuje przewagę nad grzybem testowym (saprotrofem) – *F. oxysporum*. W tabelach ujęto średni wynik oddziaływania z 4 lat badań.

3.3. Ocena aktywności enzymatycznej

3.3.1. Hodowla grzybów

Do 100 ml kolbek, zawierających 50 cm³ płynnej pożywki Czapek Dox, wprowa- dzono po pięć 3 mm krążków kilkudniowej grzybni izolatów wymienionych w rozdzia- le 3.1.1, rosnących na pożywce PDA. Kolby wytrząsano codziennie przez 5 minut. Po 14 dniach użyto, przefiltrowanego przez bibulę przesącza pohodowlanego, do badania aktywności enzymatycznej izolatów.

3.3.2. Podłoża

W skład podłoży, zastosowanych do oceny aktywności poszczególnych enzymów, wchodziły: bufor fosforanowy, agar oraz właściwy dla danej reakcji substrat. Ilość zawartych w pożywce enzymów oznaczano, mierząc suwmiarką, w 30 powtórzeniach, szerokość powstałej w wyniku reakcji enzymatycznej wybarwionej strefy. Odpowiadającą tej szerokości ilość jednostek enzymatycznych (j. enz. – syntetyzowanych przez badany izolat grzyba) odczytywano z krzywych wzorcowych, w przeliczeniu na 1 cm^3 pożywki (rozdział 5.3.3, rys. 6).

Aktywność enzymów amylolitycznych

Do szalek Petriego o średnicy 9 cm rozlano po 25 cm^3 podłoża składającego się z $0,1 \text{ M}$ buforu fosforanowego, o $\text{pH}=6,0$ ($12,1 \text{ cm}^3$ $0,1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ i $78,9 \text{ cm}^3$ $0,1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$), zawierającego $0,2\%$ skrobi rozpuszczalnej i 2% agaru. Po zestaleniu składników – na szalkach wycięto po pięć otworów o średnicy 7 mm. Do każdego z nich odmierzone $0,1 \text{ cm}^3$ przesącza (rozdz. 3.3.1). Szalki przetrzymywano 24 godz. w temperaturze 25°C . Wyjęte z nich krążki z podłożem zanurzano w $0,05\%$ J_2 w KJ rozcieńczonym w 200 cm^3 wody destylowanej, aż do momentu zaobserwowania kontrastowo odbarwionej strefy wokół wyciętych otworów.

Aktywność enzymów proteolitycznych

Podłoże sporządzono jak w rozdziale 3.3.2, zastępując skrobię 1% żelatyną. Strefę wybarwienia wywoływano po 24 godz., zanurzając krążki w roztworze nasyconego siarczanu amonowego $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Aktywność enzymów celulolitycznych

$0,1 \text{ g}$ karboksymetylocelulozy (sól sodowa karboksymetylocelulozy) i $1,5 \text{ g}$ agaru rozpuszczono w 100 cm^3 $0,1 \text{ M}$ buforu fosforanowego. Po 16-godzinnej inkubacji w temperaturze 30°C – krążki zanurzano na 30 minut w $0,1\%$ roztworze czerwieni kongogo. Po przemyciu wodą destylowaną umieszczono je na 5 minut w 1 M roztworze NaCl , po czym na kolejne 5 minut w 5% kwasie octowym.

Podłoże do badania aktywności enzymów pektynolitycznych

W 100 cm^3 $0,1 \text{ M}$ buforu fosforanowego, o $\text{pH}=6,3$ (22 cm^3 $0,1 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$ i 78 cm^3 $0,1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$), rozpuszczono $0,5 \text{ g}$ pektyny (ester metylowy kwasu Poli D-galakturonowego) i 3 g agaru. Strefę wybarwienia mierzono po 4-godzinnym przetrzymywaniu szalek w temperaturze 30°C , po czym umieszczono je na 120 minut w $0,02\%$ roztworze tlenochlorku rutenu amoniakalnego, po wyjęciu przemyto wodą destylowaną.

3.3.3. Krzywe wzorcowe

Kontrolę doświadczenia przeprowadzono, wykorzystując enzymy o znanym mianie. Jej celem było sprawdzenie właściwego wykonania podłoża oraz sporządzenie krzywych wzorcowych, na podstawie których odczytano ilość enzymów zawartych w przesączu przygotowanym według metody opisanej w rozdziale 3.3.1.

Do otworów o średnicy 7 mm wyciętych w podłożach, opisanych w rozdziale 3.3.2, wlewano 0,1 cm³ buforu fosforanowego o pH=6.0, zawierającego 4 jednostki enzymatyczne (j.e.) 3,6 amylazy i 0,2 j.e. proteazy (preparat Panzytrat 10000, firmy Knoll AG). Pomiaru stref wybarwienia dokonano identycznie jak w opisie zamieszczonym w wyżej wymienionych rozdziałach.

Aktywność celulolityczną badano, wprowadzając do otworów 0,1 cm³ z 0,0255 j.e. celulazy, rozpuszczonej w 0,1 M buforze fosforanowym, o pH=6.0 (preparat Cellulase z grzyba *Trichoderma longibrachiatum*, firmy Fluka).

Pektynazę pochodzącą z grzyba *Aspergillus niger* (preparat Pectinase, firmy Fluka) rozpuszczono w 0,1 M roztworze buforu fosforanowego, o pH=6.3, otrzymując 12,65 j.e. w 1 cm³.

3.4. Test zgodności wegetatywnej

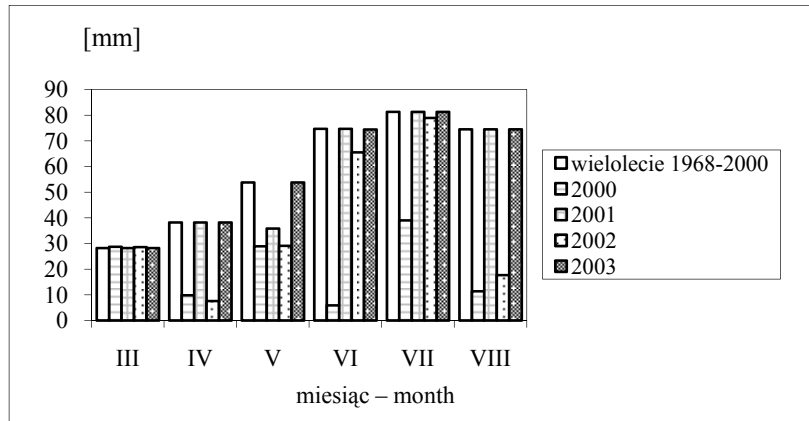
W teście zgodności wegetatywnej zastosowano kultury jednozarodnikowe 6 saprotroficznych szczepów *F. oxysporum* i patogenicznego szczepu *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. Z trzydniowych grzybni pobierano krawki o średnicy 5 mm, które umieszczano po 4 na szalkach z PDA, CAM (podłoża standaryzowane firmy Becton Dickinson) i pożywce BM (basal medium) sporządzonej wg Correl i in. (1987). Po 10 dniach inkubacji – z najmłodszych części kolonii pobierano inokula i umieszczano w 20 ponumerowanych punktach na pożywce minimalnej MM (minimal medium – podłoże BM z dodatkiem 1,6 g L-asparaginy, 60 g KClO₃ i 2 g NaNO₃ MM (Correl i in. 1987).

W trakcie wzrostu kolonii zapisywano: numery mutantów tworzących heterokariony, kombinacje, w których doszło do kojarzeń oraz numery mutantów zrewertowanych – kolonii, które po pewnym czasie ponownie wytworzyły obfitą grzybnię powietrzną. Mutanty tworzące heterokariony wyszczepiono na pożywkę MM i przechowywano w temp. 4°C. Mutanty „nit” zostały wyszczepione na trzy różne pożywki: BM (1) zawierającą 2 g NaNO₃, BM (2) z 0,5 g NaNO₂, oraz BM (3) z dodatkiem 0,2 g hypoksydantyny. Określano je zgodnie z zasadami podanymi przez Corella i in. (1987): mutanty nit 1 nie rosną na pożywce 1; mutanty nit 3 rosną na pożywce trzeciej; mutanty nit M rosną na pożywce 2.

W celu określenia testerów izolatowych mutanty tworzące najefektywniej heterokariony w obrębie tego samego izolatu – poddano kojarzeniu, z każdym zestawiając je po 2 na szalce. Uzyskane testery zestawiano analogicznie w kojarzeniu międzyizolatowym, ponownie oceniając zdolność tworzenia heterokarionów. Izolaty *F. oxysporum*, których testery posiadały opisywaną powyżej zdolność, zaliczano do tej samej grupy zgodności wegetatywnej.

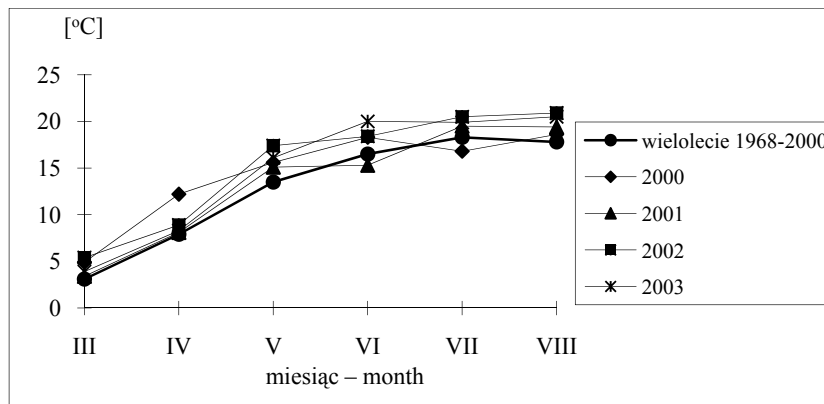
IV. PRZEBIEG POGODY W OKRESIE TRWANIA DOŚWIADCZENIA

Charakterystykę przebiegu pogody w miesiącach wegetacji roślin (rys. 1, 2) opracowano na podstawie zapisów średniej miesięcznej temperatury i średnich miesięcznych sum opadów uzyskanych w Stacji Meteorologicznej III rzędu w Psarach i porównano ze średnimi wieloletnimi dla Wrocławia, z lat 1968–2000.



Rys. 1. Miesięczne sumy opadów w sezonach wegetacyjnych 2000–2003 r. w porównaniu z wieloleciem 1968–2000

Fig. 1. Rainfalls in vegetative seasons in comparison at perennial mean 1968–2000



Rys. 2. Średnia miesięczna temperatura w sezonach wegetacyjnych 2000–2003 r. w porównaniu z wieloleciem 1968–2000

Fig. 2. Average air temperature in vegetations seasons 2000–2003 in comparison at perennial mean 1968–2000

W latach 2000 i 2002 panowała susza. Roczne sumy opadów w badanych okresach były niższe od sumy opadów z wielolecia, o około 70% w 2000 r. i 30% w 2002 r. W 2001 r. roślinom brakowało wody jedynie w maju, w okresie sadzenia na poletkach. W 2003 r. poziom opadów nie odbiegał od średniej wieloletniej.

Średnia miesięczna temperatura w okresach wegetacyjnych 2000–2003 r. była wyższa od średniej wieloletniej odpowiednio o: 1,6; 0,6; 2,4 i 1,9°C. Były to lata charakteryzujące się ciepłą wiosną i upalnym latem – z wyjątkiem zimnego czerwca i lipca 2001 r.

V. WYNIKI BADAŃ

5.1. Specjalizacja izolatów *Fusarium oxysporum*

Szalkowy test infekcyjny z udziałem izolatów *F. oxysporum*, uzyskanych z korzeni pora niewykazujących objawów chorobowych, potwierdził brak przystosowań pasożytniczych ocenianych kultur w stosunku do testowanych gatunków roślin. Grzyby te, w niewielkim stopniu, wywoływały zmiany chorobowe. Jedynie *F. oxysporum* – Fspc silnie uszkadzał korzenie pora i cebuli oraz w nieznacznym stopniu porażał korzenie pomidora (tab. 1). Na podstawie uzyskanych wyników założono, że z badanych izolatów *F. oxysporum* tylko „Fspc” będzie zdolny do wywołania objawów chorobowych na testowanych roślinach pora. Pozostałe izolaty uznano za formy saprotroficzne.

Tabela 1
Table 1

Indeks porażenia korzeni przez izolaty *Fusarium oxysporum*
Disease index of roots infected by isolates *Fusarium oxysporum*

Gatunek rośliny Species of plant	Izolat – Isolate						
	F2	F4	F13	F345	F675	F2567	Fspc
Por – Leek	0,01a*	0,06a	0,02a	0,04a	0,05a	0a	3,35 b
Cebula – Onion	0,18a	0,1a	0,15a	0,08a	0,08a	0,02a	3,61b
Ogórek – Cucumber	0a	0a	0,01a	0,1a	0,02a	0,01a	0,1a
Pomidor – Tomato	0,0a	0,0a	0,04a	0,06a	0,1a	0,02a	0,45c
Papryka – Pepper	0,13a	0,4a	0,06a	0,08a	0,06a	0,04a	0,023a
Salata – Lettuce	0,02a	0,03a	0,034a	0,01a	0,03a	0,03a	0,01a

* Wartości w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie dla $\alpha=0,05$, test Tukeya
Values in columns, followed by the same letters are not significantly different at $\alpha=0,05$, Tukey's test

5.2. Wpływ saprotroficznych szczepów *Fusarium oxysporum* na wzrost i plonowanie pora zakażanego przez *Pyrenochaeta terrestris*

5.2.1. Doświadczenie wazonowe

Rośliny uprawiane w obecności saprotroficznych szczepów *F. oxysporum* były wyższe i w znacznie lepszej kondycji zdrowotnej niż rośliny kontrolne, rosnące na podłożu praktycznie pozbawionym mikroorganizmów (tab. 2). Wszystkie szczepy *F. oxysporum*, z wyjątkiem F675, wyraźnie stymulowały wzrost pora. W doniczkach z łączną aplikacją

obydwu testowanych gatunków *P. terrestris* i *F. oxysporum* zaobserwowano istotne ograniczenie objawów różowej zgnilizny korzeni. Rosnące tam rośliny, mimo znacznej redukcji korzeni, w niektórych przypadkach były znacznie wyższe od uprawianych w podłożu bez grzybów. Najbardziej efektywnie oddziaływały na wzrost pora izolaty: F4, F2567 i F13. Jednak tylko w obecności szczepów F4 i F2567 porażenie korzeni przez *P. terrestris* było najniższe. Rośliny inokulowane, zarówno niezależnie, jak i łącznie, przez *P. terrestris* i *F. oxysporum* f. sp. cepae (Fspc), wykazywały objawy chorobowe statystycznie na takim samym poziomie (tab. 2).

Tabela 2

Table 2

Liczba kolonii *Pyrenochaeta terrestris* i *Fusarium oxysporum* reizolowanych z korzeni pora uprawianego w wazonach, indeks chorobowy różowej zgnilizny korzeni oraz średnia wysokość roślin

The re-isolates of *Pyrenochaeta terrestris* and *Fusarium oxysporum* obtained from roots of leek in pot experiment, disease index of pink root rot and mean height of plants

Inokulum Inoculum	Wysokość roślin Height of plants [cm]	Indeks chorobowy Disease index	Reizolaty – Re-isolates [%]	
			<i>F. oxysporum</i>	<i>P. terrestris</i>
<i>F. oxysporum</i> :				
F2	22,0a	0	95	
F4	23,3a	0	96	
F13	24,1b	0	93	1
F345	21,2a	0	89	
F675	19,7c	0	97	
F2567	21,8a	0	96	
Fspc	15,2d	3,01a**	95	
Por bez szczepionki Leek without vaccine	18,6c	0	3	0
<i>P. terrestris</i> i (and) <i>F. oxysporum</i> :				
P368	10,27d	3,12a	2	91
F2 + Pt368	19,9c	2,34b	69	21
F4 + Pt368	23,07a	2,0c	78	16
F13+ Pt368	21,5a	2,46b	73	27
F345 + Pt368	18,9c	2,29b	84	19
F675 + Pt368	19,8c	2,28b	73	22
F2567 + Pt368	22a	1,98c	79	14
Fspc + Pt368	12d	3,23a**	69	28

* Wartości w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie, test Tukeya dla $\alpha=0,05$

Values followed by the same letters within the columns are not significantly different at $\alpha=0,05$, Tukey's test

**Porażenie korzeni przez *F. oxysporum*

Infestation of roots by *F. oxysporum*

Z korzeni roślin uprawianych w podłożu zawierającym obydwie gatunki grzybów reizolowano znacznie mniejszą liczbę kolonii *P. terrestris* niż z kombinacji zakażanej tylko tym patogenem (tab. 2). Najmniej wyosobniono *P. terrestris* z doniczek inokulowanych łącznie ze szczepami F4 lub F2567. We wszystkich wariantach doświadczenia – z korzeni pora bardzo licznie reizolowano *F. oxysporum* (od 79 do 97% izolatów). We wszystkich kombinacjach uzyskano nieliczne grzyby rodzaju *Penicillium*, wśród których dominowały: *Penicillium chrysogenum* i *P. velutinum* oraz rzędu *Mucorales*: *Mucor hiemalis*, *Absidia glauca* i *Rhizopus niger*.

5.2.2. Doświadczenie polowe

Izolacja grzybów z gleby

We wszystkich latach doświadczenia *Pyrenochaeta terrestris* był obecny w glebie. Corocznie, na pożywce Sneha i in. (1974), uzyskiwano około 3% izolatów tego gatunku (tab. 3). Dwukrotnie więcej wyosobniono *Fusarium oxysporum*. Inne gatunki tego rodzaju: *F. solani*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum* i *F. equiseti* były izolowane mniej licznie. W glebie dominowały grzyby rodzaju *Penicillium*. Stosunkowo liczne były: *Chloridium chlamydosporis*, *Coniothyrium fuckelii*, *Alternaria alternata* i *Cladosporium* spp. W dwóch pierwszych latach badań wyosobniono również *Rhizoctonia solani*, a w roku 2001 na poziomie ponad 3% – *R. cerealis*. Gatunek ten, w latach 2002–2003, był reprezentowany tylko przez pojedyncze izolaty.

W kolejnych latach doświadczenia izolowano coraz mniej grzybów z rodzaju *Trichoderma*. Gatunki tego rodzaju były najliczniej reprezentowane w latach 2000 i 2001 – około 9% wszystkich uzyskanych kolonii grzybów, a w 2002 i 2003 r. na poziomie poniżej 3%. Z rzędu *Mucorales*, najwięcej izolatów – ponad 5% z wszystkich uzyskanych, było w glebie w 2003 r. Wśród nich, we wszystkich latach badań dominował *Zygorhynchus moelleri*. Pozostałe 10 gatunków występowało mniej licznie (tab. 3).

Wpływ *Fusarium oxysporum* na rozwój różowej zgnilizny korzeni i plonowanie pora

Wprowadzone do gleby szczepionki miały istotny wpływ na zdrowotność roślin (tab. 4). Rośliny kontrolne, zakażone wprowadzonym do gleby szczepem *P. terrestris* – P368, we wszystkich latach badań wykazywały objawy chorobowe na poziomie ponad dwukrotnie wyższym niż rośliny infekowane przez patogen naturalnie bytujący w glebie. Najsilniejsze symptomy choroby zanotowano w roku 2000, w pozostałych latach uszkodzenie korzeni było mniejsze.

Wprowadzony do gleby *F. oxysporum* miał nie tylko wpływ na ograniczenie intensywności choroby, ale również na plonowanie roślin na poletkach kontrolnych, na których nie wprowadzano *P. terrestris* (rys. 3). Zwyzka plonu w poszczególnych latach zależała od zastosowanego szczepu. W 2003 r. z poletek, na których wprowadzono szczepy: F346, F675 i F2567, plony były wyższe o około 8–10% od plonów roślin uprawianych na glebie bez szczepionek. Tylko w przypadku *F. oxysporum* – F2 plon był niski i porównywalny z plonem z poletka zakażonego przez *F. oxysporum* f. sp. *cepae*.

Tabela 3
Table 3

Grzyby wyizolowane z gleby przed rozpoczęciem doświadczenia polowego
The fungi isolated from soil before beginning field experiment

Gatunki grzybów Species of fungi	Rok – Year			
	2000	2001	2002	2003
<i>Absidia glauca</i> Hagem	2	6	1	5
<i>Acremonium atrum</i> Corda	2	9		12
<i>Actinomucor elegans</i> (Eidam) Benjamin et Hesseltine	3	8	1	6
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissler	19	22	32	29
<i>Apiospora montagnei</i> Sacc.	8		1	2
<i>Aspergillus candidus</i> Link	1	1		
<i>Aspergillus flavus</i> Link	1		1	9
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	8	3		17
<i>Aspergillus niger</i> Van Tieghem		2	6	
<i>Aspergillus sulphureus</i> (Fresen.) Thom and Church	11		9	5
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	3			3
<i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetz.	5	17	11	23
<i>Chaetomella ochracea</i> Torrend	3		2	
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze ex Fries		2		8
<i>Chaetomium elatum</i> Kunze		2	1	
<i>Chloridium chlamydosporis</i> (van Beyma) Hughes	11	16	17	22
<i>Chrysosporium pannorum</i> (Link) Hughes	9		3	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fres.) de Vries	12	13	19	22
<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link ex S.F. Gray	14	11	16	12
<i>Cladosporium macrocarpum</i> Preuss	8	12		12
<i>Coniothyrium fuckelii</i> Sacc.	19	24	31	12
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	4	9	16	13
<i>Drechslera biseptata</i> (Sacc. ex Roum.) Richardson ex Fraser			1	1
<i>Fusarium avenaceum</i> (Corda ex Fr.) Sacc.	8		3	1
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G. Smith) Sacc.		9	5	18
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	1		9	7
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht	32 (6,3)*	26 (5,0)	36 (7,0)	34 (6,0)
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.	14		22	
<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb.	2	13	6	9
<i>Gliocladium catenulatum</i> Gilman et Abbott			2	6
<i>Gliocladium nigro-virescens</i> van Beyma	3	5		4
<i>Gongronella butleri</i> (Lendner) Peyronel et Dal Vesco				13
<i>Humicola fuscoatra</i> Traaen		4	7	10
<i>Humicola grisea</i> Traaen	11	4	7	
<i>Monodictys levis</i> (Wiltsh.) Hughes			4	1
<i>Mortierella hygrophila</i> Linnem.		1		8
<i>Mucor circinelloides</i> van Tieghem	5	6		
<i>Mucor griseo-cyanus</i> Hagem	2		1	9
<i>Mucor hiemalis</i> Wehmer	5		2	11

Tabela 3 cd.
Table 3 cont.

1	2	3	4	5
<i>Mucor spinosus</i> van Tieghem		6	1	
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berc. et Br.) Petch.		3		6
<i>Paecilomyces marquandii</i> (Masse) Hughes	2		2	
<i>Papularia rosea</i> Greben et Kuznetz		6	3	8
<i>Papulaspora polyspora</i> Hotson	5		7	9
<i>Penicillium claviforme</i> Bainier	4		2	1
<i>Penicillium funiculosum</i> Thom	21	11	44	12
<i>Penicillium herquei</i> Bainier et Sartory	4			23
<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge	25	3	14	22
<i>Penicillium lilacinum</i> Thom	13	18		7
<i>Penicillium notatum</i> Westling	8	17	11	1
<i>Penicillium roseo-purpureum</i> Dierck	13	32		5
<i>Penicillium urticae</i> Bainier		15	23	2
<i>Penicillium variabilae</i> Sopp.	8	29		4
<i>Penicillium velutinum</i> Westling	17		17	12
<i>Penicillium vermiculatum</i> Dangeard	18	1	9	8
<i>Penicillium waksmani</i> Zaleski	34	5	18	12
<i>Periconia macrospinoso</i> Lefeb. et A.G. Jonhson		11	9	
<i>Phoma eupyrena</i> Sacc.	4		4	3
<i>Phoma glomerata</i> (Cda) Wollenw. et Hochapf		8		1
<i>Pyrenochaeta terrestris</i> Hansen Gorenz Walker et Larson	9 (2,0)	17 (3,2)	15 (2,9)	18 (3,2)
<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> Schneider et Gerlach	3		5	
<i>Rhizoctonia cerealis</i> van der Hoeven		21	2	1
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	11	14		
<i>Rhizopus arrhizus</i> Fischer		4	1	3
<i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenb.	1	5	1	5
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (Sacc.) Bainier		1	2	
<i>Sordaria fimicola</i> (Roberge) Ces. et de Not.	2		5	6
<i>Melanopsamma pomiformis</i> (Pers. ex Fr.) Sacc.	1	3	4	
<i>Thysanophora penicillioides</i> (Roum) Kendrick		2		1
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	21	15	9	
<i>Trichoderma koningii</i> Oud.	9		6	4
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link ex Pers.) Rifai		11		11
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex S.F. Gray	12	16	5	
<i>Ulocladium botrytis</i> Preuss		4	8	4
<i>Ulocladium atrum</i> Preuss	1		1	4
<i>Verticillium lateritium</i> (Ehrenb. ex Fr.) Rabenh.	4	6	8	2
<i>Zygorhynchus moelleri</i> Vuillemin	5	6		6
Inne – Another	12	19	13	19
Razem – Total	446	491	470	512

*Procentowy udział izolatów ujęto w nawiasie
Percent of isolates in brackets

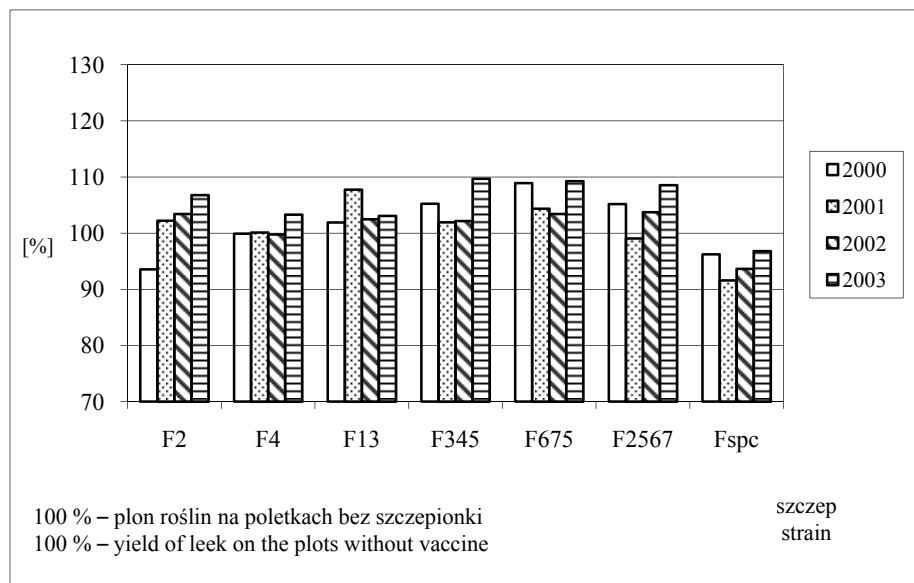
Tabela 4
Table 4

Indeks porażenia korzeni pora przez *Pyrenochaeta terrestris* w doświadczeniu polowym
Infestation index of leek roots with *Pyrenochaeta terrestris* in the field experiment

Poletka inokulowane Plots inoculated	Rok – Year			
	2000	2001	2002	2003
<i>F. oxysporum</i> :				
F2	0,86a*	0,77a	0,53a	0,47a
F4	0,64a	0,54b	0,56a	0,46a
F13	0,54b	0,59a	0,61a	0,51a
F345	0,69a	0,60a	0,55a	0,43a
F675	0,57b	0,43	0,50a	0,40a
F2567	0,79a	0,66a	0,62a	0,47a
Fspc**	0,35e	0,45e	0,31e	0,32e
Por bez szczepionki Leek without vaccine	0,99a	0,85a	0,88b	0,84b
<i>P. terrestris</i> i (and) <i>F. oxysporum</i> :				
P368	2,53c	2,28c	2,15c	2,21c
F2 + Pt368	1,34d	1,12d	1,28d	1,17d
F4 + Pt368	1,38d	1,14d	1,33d	1,18d
F13+ Pt368	1,27d	1,06d	1,29d	1,03d
F345 + Pt368	1,25d	1,04d	1,24d	1,02d
F675 + Pt368	1,29d	1,09d	1,26d	0,9b
F2567 + Pt368	1,31d	1,18d	1,25d	1,00d
Fspc + Pt368	1,23d	1,19d	1,2d	1,16d
Pt386 + Topsin	1,38d	1,24d	1,04d	1,12d

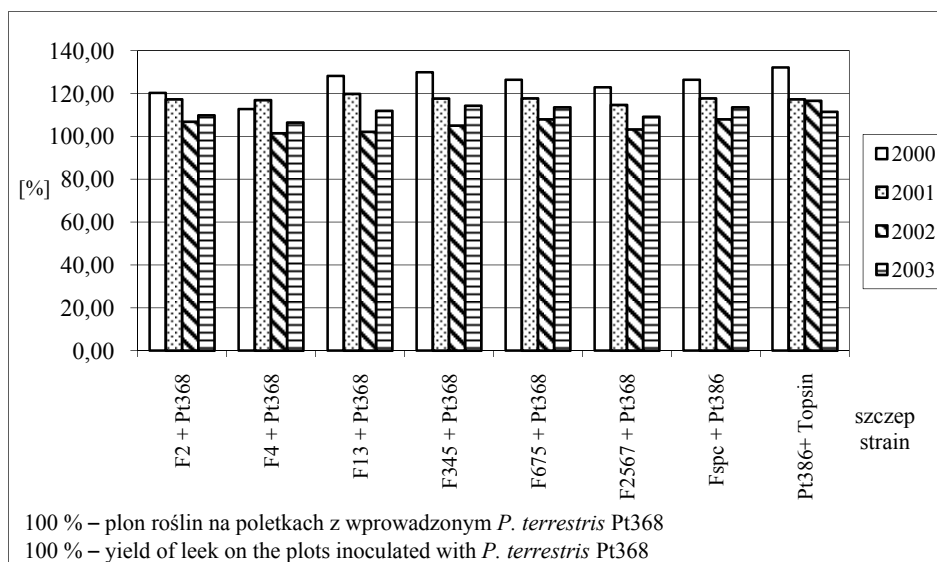
*Wartości w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie, test Tukeya dla $\alpha=0,05$
Values followed by the same letters within the columns are not significantly different at $\alpha=0,05$, Tukey's test
**Porażenie korzeni przez *F. oxysporum* – Infestation of roots by *F. oxysporum*

Znacznie lepszy efekt ochronny, w postaci istotnej redukcji stopnia uszkodzenia korzeni przez *P. terrestris* oraz związanej z tym – 20–30% wyżki plonów, uzyskano na obiektach z wprowadzonymi do gleby saprotroficznymi formami *F. oxysporum* (tab. 4, 5 i rys. 4). Szczepionki zawierające żywe struktury wszystkich wybranych do doświadczenia szczepów najlepiej ograniczały różową zgniliznę korzeni w pierwszym roku uprawy, najsłabiej w roku 2002, szczególnie w przypadku szczepów *F. oxysporum*: F4, F13 i F2567.



Rys. 3. Wpływ szczepionki *Fusarium oxysporum* na plonowanie pora na poletkach nieinokulowanych *Pyrenochaeta terrestris* w latach 2000–2003

Fig. 3. Influence of *Fusarium oxysporum* vaccine on the yield of leek on plots non infected with *Pyrenochaeta terrestris* in the years 2000–2003



Rys. 4. Wpływ szczepionki *Fusarium oxysporum* na plonowanie pora na poletkach inokulowanych *Pyrenochaeta terrestris*, w latach 2000–2003

Fig. 4. Influence of *Fusarium oxysporum* vaccine on the yield of leek on plots infected with *Pyrenochaeta terrestris* in the years 2000–2003

Tabela 5
Table 5

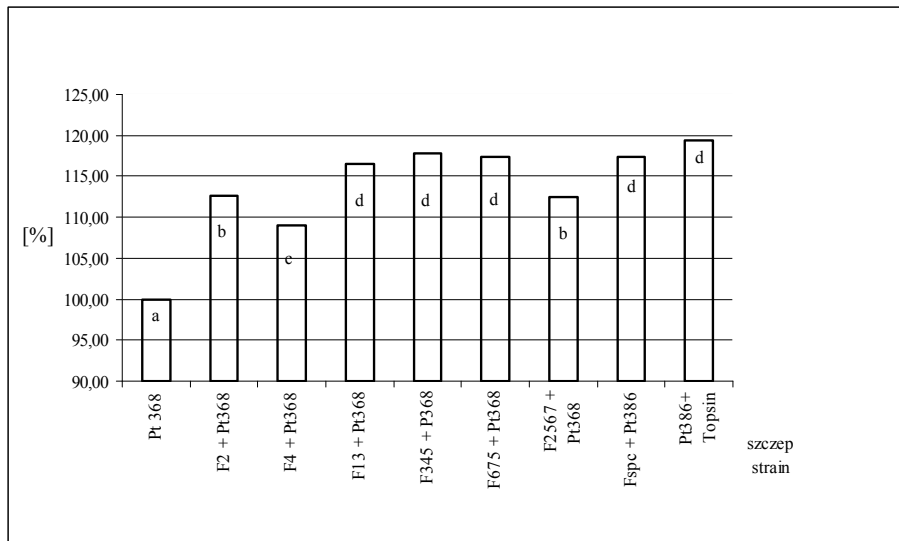
Plony pora [t ha⁻¹]
Yield of leek [t ha⁻¹]

Szczepionka Vaccine	Rok – Year			
	2000	2001	2002	2003
<i>F. oxysporum</i> :				
F2	28,05a*	33,61a	33,10a	34,27a
F4	29,93b	32,93b	31,91b	33,16a
F13	30,50b	34,15a	32,80a	33,09a
F345	31,50c	33,50a	32,72a	35,21b
F675	32,64c	34,33a	33,10a	35,07b
F2567	31,48c	32,56b	33,24a	34,84a
Fspc	28,80a	30,10c	29,87c	31,07c
Por bez szczepionki Leek without vaccine	29,93b	32,87b	32,01a	32,1c
<i>P. terrestris</i> i (and) <i>F. oxysporum</i> :				
P368	22,71d	27,22d	27,69d	29,41d
F2 + Pt368	27,32e	31,92e	29,6c	32,38c
F4 + Pt368	25,60f	31,80e	28,13d	31,30c
F13+ Pt368	29,14b	32,59b	28,33d	32,93a
F345 + Pt368	29,49b	32,01b	29,10c	33,65a
F675 + Pt368	28,87a	32,03b	29,98c	33,40a
F2567 + Pt368	27,90a	31,24e	28,66d	32,21c
Fspc + Pt368	23,99d	27,46d	27,3d	29,13d
Pt386 + Topsin	30,01b	31,90e	32,30a	32,78c

*Wartości w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie dla $\alpha=0,05$, test Tukeya
Values followed by the same letters within the columns are not significantly different at $\alpha=0,05$, Tukey's test

W okresie 4-letniego doświadczenia, spośród zastosowanych szczepów, najefektywniej konkurowały z *P. terrestris* saprotroficzne formy *F. oxysporum*: F13, F345 i F675 (rys. 5). Grzyby te wprowadzone do gleby działały równie skutecznie jak preparat chemiczny, pozwalając osiągnąć przeciętne plony na poziomie zbliżonym do uzyskiwanych z poletek chronionych chemicznie Topsinem. Co interesujące, również patogeniczny dla pora *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, wprowadzony do gleby wraz z *P. terrestris*, na równi z formami saprotroficznymi, istotnie ograniczał poziom zachorowań na różową zgniliznę korzeni (rys. 4 i 5).

Poziom ochrony zależał w znacznej mierze od przebiegu pogody, o czym świadczy bardziej zmienny poziom redukcji plonów na poletkach z wprowadzanymi szczepionkami, w poszczególnych latach badań, w porównaniu ze stabilniejszym, ochronnym działaniem Topsinu, szczególnie w latach 2001–2003 (rys. 4).



*Kolumny oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie, test Tukeya dla $\alpha = 0,05$
 The columns, followed by the same letters are not significantly different at $\alpha = 0,05$, Tukey's test

Rys. 5. Wpływ szczepionki *Fusarium oxysporum* na plony pora na poletkach inokulowanych *Pyrenochaeta terrestris* (średnie z 2000–2003)

Fig. 5. The influence of vaccine *Fusarium oxysporum* on yields of the leek on the plots infected with *Pyrenochaeta terrestris* (means from 4 years)

Izolacja grzybów z korzeni

Z zewnętrznych tkanek korzeni pora uprawianego na poletkach z wprowadzanymi saprotroficznymi szczepami *F. oxysporum* reizolowano od 48 do około 70% grzybów tego gatunku (tab. 6). W większości kombinacji z korzeni inokulowanych łącznie przez obydwie testowane gatunki grzybów – *F. oxysporum* wyosabniano o około 10% mniej licznie niż przy wprowadzaniu tylko jednego z komponentów. Z korzeni roślin podlewanych Topsinem, w porównaniu do innych kombinacji, tam gdzie wprowadzano do gleby obydwie gatunki grzybów, *F. oxysporum* izolowano nieznacznie mniej licznie. Na poletkach naturalnie zasiedlonych przez *F. oxysporum* udział izolatów tego gatunku na powierzchni korzeni był bardzo duży – około 40%. Tylko w 2000 r. uzyskane izolaty stanowiły zaledwie 24% ogółu uzyskanych kolonii.

Na poletkach, na których nie wprowadzano szczepionek, z korzeni pora, wyosobniano około 4–5% izolatów zidentyfikowanych jako *P. terrestris*. Z poletek sztucznie inokulowanych liczba wyhodowanych z korzeni grzybów tego gatunku zawsze przekraczała 10%. Procentowy udział uzyskiwanych kolonii był zmienny i w znacznej mierze zależał od warunków pogody. Najmniej reizolowano grzyba w 2001 r., co mogło mieć związek z trudnymi warunkami wilgotnościowymi panującymi w glebie w okresie regeneracji systemu korzeniowego. Nieznacznie liczniej *P. terrestris* był obecny w korzeniach w 2003 r. W pozostałych dwóch latach udział patogenu, w zewnętrznych tkankach korzeni w stosunku do innych grzybów, przeciętnie wynosił 20–28% (tab. 6).

Tabela 6
Table 6

Procentowy udział *Pyrenochaeta terrestris* (Pt) i *Fusarium oxysporum* (F)
wyizolowanych z zewnętrznych tkanek korzeni pora
Percent of *Pyrenochaeta terrestris* (Pt) and *Fusarium oxysporum* (F)
isolated from external tissues of roots of leek

Szczepionka Vaccine	Rok – Year							
	2000		2001		2002		2003	
	Pt	F	Pt	F	Pt	F	Pt	F
<i>F. oxysporum</i> :								
F2	1,3	48,3	3,2	46,5	5,9	49,3	6,4	57,4
F4	5,0	51,6	6,0	43,5	4,2	52,1	5,7	55,6
F13	6,4	52,9	2,3	59,1	5,3	61,6	8,3	46,3
F345	6,9	62,7	3,4	60,2	8,3	57,7	12,9	57,0
F675	8,1	53,9	4,1	68,4	5,2	63,5	2,3	66,7
F2567	5,3	62,3	8,1	64,2	3,9	58,5	2,2	62,0
Fspc	5,1	51,3	10,8	57,4	3,3	68,5	2,2	59,2
Por bez szczepionki Leek without vaccine	4,0	24,2	4,3	42,9	5,8	42,6	5,0	46,0
<i>F. oxysporum</i> i (and) <i>P. terrestris</i> :								
P368	22,8	42,1	14,3	39,8	27,9	43,4	15,1	59,0
F2 + Pt368	19,1	41,6	17,0	45,8	23,0	41,5	16,4	57,6
F4 + Pt368	17,4	43,7	15,0	42,6	24,0	44,9	16,0	60,0
F13+ Pt368	20,9	49,0	15,0	47,2	24,3	58,1	17,7	62,3
F345 + Pt368	22,8	51,2	17,0	58,2	25,7	62,2	19,1	51,3
F675 + Pt368	24,0	51,9	21,0	52,3	25,9	71,8	29,9	47,5
F2567 + Pt368	26,4	49,9	19,0	47,0	23,9	55,3	11,0	49,0
Fspc + Pt368	26,0	48,2	18,0	49,1	23,8	64,6	15,5	59,4
Pt386 + Topsin	18,1	42,9	15,2	41,8	19,9	39,4	12,5	47,1

Znacznie mniej izolatów *P. terrestris* i *F. oxysporum* uzyskano z wewnętrznych tkanek korzeni. We wszystkich kombinacjach procentowy udział *P. terrestris* izolowanego zarówno z korzeni roślin rosnących na glebie naturalnie zainfekowanej, jak i sztucznie zakażanych, był na zbliżonym poziomie (1–3%). Najwięcej izolowano *P. terrestris* w 2001, a najmniej w ostatnim roku badań (tab. 7).

Saprotroficzne szczepy *F. oxysporum* wnikały do wnętrza korzeni równie licznie jak *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. Znacznie mniej izolatów *F. oxysporum* było w tkankach roślin łącznie zakażanych z *P. terrestris* niż w korzeniach roślin rosnących na polatkach, na których wprowadzano do gleby tylko *F. oxysporum*. Topsin ograniczył w znacznie większym stopniu udział obydwu testowanych gatunków grzybów wewnątrz korzeni niż na zewnętrznych tkanek (tab. 6 i 7).

Tabela 7
Table 7

Procentowy udział *Pyrenochaeta terrestris* (Pt) i *Fusarium oxysporum* (F)
wyizolowanych z wewnętrznych tkanek korzeni pora
Percent of *Pyrenochaeta terrestris* (Pt) and *Fusarium oxysporum* (F)
isolated from internal tissue of roots of leek

Szczepionka Vaccine	Rok badań – Year							
	2000		2001		2002		2003	
	Pt	F	Pt	F	Pt	F	Pt	F
<i>F. oxysporum</i> :								
F2	1,3	16,6	1,2	15,8	1,9	21,5	1,3	17,6
F4	1,0	13,7	2,0	16,7	1,3	24,9	1,8	10,0
F13	1,4	19,0	1,1	19,3	1,4	18,1	1,3	12,1
F345	0,8	18,2	0,9	18,2	1,3	22,2	2,1	11,3
F675	1,1	19,9	1,1	22,3	1,9	21,8	1,3	13,7
F2567	1,3	19,9	2,1	17,0	2,0	19,4	1,2	18,8
Fspc	1,1	18,3	1,8	19,1	1,3	24,6	1,2	29,4
Por bez szczepionki Leek without vaccine	1,3	12,4	1,3	12,9	1,1	12,1	0,7	11,0
<i>P. terrestris</i> i (and) <i>F. oxysporum</i> :								
P368	2,8	16,1	4,3	19,8	2,6	23,4	1,1	18,0
F2 + Pt368	2,1	14,3	3,1	16,5	2,1	19,3	1,4	17,4
F4 + Pt368	2,4	11,5	3,2	13,6	2,0	12,2	1,0	15,6
F13+ Pt368	2,9	12,9	3,8	19,1	3,1	11,7	1,7	16,3
F345 + Pt368	3,0	12,7	3,7	10,2	3,5	17,7	1,1	17,0
F675 + Pt368	2,2	13,9	3,8	9,4	3,1	13,5	2,9	16,7
F2567 + Pt368	2,4	12,3	2,9	14,2	2,3	18,2	1,0	12,0
Fspc + Pt368	2,6	11,3	2,8	17,4	2,9	18,5	1,5	19,2
Pt386 + Topsin	1,1	7,9	2,2	10,8	2,6	15,2	0,7	9,1

5.3. Wyniki badań laboratoryjnych

5.3.3. Badania aktywności enzymatycznej

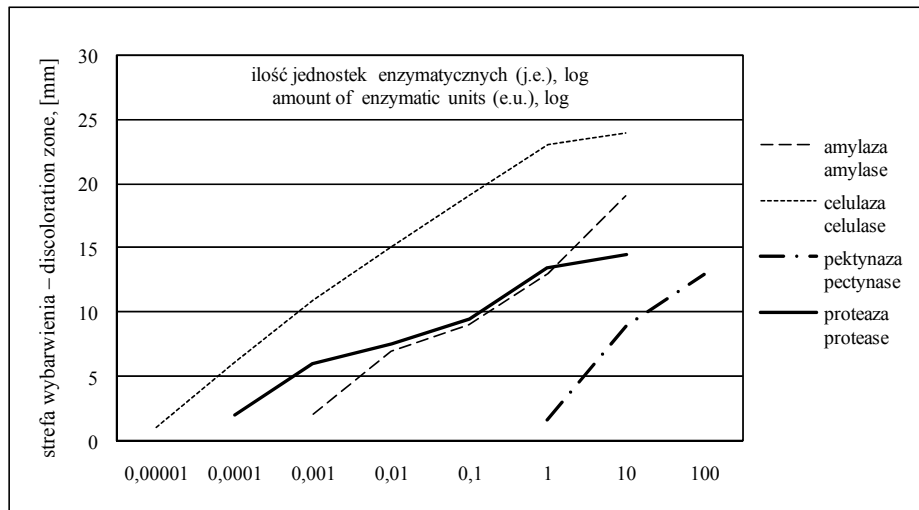
W większości przesączów otrzymanych z hodowli 8 testowanych szczepów stwierdzono obecność enzymów amylolitycznych, proteolitycznych, celulolitycznych i pektynolitycznych (tab. 8). Enzymy wydzielane były na różnym poziomie bez względu na gatunek czy przystosowania pokarmowe. Intensywność ich wytwarzania przetransponowano na jednostki enzymatyczne za pomocą krzywych wzorcowych (tab. 8, rys. 6).

Tabela 8
Table 8

Ilość jednostek enzymatycznych (j.e.) syntetyzowanych przez grzyby w 1 cm³ pożywki
The number of enzymic units (e.u.) synthesized by fungi in 1 cm³ of medium

Gatunek Species	Izolat Isolate	Amylaza Amylase		Proteaza Protease		Celulaza Celulase		Pektynaza Pectynase	
		strefa działania area of activity [mm]	j.e. e.u. x 10 ⁻³	strefa działania area of activity [mm]	j.e. e.u. x 10 ⁻³	strefa działania area of activity [mm]	j.e. e.u. x 10 ⁻³	strefa działania area of activity [mm]	j.e. e.u. x 10 ⁻³
Kontrola		9,1	182 a	7,3	14,7a	10,5	3,32a	4,4	4,82a
<i>P. terrestris</i>	Pt368	4,5	6,1 b	3,3	1,11b	4,5	0,114b	2,27	1,65b
<i>F. oxysporum</i>	F2	0,0	0,0	3,4	1,18b	2,9	0,0465c	0,0	0,0c
	F4	3,3	2,52 c	4,3	2,12c	3,4	0,0615d	0,0	0,0c
	F13	2,3	1,2 d	3,1	0,976b	3,6	0,0688d	0,0	0,0c
	F345	2,3	1,2 d	3,8	1,53c	2,4	0,0351c	0,0	0,0c
	F675	0,0	0,0	2,4	0,621d	2,6	0,0393c	3,1	2,77d
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>	F2567	0,0	0,0	2,8	0,804d	3,0	0,0491d	3,6	3,44d
	Fspc	4,0	4,22 b	2,4	0,621d	4,4	0,108b	5,3	6,63e

*Wartości w kolumnach oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie dla $\alpha=0,05$, test Tukeya
Values followed by the same letters within the columns are not significantly different at $\alpha=0,05$, Tukey s test



Rys. 6. Krzywe wzorcowe oddziaływania enzymatycznego
 Fig. 6. Standard curves of enzymes effect

Wszystkie badane grzyby wytwarzały duże ilości enzymów proteolitycznych. Istotne różnice w wydzielaniu proteaz stwierdzono u saprotroficznych szczepów *F. oxysporum*. Wśród nich najaktywniejsze były izolaty F4 i F345, natomiast najmniej enzymu produkował *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. Zdolności wytwarzania proteaz przez *P. terrestris* były na przeciętnym poziomie. Zastosowany w badaniach szczep wytwarzał prawie dwukrotnie więcej enzymu niż patogeniczny dla pora szczep *F. oxysporum* i istotnie mniej niż najaktywniejsze szczepy saprotroficzne tego gatunku (tab. 8). Taką samą zdolność do rozkładu karboksymetylocelulozy miały wybrane do doświadczenia patogeniczne grzyby *P. terrestris* i *F. oxysporum*. Najaktywniejsze pod względem wydzielania celulazy były saprofityczne szczepy: F4 i F13. Te same szczepy *F. oxysporum*, wraz z F345, produkowały duże ilości amylaz. Na znacznie większym poziomie ten sam enzym wydzielają *P. terrestris* i patogeniczny dla pora *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. Obydwa oceniane patogeny miały również zdolność rozkładu pektyn. Jednakże szczepy *F. oxysporum* wytwarzały znacznie więcej pektynaz niż *P. terrestris*. Szczególnie efektywnie tworzył pektynazy *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. Z badanych szczepów saprotroficznych, w warunkach doświadczenia, aż cztery nie posiadały zdolności pektynolitycznych (tab. 8).

5.3.4. Oddziaływanie biotyczne *Fusarium oxysporum* na *Pyrenochaeta terrestris*

Z oceny oddziaływania saprotroficznych szczepów *F. oxysporum* na *P. terrestris* wynika, że formy te w mniejszym lub większym stopniu ograniczały wzrost patogenu, o czym świadczyły większe od zera wartości indywidualnego efektu biotycznego (IEB) (tab. 9). Zależności pomiędzy badanymi formami *F. oxysporum* były bardziej złożone.

Wartość IEB przybierała wartości dodatnie, ujemne lub „0”. Natomiast średnia oddziaływań biotycznych saprotroficznych szczepów na *F. oxysporum* f. sp. *cepae* była wartością ujemną, co oznacza, że grzyby te były gorzej przystosowane do wzrostu w sztucznych warunkach niż patogen.

Tabela 9
Table 9

Indywidualny efekt biotyczny saprotroficznych szczepów *Fusarium oxysporum* na *Pyrenochaeta terrestris* i *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*
Individual biotic effect of saprotrophic strains of *Fusarium oxysporum* on *Pyrenochaeta terrestris* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*

Grzyby testowe Test fungi	Grzyby testowane Testing fungi	
	<i>P. terrestris</i>	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i>
<i>F. oxysporum</i> :		
F2	2	-1
F4	2	-3
F13	3	-2
F345	5	1
F675	4	0
F2567	2	1
Średnia – Mean	3	-0,7

Liczba izolatów *F. oxysporum sensu lato* uzyskiwanych z korzeni pora uprawianego w gruncie świadczyła o istotnej roli tego gatunku dla zdrowotności roślin. Indywidualny Efekt Biotyczny (IEB) był bardzo zróżnicowany i przyjmował wartości od 6 do -5. Natomiast Sumaryczny Efekt Biotyczny (SEB) był zawsze dodatni, zarówno w testach z udziałem, izolatów uzyskanych z głębszych, jak i powierzchniowych tkanek korzeni pora (tab. 10 i 11).

O skuteczności wnikania do korzeni pora, wprowadzanych do gleby kultur grzybów *F. oxysporum*, mogą świadczyć obliczone średnie wartości IBE (tab. 10 i 11). Zarówno w przypadku izolatów uzyskanych z wewnętrznych, jak i zewnętrznych tkanek korzeni pora, średni IBE we wszystkich kombinacjach był na poziomie zbliżonym do wartości uzyskanych w teście sporządzonym dla kultur wzorcowych ocenianych szczepów *F. oxysporum* (tab. 9). O zdolności wnikania do korzeni pora komponentów szczepionek świadczy również duża liczebność izolatów uzyskanych z tkanek, o IBE zbliżonym (tab. 10 i 11) do IBE uzyskanego dla poszczególnych saprotroficznych szczepów *F. oxysporum* (tab. 9).

Tabela 10
Table 10

Oddziaływanie biotyczne izolatów *Fusarium oxysporum sensu lato*, uzyskanych z zewnętrznych tkanek korzeni pora, na *Pyrenochaeta terrestris* Pt368. Rośliny zakażane przez *P. terrestris* i rosące w obecności saprofitycznych szczepów *F. oxysporum* (średnia z 4 lat)

Biotic effect of isolates of *Fusarium oxysporum sensu lato*, obtained from external tissues of root's of leek, on *Pyrenochaeta terrestris* Pt368. Plants infected by *P. terrestris* and growing in presence saprotrophic strains of *F. oxysporum* (mean from 4 years)

IBE	Szczepy – Strains <i>F. oxysporum</i>											
	F2		F4		F13		F345		F675		F2567	
	l.i. n.i.	GBE	l.i. n.i.	GBE	l.i. n.i.	GBE	l.i. n.i.	GBE	l.i. n.i.	GBE	l.i. n.i.	GBE
6	2	12	1	6	1	6	4	24	0	0	4	24
5	4	20	2	10	6	30	37	185	14	70	3	15
4	7	28	11	44	12	48	15	60	18	72	7	28
3	15	45	26	78	38	114	11	33	18	54	13	39
2	14	28	13	26	4	8	2	4	8	16	28	56
1	9	9	6	6	2	2	1	1	2	2	1	1
0	5	0	4	0	2	0		0	2	0	2	0
-1	5	-5	4	-4	1	-1		0		0	3	-3
-2	3	-6	3	-6		0	1	-2	3	-6	2	-4
-3	1	-3	1	-3	1	-3	1	-3	4	-12		0
-4	1	-4	1	-4	1	-4		0		0	3	-12
-5	1	-5		0		0	2	-10	1	-5	2	-10
SBE		119		153		200		292		191		134
Średni IBE (SBE/izolat) Means IBE (SBE/isolate)	1,8		2,1		2,9		3,9		2,7		2,0	

IBE – indywidualny efekt biotyczny – individual biotic effect; GBE – ogólny efekt biotyczny – general biotic effect
SBE – całkowity efekt biotyczny – summary biotic effect; l.i. – liczba izolatów – n.i – number of isolates

Tabela 11
Table 11

Oddziaływanie biotyczne izolatów *Fusarium oxysporum sensu lato*, uzyskanych z wewnętrznych tkanek korzeni pora, na *Pyrenochaeta terrestris* Pt368. Rośliny zakażane przez *P. terrestris* i rosnące w obecności saprofitycznych szczepów *F. oxysporum* (średnia z 4 lat)

Biotic effect of isolates of *Fusarium oxysporum sensu lato*, obtained from internal tissues of root's leek, on *Pyrenochaeta terrestris* Pt368. Plants infected by *P. terrestris* and growing in presence saprophytic strains of *F. oxysporum* (mean from 4 years)

IBE	Szczepy – strains <i>F. oxysporum</i>											
	F2		F4		F13		F345		F675		F2567	
	l.i. n.i.	GBE	l.i. n.i.	GBE	l.i. n.i.	GBE	l.i. n.i.	GBE	l.i. n.i.	GBE	l.i. n.i.	GBE
6	1	6		0	1	6		0	0	0		0
5	1	5	1	5		0	11	55	4	20		0
4	3	12	1	4		0	7	28	12	48	1	4
3	5	15	3	9	17	51	1	3	5	15	3	9
2	9	18	15	30	2	4	2	4	2	4	16	32
1	2	2		0	1	1	1	1		0	1	1
0	1	0	1	0		0		0	1	0		0
-1	1	-1		0	1	-1		0		0	1	-1
-2	1	-2		0		0	1	-2	1	-2		0
-3		0	1	-3	1	-3		0	1	-3		0
-4		0		0		0		0		0		0
-5	1	-5	1	-5		0	1	-5		0		0
SBE		50		40		58		84		82		45
Średni IBE (SBE/izolat) Means IBE (SBE/isolate)		2		1,7		2,5		3,5		3,2		2

IBE – indywidualny efekt biotyczny – individual biotic effect; GBE – ogólny efekt biotyczny – general biotic effect
SBE – całkowity efekt biotyczny – summary biotic effect; l.i. – liczba izolatów – n.i. – numer of isolates

5.3.5. Test zgodności wegetatywnej

Wyniki testu zgodności wegetatywnej wykazały, że przy wszystkich badanych izolatach heterokariony tworzyły się tylko na pożywce MMC. Najwięcej natomiast mutantów zrewertowanych obserwowano na pożywkach PDA i CAM (tab. 12). W przypadku *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, podczas selekcji genotypowej, uzyskano 3 mutanty nitM i 12 mutantów nit 1. Na podstawie częstości tworzenia heterokarionów para izolatów 20.I i 5.I została oznaczona jako tester grupy (tab. 13). W wyniku krzyżowania wykazano, że wszystkie grzyby wchodzące w skład testerów izolatowych, należące do form saprotroficznych *F. oxysporum*, tworzyły heterokariony z testerami formy pasożytniczej, co oznacza, że grzyby te należały do tej samej grupy zgodności wegetatywnej.

Tabela 12
Table 12

Liczba uzyskanych heterokarionów i mutantów zrewertowanych
Number of obtained heterocarions and reverted mutants

Podłoże Medium	Izolaty <i>F. oxysporum</i> – Isolates of <i>F. oxysporum</i>						
	Fspc	F2	F4	F13	F345	675	F2567
	Liczba odszczepionych heterokarionów Number of isolated heterocarions						
PDA							
MMC	15	3	4	2	3	8	11
CAM							
	Liczba mutantów zrewertowanych Number of reverted mutants						
PDA	5	6	9	7	6	4	11
MMC	7	3	4	6	7	4	5
CAM	11	5	3	7	7	8	9

Tabela 13
Table 13

Kojarzenie wewnątrzizolatowe pomiędzy uzyskanymi mutantami *F. oxysporum* f. sp. *cepae*
Association inside isolates between mutants *F. oxysporum* f. sp. *cepae*

Mutanty Mutants	2.I	3.I	5.I	7.I	10.I	12.I	13.I	20.I	12.II	14.II	15.II	17.II	18.II	20.II	11.III
	nit1	nit1	nitM	nit1	nit1	nit1	nit1	nitM	nit M	nit1	nit1	nit1	nit1	nit1	nit1
2.I nit1		x	h	x	x	x	x	h	h	x	x	x	h	x	x
3.I nit1			h	x	x	x	x	h	h	x	x	h	x	x	x
5.I nitM				h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h	h
7.I nit1					x	h	x	x	x	x	h	x	x	x	h
10.I nit1						x	h	h	h	x	x	x	x	x	x
12.I nit1							x	h	h	x	x	x	x	x	x
13.I nitM								h	h	h	h	h	h	h	h
20.I nitM									h	h	h	h	h	h	h
12.II nit1										x	x	h	x	h	x
14.II nit1											x	x	x	x	x
15.II nit1												x	x	h	x
17.II nit1													x	x	x

h – heterokarion – heterocarion

VI. DYSKUSJA

Wyniki analizy mikologicznej gleby, wykonywane corocznie przed rozpoczęciem doświadczeń infekcyjnych, potwierdziły, że *Pyrenochaeta terrestris* i *Fusarium oxysporum* to powszechnie występujące w glebie mikroorganizmy (Krupa i Dommergues 1979). Gatunki te nie dominowały w środowisku, jednak ich liczebność była zbliżona i na stabilnym poziomie. Wiadomo, że obydwa gatunki nie są ściśle wyspecjalizowane i mogą przeżywać w różnych niszach ekologicznych, co sprzyja ich kosmopolityzmowi (Lacy i Roberts 1982). Znacznie liczniej występowały w glebie grzyby rodzaju *Penicillium*, co można tłumaczyć ich nitro- i osmofilnością (Maciejowska-Pokacka 1971). Stosowane w uprawie pora wysokie nawożenie azotowe sprzyjało ich rozwojowi. W trakcie badań często izolowano *Cladosporium* spp. i *Alternaria alternata*. Gatunki te opadają, zazwyczaj, starzejące się bądź zniszczone tkanki, stąd też duża liczebność ich wysobnień w warunkach uprawy polowej (Baker 1965). W glebie, w drugim i trzecim roku uprawy pora, zanotowano spadek liczebności grzybów z rodzaju *Trichoderma*, być może z powodu wapnowania gleby. Zabieg ten wykonano przed rozpoczęciem doświadczeń, a uzyskany odczyn gleby, pH 7–7,2 nie sprzyjał rozwojowi tych grzybów (Shan-da Liu i Baker 1980).

Na poletkach naturalnie zainfekowanych, bez szczepionek, nie stwierdzono zależności pomiędzy poziomem inokulum *P. terrestris* w glebie a stopniem uszkodzenia korzeni przez ten patogen. W tym przypadku, na zróżnicowany poziom zachorowań roślin decydujący wpływ mogły mieć warunki atmosferyczne, w szczególności zmienne pod względem intensywności opady w maju i czerwcu. O wpływie opadów na rozwój różowej zgnilizny donosili Glynne (1965) oraz Coleman i Ellerbrock (1992), informując o istotnych różnicach w plonowaniu cebuli, uprawianej w warunkach zmiennej wilgotności podłoża, przy takiej samej liczbie uszkodzonych korzeni.

O nasileniu zachorowań może decydować poziom inokulum patogenu. Niekiedy jednak, pomimo znacznego nagromadzenia patogenu w podłożu, z nieznanymi przyczynami nie dochodzi do zachorowań roślin lub porażenie to nie jest skorelowane z liczebnością cząstek propagacyjnych w glebie (Ludwig i in. 1992). Przy dużej presji zakaźnej, jak to miało miejsce w przypadku doświadczeń infekcyjnych na sztucznych podłożach, wysokość roślin istotnie zależała od stopnia uszkodzenia korzeni przez *P. terrestris*. W warunkach naturalnych, w doświadczeniu o podobnym układzie, gdzie czynniki przyrodnicze środowiska odgrywały dużą rolę (Łacicowa i Orlikowski 1976), stopień uszkodzenia korzeni nie zawsze był proporcjonalny do wysokości plonu. Na skuteczność zakażenia mogły mieć wpływ: przystosowania pasożytnicze obecnych w glebie grzybów oraz obecność innych mikroorganizmów (Baker i Snyder 1965, Glynne 1965, Burke 1970, Scher i Baker 1980, Shan-da Liu i Baker 1980).

Bardzo duża liczebność izolatów *F. oxysporum*, uzyskiwanych z korzeni pora, wskazuje nie tylko na istotne znaczenie tego gatunku w przebiegu procesów chorobowych, ale również na ważną rolę tego grzyba w harmonijnym rozwoju tej rośliny (Postma i Rattink

1992, Sumner i in. 1997). Potwierdziły to przeprowadzone doświadczenia z kompleksowym wprowadzaniem do podłoża takich samych dawek inokulum *P. terrestris* i *F. oxysporum*. Obecność w podłożu sześciu wybranych do badań saprotroficznych izolatów *F. oxysporum* istotnie opóźniło rozwój różowej zgnilizny korzeni. Podobne, znane z literatury doświadczenia były przeprowadzane wyłącznie z patogenicznymi dla cebuli formami tego gatunku (Hess i Vaughan 1962, Kehr i in. 1962, Lacy i Roberts 1982). W takich przypadkach, w przeciwieństwie do prezentowanego doświadczenia, nie notowano istotnego zmniejszenia poziomu uszkodzeń powodowanych przez *P. terrestris*.

Niekiedy, *F. oxysporum* f. sp. *cepae* przy dużej liczebności cząstek propagacyjnych w środowisku uprawnym – nie powoduje objawów chorobowych mimo obecności roślin podatnych (Abawi i Lorbeer 1971c). Z innej pracy tych autorów (1972) wynika, że *F. oxysporum* stosunkowo szybko przerasta i kolonizuje tkanki korzeni cebuli, nie powodując jednak w tych organach uszkodzeń. Następnie grzyb przerasta do skróconej łodygi (piętki) i liści spichrzowych i tam zazwyczaj uwiadcniają się patologiczne zmiany, pod warunkiem że jest to forma patogeniczna. Z kolei *P. terrestris* powoduje uszkodzenia tkanek głównie w obrębie korzeni. Zmiany te u odmian podatnych uwiadcniają się w bardzo krótkim czasie od momentu infekcji (Struckmeyer i in. 1962). Prawdopodobnie, ta opisywana powyżej kolonizacja tkanek korzeni przez saprotroficzne formy *F. oxysporum* spowodowała ograniczenie porażenia pora przez *P. terrestris* zarówno w uprawie wazonowej, jak i w gruncie. Wcześniej wprowadzane do podłoża grzyby saprotroficzne wyraźnie blokowały dostęp patogenu, szczególnie do wewnętrznych tkanek korzeni, gdzie zanotowano znacznie większą redukcję kolonii *P. terrestris* niż w tkankach zewnętrznych.

Wykonane *in vitro* testy biotyczne potwierdziły, że izolaty *F. oxysporum* uzyskane z korzeni pora mogą przeciwstawić się rozwojowi *P. terrestris* na tyle skutecznie, aby uzyskać plony na poziomie zbliżonym do plonów uzyskiwanych z poletek kontrolnych. W badaniach tych nie analizowano wpływu innych gatunków grzybów na efekt biotyczny. Jednak przy tak dużej dominacji *F. oxysporum* w korzeniach pora grzyb ten w istocie decydował o końcowych wynikach testu. Według Mańki (1974) i Dorendy (1983) o stosunkach biotycznych decydują gatunki stanowiące łącznie około 70% uzyskanych ze zbiorowisk izolatów.

Całkowity Efekt Biotyczny (SBE) przybierał różne wartości i zależał od wprowadzanego do gleby szczepu *F. oxysporum*, jak również stopnia zróżnicowania populacji pod względem indywidualnych oddziaływań (IBE) w stosunku do *P. terrestris*. Podczas oceny indywidualnych efektów biotycznych z udziałem *P. terrestris* jako patogenu można było zaobserwować, że gatunek ten, pomimo stosunkowo wolnego wzrostu, w obecności niektórych izolatów *F. oxysporum*, nie był całkowicie wypierany z pożywki, prawdopodobnie dzięki zdolnościom wytwarzania metabolitów (Bell i Wheeler 1986, Gourd i in. 1988, Sato i in. 1979). W dostępnej literaturze nie znaleziono prac dotyczących oceny stosunków biotycznych istniejących pomiędzy *P. terrestris* a innymi mikroorganizmami. Testy tego typu wykonywane były jedynie z *F. oxysporum* przez Srivastava i in. (1991) oraz Webera i in. (1996).

Przeprowadzone badania pokazują, że poszczególne gatunki grzybów nie tylko różnią się między sobą zdolnością wydzielania enzymów, ale istnieje również znaczne zróżnicowanie takich zdolności w obrębie gatunku. Mbwaga i in. (1996) badając wytwarzanie celulaz, hemicelulaz, pektynaz, ksylanaz i arabinaz przez izolaty *Pseudocerc-*

cosporella herpotrichoides, stwierdzili, że aktywność enzymatyczna była większa u form patogenicznych. W omawianej pracy taką zależność zaobserwowano u obydwu testowanych gatunków chorobotwórczych tylko w przypadku wydzielania amylaz i celulaz, natomiast pektynazy były wydzielane najintensywniej tylko przez *F. oxysporum* f. sp. *cepae*. Z badań Dahm (1996) wynika, że nie wszystkie mikroorganizmy posiadają pełen kompleks enzymów pektynolitycznych. Z testowanych szczepów wszystkie kultury wykazały się aktywnością celulolityczną. Enzymy amylolityczne wykryto tylko u niektórych badanych izolatów. Wydzielanie celulaz i amylaz było zróżnicowane i prawdopodobnie zależało od cech genetycznych. Według Witkowskiej (1993) i Rodziewicz (2000) na syntezę enzymów przez drobnoustroje, poza uwarunkowaniami genetycznymi, mają wpływ warunki hodowli oraz skład podłoża.

Wyniki badań infekcyjnych oraz dane z literatury (Abawi i Lorbeer 1972, Matkowski 1996, Stankiewicz i in. 1997) wskazują, że izolaty tego samego gatunku mogą porażać rośliny w różnym stopniu. Jak wiadomo, u roślin występują związki, które mogą inaktywować wytwarzane przez grzyby enzymy. Według Urbanka i Yirdaw (1984) znajdujące się w fasoli inhibitory poligalakturonazy, a w soi inhibitory tripsyny, chronią tkanki roślinne przed destrukcyjnym działaniem hydrolaz patogenów. Wykazali oni również, że kwasowa proteinaza z *Fusarium culmorum* może powodować hydrolizę wyżej wymienionych związków, ułatwiając infekcję. Urbanek (1987) twierdzi, że zdolność wydzielania enzymu do podłoża przez patogen w hodowli *in vitro* nie może służyć jako dowód jego roli w procesie porażania roślin. Wytwarzanie enzymów zewnątrzkomórkowych przez mikroorganizm jest zależne od rodzaju podłoża i innych warunków hodowli. Może właśnie dlatego, nie we wszystkich przypadkach, zaobserwowano związek pomiędzy ilością wytwarzanych enzymów a stopniem patogeniczności izolatów.

Z badań Abawi i Lorbeer (1971c) wynika, że na polach, na których corocznie notowano duże nasilenie zgnilizny podstawy łodygi, powodowanej przez *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, stosunek tej formy specjalnej do *F. oxysporum sensu lato* wynosił od 20 do 60%. Na polach, na których nie obserwowano objawów choroby, populacja *F. oxysporum* f. sp. *cepae* stanowiła natomiast tylko kilka procent wszystkich wyosobnionych kolonii *F. oxysporum*. Cytowani autorzy sugerują, że w opisywanym przypadku pewne, trudne do uchwycenia czynniki biotyczne lub abiotyczne ograniczały występowanie choroby. Na poletkach doświadczalnych, na których wprowadzano *F. oxysporum* f. sp. *cepae*, stwierdzono stosunkowo niewielki poziom zachorowań. Przy łącznych zakażeniach praktycznie nie obserwowano uszkodzeń roślin powodowanych przez ten patogen. Mimo przynależności wybranych do badania szczepów *F. oxysporum* do tej samej grupy zgodności wegetatywnej obydwie formy istotnie ograniczały zakażenia, jak również nie dochodziło do niekorzystnych interakcji z izolatami *F. oxysporum*, naturalnie obecnymi w środowisku uprawnym. Z obserwacji wykonywanych mikroskopem konfokalnym przez Olivain i in. (2006) wynika, że grzybnie szczepów patogenicznych i niepatogenicznych *F. oxysporum* wnikają równocześnie do tkanek korzeni. Są one zazwyczaj obecne obok siebie w apikalnych częściach korzeni, a o ich patogeniczności decyduje gen Sge1, nie mający żadnego wpływu na wnikanie grzybów do tkanek, a potem dalszej ich penetracji (van der Does i in. 2008). Oznacza to, że formy te, wbrew powszechnej opinii (Couteaudier i Alabouvette 1990, Eparvier i Alabouvette 1994), raczej nie konkurują o miejsce, lecz o pokarm.

VII. WNIOSKI

1. W środowisku uprawnym pora *F. oxysporum sensu lato* jest organizmem powszechnie występującym. Grzyb jest dominantem w korzeniach, szczególnie często zasiedlając tkanki zewnętrzne.

2. Badania aktywności enzymatycznej populacji *F. oxysporum* mogą być pomocnym wskaźnikiem oceny przydatności poszczególnych izolatów do ich wykorzystania w ochronie biologicznej.

3. *F. oxysporum*, a w szczególności formy saprotroficzne tego gatunku, są silnie związane z roślinami pora i mają wpływ na zdrowotność roślin, nawet w przypadku braku biotycznego czynnika chorobotwórczego.

4. Wszystkie badane populacje *F. oxysporum* ograniczały rozwój *P. terrestris*.

5. Szczepionka zawierająca niepatogeniczne formy *F. oxysporum* była skutecznym środkiem ochronnym przeciwko różowej zgniliznie korzeni pora, zarówno w doświadczeniu wazonowym, jak i warunkach polowych.

6. Szczepionka z *F. oxysporum* nie tylko ograniczała zakażenia powodowane przez *P. terrestris*, ale również wpływała na plonowanie pora. Szczególnie efektywnie oddziaływały szczepy F13, F 345 i F675.

7. W doświadczeniach szalkowych grzyby z rodzaju *Fusarium* w znacznej mierze hamowały wzrost *P. terrestris*. Najsilniej wzrost patogenu ograniczały szczepy F 345, F13 i F675.

8. Wyosobnione z chorych korzeni izolaty *F. oxysporum* wyraźnie różniły się między sobą wirulencją w stosunku do pora jak i do innych testowanych roślin uprawnych.

9. Testy zgodności wegetatywnej wykazały, że mimo znacznego zróżnicowania morfologicznego i fizjologicznego wszystkie badane izolaty należały do tej samej grupy.

PIŚMIENNICTWO

- Abawi G.S., Grogan R.G., 1979: Epidemiology of diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathol.*, 69: 899–904.
- Abawi G.S., Lorbeer J.W., 1971a: Pathological histology of four onion cultivars infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathol.*, 61: 1164–1169.
- Abawi G.S., Lorbeer J.W., 1971b: Reaction of selected onion varieties to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Plant Dis. Rep.*, 55 (11): 1000–1004.
- Abawi G.S., Lorbeer J.W., 1971c: Populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* in organic soils in New York. *Phytopathol.*, 61: 1042–1048.
- Abawi G.S., Lorbeer J.W., 1972: Several aspects of the ecology and pathology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Phytopathol.*, 62: 870–876.
- Alabouvette C., 1990: Biological control of *Fusarium oxysporum* wilt pathogens in suppressive soils, [in:] Hornby D.: *Biological control of soil-borne plant pathogens*. CAB International Wallingford, England: 27–43.
- Alabouvette C., Hoepfer H., Lamanceau P., Steinberg C., 1996: Soil suppressiveness to disease induced by soilborne plant pathogens. *Soil Biochem.*, 9: 371–413.
- Ames L.M., 1961: A monograph of the *Chaetomiaceae*. Army Research Office, Budapest.
- Appel D.J., Gordon T.R., 1994: Local and regional variation in populations of *Fusarium oxysporum* from agricultural field soils. *Phytopathol.*, 84 (4): 786–791.
- Appel D.J., Gordon T.R., 1996: Relationships among pathogenic and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Mol. Plant-Microbe In.*, 9 (2): 125–138.
- Armstrong G.M., Armstrong J.K., 1981: Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt diseases, [in:] Nelson P.E., Toussoun T.A., Cook R.J.: *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State Univ. Press., University Park and London: 391–399.
- Arx v. J.A., 1957: Revision der zu *Gleosporium* gestellte Pilze. N.V. Noord-Hollandsche Uitgevers Maatschappij, Amsterdam.
- Ashraf M.S., Khan T.A., Hasan S., 2005: Reaction of chickpea varieties to *Macrophomina phaseolina* and their effect on peroxidase activity. *Pak. J. Bot.*, 37 (3): 761–767.
- Auwah R., Lorbeer J.W., 1989: A procedure for isolating *Pyrenochaeta terrestris* from onion roots. *Ann. Appl. Biol.*, 114 (1): 205–208.
- Baker K.F., Cook R.J., 1974: *Biological control of plant pathogens*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Baker K.W., Snyder W.C., 1965: *Ecology of soil-borne plant pathogens*. Univ. of California Press. Berkeley and Los Angeles.
- Baker R., 1965: The dynamics of inoculum, [in:] Baker K.W., Snyder W.C.: *Ecology of soil-borne plant pathogens*. Univ. of California Press. Berkeley and Los Angeles: 395–403.
- Barron G.L., 1972: The genera of *Hyphomycetes* from soil. Krieger Co.
- Bell A.A., Wheeler M.M., 1986: Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24: 411.
- Biesiada A., Kołota E., Pietr S., Stankiewicz M., Matkowski K., 2002: Estimation of efficiency of garlic extract and *Trichoderma viride* against pink root rot (*Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, Walter et Garson on leek. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 57, 73–81.

- Biles C.L., Holland M., Ulloa-Godinez M., Clason D., Corgan J., 1992: *Pyrenochaeta terrestris* microsclerotia production and pigmentation on onion roots. *HortScience*, 27 (11): 1213–1216.
- Birch A.J., Fryer R.I., Thompson P.J., Smith H., 1961: Pigments of *Phoma terrestris* Hansen and their biosynthesis. *Nature*, 190: 441–442.
- de Boer W., Verheggen P., Klein Gunnewiek P.J.A., Kowalchuk G.A., van Veen J.A., 2003: Microbial community composition affects soil fungistasis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (2): 835–844.
- Bohem E.W.A., Ploetz R.C., Kistler K.C., 1994: Statistical analysis of electrophoretic karyotype variation among vegetative compatibility groups of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Mol. Plant Pathol.*, 42: 196–207.
- Booth C., 1971: The genus *Fusarium*. *Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, England*.
- Brown A.H.S., Smith G., 1957: The genus *Paecilomyces* Bainier and its perfect state of *Byssochlamys* Westling. *T. Brit. Mycol. Soc.*, 40: 17–89.
- Brown A.E., 1984: Relationship of endopolygalacturonase inhibitor activity to the rate of fungal rot development in apple fruits. *Phytopathol.*, 111: 122–132.
- Burke D.W., 1970: Soil conditions and distribution of pathogens in relation to pea root in Wisconsin soils. *Phytopathol.*, 60: 403–406.
- le Cam B., Leberton L., Massiot P., Rouxel F., 1996: Production of cell wall polysaccharide degrading enzymes in carrot root tissues infected by *Mycocentrospora acerina*. *Plant Pathol.*, 46: 276–281.
- Camargo M., Kimato H., 1992: Influencia de meios de cultura sinteticos na reproducao de *Pyrenochaeta terrestris*, agente causal de raizes rosadas em cebola. *Summa Phytopathologia*, 18: 167–172.
- Carmichael J.W., 1962: *Chrysosporium* and some other aleuriosporic *Hyphomycetes*. *Can. J. Botany*, 40 (7): 1137–1173.
- Chidambaram P., Mathur S.B., Neergaard P., 1973: Identification of seed-borne *Drechslera* species. *Saertryk of Fresia*, 10 (3): 165–207.
- Chupp C.E., Sherf A.F., 1960: *Vegetable diseases and their control*. The Ronald Press Company, New York: 397–399.
- Coleman P.M., Ellerbrock L.A., 1992: Interaction of *Phoma terrestris* and soil moisture level on yield of two onion cultivars differentially susceptible to pink root. *Plant Dis.*, 76 (12): 1213–1216.
- Cook J.R., 1970: Factors affecting saprophytic colonisation of wheat straw by *Fusarium roseum* f. sp. *cerealis* "Culmorum". *Phytopathol.*, 60: 1672–1676.
- Correll J.C., Klittich C.J.R., Leslie J.F., 1987: Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility test. *Phytopathol.*, 77: 640–646.
- Couteaudier Y., Alabouvette C., 1990: Quantitative comparison of *Fusarium oxysporum* competitiveness in relation to carbon utilization. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74: 261–268.
- Dahm H., 1996: Synteza enzymów celulolitycznych i pektolitycznych u grzybów z rodzaju *Fusarium*, *Rhizoctonia* i *Trichoderma*. Materiały z sympozjum Nowe Kierunki w Fitopatologii. Akademia Rolnicza w Krakowie, 11–13 września 1996: 386–387.
- Dennis C. Webster J., 1971: Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. *T. Brit. Mycol. Soc.*, 57: 25–48.
- van der Does H.C., Duyvesteijn R.G., Goltstein P.M., van Schie C.C., Manders E.M., 2008: Expression of effector gene *SIX1* of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genet. Biol.*, 45: 1257–1264.
- Domsch K.H., Gams W., 1970: *Pilze aus Agrarböden*. Stuttgart.
- Dorenbosch M.M.J., 1970: Key to nine ubiquitous soil-borne *Phoma*-like fungi. *Persoonia*, 6 (1): 1–14.

- Dorenda M., 1982: Kształtowanie się zbiorowisk grzybów z górskiego środowiska uprawnego *Trifolium pratense* L. i *Dactylis glomerata* L. Acta Mycologica, 18 (2): 243–280.
- Dorenda M., 1983: Oddziaływanie zbiorowisk grzybów ze środowiska uprawnego *Trifolium pratense* L. i *Dactylis glomerata* L. na grzyby patogeniczne dla koniczyny. Acta Mycologica, 19 (1): 47–53.
- Dowd P.F., Johnson E.T., 2005: Association of a specific cationic peroxidase isozyme with maize stress and disease resistance responses, genetic identification, and identification of a cDNA coding for the isozyme. J. Agr. Food Chem., 53 (11): 4464–4470.
- Ellis M.B., 1971: Dematiaceous *Hyphomycetes*. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, England.
- Ellis R.J., Timms-Wilson T.M., Bailey M.J., 2000: Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. Environ. Microbiol., 2: 274–284.
- Eparvier A., Alabouvet C., 1994: Use of ELISA and GUS-transformed strains to study competitions between pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* for root colonisation. Biocontrol Sci. Techn., 4: 35–47.
- Favaron F., Castiglioni C., Di Lenna P., 1992: Inhibition of some rot fungi polygalacturonases by *Allium cepa* L. and *Allium porrum* L. extracts. J. Phytopathol., 139: 201–206.
- Fernandez D., Tantaoui A., 1994: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis: A tool for rapid characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolates. Phytopathol. Mediterr., 33: 223–229.
- Ferreira J.F., Bosland P.W., Wolliams P.H., 1991: The variability of *Pyrenochaeta terrestris* isolates based on isozyme polymorphism, cultural characteristics and virulence on differential onion breeding lines. J. Phytopathol., 133: 289–296.
- Gajera H.P., Bambharolia R.M., Patel S.V., Mandavia M.K., Patel D.V., Golakiya B.A., 2008: Role of extra cellular enzymes from *Trichoderma* spp. during their in vitro antagonism with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Indian Journal of Agricultural Biochemistry, 21: 432–438.
- Gams W., 1971: *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (*Hyphomycetes*). Jena.
- Garrett S.D., 1965: Toward biological control of soil-borne pathogens [in:] Baker K.W., Snyder W.C.: Ecology of soil-borne plant pathogens. Univ. of California Press. Berkeley and Los Angeles: 4–16.
- Garrett S.D., 1970: Pathogenic root-infecting fungi. Cambridge Univ. Press.
- Gerlach W., Schneider R., 1964: Nachweis eines *Pyrenochaeta*-Stadiums bei Stämmen des Korkwurzelerregers der Tomate. Phytopathol. Z. 50: 262–263.
- Gilman J. C., 1959: A manual of soil fungi. London.
- Glynne M.D., 1965: Crop sequence in rotation to soil-borne pathogens, [in:] Baker K.W., Snyder W.C.: Ecology of soil-borne plant pathogens. Univ. of California Press. Berkeley and Los Angeles: 423–435.
- Gorenz A.M., Walker J.C., Larson R.H., 1948: Morphology and taxonomy of the onion pink-root fungus. Phytopathol., 38: 831–840.
- Gordon T.R., Okamoto D., Jacobson D.J. 1989: Colonization of muskmelon and nonsusceptible crops by *F. oxysporum* f. sp. *melonis* and other species of *Fusarium*. Phytopathol., 79: 1095–1100.
- Gordon T.R., Martyn R.D., 1997: The evolutionary biology of *Fusarium oxysporum*. Ann. Rev. Phytopathol., 35: 111–128.
- Gourd J.M., Southward G.M., Philips G.C., 1988: Response of *Allium* tissue cultures to filtrates of *Pyrenochaeta terrestris*. HortScience, 23 (4): 766–768.
- Grebenjuk I.N., Kuzniecowa T.T., 1971: Nowyj wid *Papularia rosea* Greben. et Kuznetz. obnarużennyj w nowosibirskoj oblasti. Mikol. i Fitopatol., 5 (1): 79–80.

- Grosclaude C., 1983: Activities du *Trichoderma harzianum* vis-a-vis du *Stereum purpureum*, [in:] Les antagonists microbiens, 24 Colloque de la Societe Francaise de Phytopathologie, INRA, 18: 115-118.
- Grove G.G., Campbell R.N., 1987: Host range and survival in soil of *Pyrenochaeta lycopersici*. Plant Dis., 71: 806-809.
- Guadet J., Julien J., Lafay J.F., Brygoo Y., 1989: Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA, sequence comparison. Mol. Biol. Evol., 6: 227-242.
- Gunasekaran M., Weber D.J., 1981: Influence of physicochemical factors on growth and pigment synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. Mycologia, 73: 844-852.
- Hadar Y., Chet I., Henis Y., 1973: Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathol., 69: 64-68.
- Hartz T.K., Bogle C.R., Bender D.A., Avila F.A., 1989: Control of pink root disease in onion using solarization and fumigation. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 114 (4): 587-590.
- Henis Y., Ghaffar A., Baker R., 1979: Factors affecting suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathol., 69 (11): 1164-1169.
- Hess W.M., 1962: Use of near-ultraviolet light to induce fruiting of *Pyrenochaeta terrestris*. Phytopathol., 52 (2): 735.
- Hess W.M., 1968: Ultrastructural comparisons of fungus hyphal cells using frozen-etched replicas and thin sections of the fungus *Pyrenochaeta terrestris*. Can. J. Microbiol., 14: 205-210.
- Hess W.M., 1969: Ultrastructure of onion roots infected with *Pyrenochaeta terrestris* a fungus parasite. Am. J. Bot., 56: 832-845.
- Hess W.M., Weber D.J., 1988: Assays for determining resistance and susceptibility on onion cultivars to the pink root disease. Phytopathol., 78 (1): 115-117.
- Hess W.M., Vaughan E.K., 1962: Pathogenicity of *Pyrenochaeta terrestris* and *Fusarium* sp. from onion roots. Phytopathol., 52: 735.
- Hess W.M., Vaughan E.K., Leach C.M., 1964: Use of ultraviolet-induced sporulation for identification of *Pyrenochaeta terrestris*. Phytopathol., 54: 113.
- Holz G., Knox-Davies P.S., 1985: Production of pectic enzymes by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*: induction by cell walls from different parts of onion bulbs at different growth stages. Phytopathol. Z. 112: 81-92.
- Holz G., Knox-Davies P.S., 1986: Relation between endo-pectin-trans-eliminase and apoplast-symplast sugars in *Fusarium* bulb rot of onions. Physiol. Mol. Plant Pathol., 28: 411-421.
- Hornby D., 1983: Suppressing soils. Annu. Rev. Phytopathol., 21: 65-85.
- Hornby D., 1994: Aspects of the autecology of the take-all fungus. W: Blakeman J.P., Williamson B.: Ecology of plant pathogens. CAB International: 209-226.
- Horton J.C., Keen N.T., 1966: Regulation of induced cellulase synthesis in *Pyrenochaeta terrestris* Gorenz et al. by utilizable carbon compounds. Can. J. Microbiol., 12 (2): 209-220.
- Jackson R.M., 1965: Antibiosis and fungistasis of soil microorganisms, [in:] Baker K.W., Snyder W.C.: Ecology of soil-borne plant pathogens. Univ. of California Press. Berkeley and Los Angeles: 263-369.
- Jorge I., Navas-Cortés J.A., Jiménez-Díaz R.M., Tena M., 2006: Cell wall degrading enzymes in fusarium wilt of chickpea: correlation between pectinase and xylanase activities and disease development in plants infected with two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Can. J. Botany, 84 (9): 1395-1404.
- Katznelson H., 1965: Nature and importance of the rhizosphere, [in:] Baker K.W., Snyder W.C.: Ecology of soil-borne plant pathogens. Univ. of California Press. Berkeley and Los Angeles: 187-209.
- Kaur R., Singh R.S., 2007: Study of induced systemic resistance in *Cicer arietinum* L. due to nonpathogenic *Fusarium oxysporum* using a modified split root technique. J. Phytopathol: 694-698.

- Keen N.T., Horton J.C., 1966: Induction and repression of endopolygalacturonase synthesis by *Pyrenochaeta terrestris*. Can. J. Microbiol., 12: 443–453.
- Kehr A.E., O'Brien J.M., Davis E.W., 1962: Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and its interaction with *Pyrenochaeta terrestris* on onion. Euphytica, 11: 197–208.
- Kim D.H., Martyn R.D., Magil. C.W., 1993: Mitochondrial DNA (mt-DNA) relatedness among formae speciales of *Fusarium oxysporum* in the *Cucurbitaceae*. Phytopathol., 83: 91–97.
- Kistler H.C., 1997: Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathol., 87: 474–479.
- Kistler H.C., Alabouvette C., Baayen R.P., Bentley S., Brayford D., Coddington A., Correl J., Daboussi M.-J., Elias K., Fernandez D., Gordon T.R., Katan T., Kim H.G., Leslie J.F., Martyn R.D., Migheli Q., Moor N.Y., O'Donnell K., Ploetz R.C., Rutherford M.A., Summerell B., Waalwijk C., Woo S., 1998: Systematic numbering of vegetative compatibility groups in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Phytopathol., 88: 30–32.
- Komada H., 1975: Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Rev. Plant Protect. Res., 8: 115–125.
- Kroon B.A.M., Scheffer R.J., Elgersma D.M., 1991: Induced resistance in tomato plants against *Fusarium* wilt invoked by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Eur. J. Plant Pathol., 97 (6): 401–408.
- Krupa S.V., Dommergues Y.R., 1979: Ecology of root pathogens. Amsterdam-Oxford-New York: 60–61.
- Lacy M.L., Roberts D.L., 1982: Yields of onion cultivars in mid western organic soils infested with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and *Pyrenochaeta terrestris*. Plant Dis., 66 (11): 1003–1006.
- Lamanceau P., Corberand T., Gardan L., Latour V., Laguerre G., Boeufgras J.M., Alabouvette C., 1995: Effect of two plants species, flax (*Linum ussitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. Appl. Environ. Microb., 61: 1004–1012.
- Larkin R.P., Hopkins D.L., Martin F.N., 1996: Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. Phytopathol., 86: 812–819.
- Lascaris D., 1986: *Pyrenochaeta terrestris* on onion, first record in Greece. Annales de L'Institut Phytopathologique Benaki, 15 (1): 85–86.
- Lazarovits G., Steele R.W., Higgins V.J., Stoessl A., 1989: Tricyclazole as an inhibitor of polyketide metabolism in the onion pink root rot pathogen, *Pyrenochaeta terrestris*. Pestic. Biochem. Phys., 34: 277–287.
- Lederer W., Lorenz K.H., Seemüller E., 1992: Studies on antagonistic effect of *Trichoderma* isolates against *Phytophthora cactorum*. J. Phytopathol., 136 (2): 154–164.
- Levy D., Gornik A., 1981: Tolerance of onions (*Allium cepa* L.) to the pink root disease caused by *Pyrenochaeta terrestris*. Phytoparasitica, 9 (1): 51–57.
- Li G., Yen Y., 2008: Jasmonate and ethylene signaling pathway may mediate *Fusarium* head blight resistance in wheat. Crop Sci., 48: 1888–1896.
- Ludwig A.C., Hubstenberger J.F., Phillips G.C., Southward G.M., 1992: Screening of *Allium* tester lines in vitro with *Pyrenochaeta terrestris* filtrates. HortScience, 27 (2): 166–168.
- Luttrell E.S., 1974: Parasitism of fungi on vascular plants. Mycologia, 66 (1): 1–15.
- Łacicowa B., 1993: *Exserohilum* (= *Setosphaeria*) *pedicellatum* z korzeni jęczmienia. Acta Mycologica, 28: 83–85.
- Łacicowa B., Orlikowski L., 1976: Studies on the influence of some cultivated plants upon mycoflora of the soil environment in phytopathological aspect. Roczn. Nauk Roln., s. E, 6 (2): 7–35.

- Lacicowa B., Pięta D., 1985: Szkodliwość niektórych mikopasożytów dla fitopatogenicznych *Fusarium* spp. Roczn. Nauk Roln., s. E., 15 (1–2): 87–97.
- Maciejowska-Pokacka Z., 1971: Reakcja mikoflory glebowej i innych drobnoustrojów na różny poziom nawożenia azotem i nawadniania przy uprawie kupkówki (*Dactylis glomerata* L.). Acta Mycologica, 7: 41–57.
- Majchrzak B., 1985: Wpływ zespołu grzybów glebowych na patogeny powodujące zgorzele podstawy źdźbła i korzeni pszenicy ozimej. Roczn. Nauk Roln., s. E., 15 (1–2): 39–50.
- Malone J. P., Muskett A. E., 1964: Seed-borne fungi. Proc. ISTA, 29 (2).
- Mańka K., 1974: Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 160: 11–21.
- Mańka K., 1993: Epiphytic mycoflora of *Pinus sylvestris* L. shoots in relation to *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Morelet, [in:] Shoot diseases of conifers Proceedings of an International Symposium Garpenberg, Sweden, 10–15 June 1991: 135–139.
- Mańka K., Przechbórski A., 1978: Biologiczne zwalczanie zgorzeli siewek sosny zwyczajnej za pomocą grzyba *Mycelium radialis atrovirens* Melin. Zesz. Probl. Post. Nauk Rol., 213: 173–180.
- Mańka M., 1990: Saprofityczna mikroflora środowiska glebowego a zdrowotność roślin. Phytopathol. Pol., 11: 122–134.
- Martin J.P., 1950: Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. Soil Sci., 69: 215–232.
- Matkowski K., 1992: Różowa zgnilizna korzeni – zagrożenie upraw cebuli i pora. Ochrona Roślin, 5: 14–15.
- Matkowski K., 1994: *Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, Walker et Larson, cause of pink root rot of leek. Phytopathol. Pol., 7 (19): 87–92.
- Matkowski K. 1996: Wstępne badania nad wzajemną relacją pomiędzy *Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, Walker et Larson i *Fusarium oxysporum* Schlecht. Choroby roślin a środowisko. Materiały z sympozjum Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego. Poznań, 27–28 VI 1996, s. 329–336.
- Mazur S., 1992: Preliminary studies on fungi inhabiting garlic (*Allium sativum* L.) bulblets. Phytopathol. Pol., 4 (16): 37–40.
- Mazur S., Kućmier J., Chwastek E., 1992: The health status of garlic (*Allium sativum* L.) bulbs as affected by rotation of crops. Phytopathol. Pol., 4 (16): 41–48.
- Mbwaga A.M., Menke G., Grossmann F., 1996: Investigations on the activity of cell wall-degrading enzymes in young wheat plants after infection with *Pseudocercospora herpotrichoides* (From) Deighton. J. Phytopathol., 145: 123–130.
- Migheli Q., Berio T., Gullino M.L., Garibaldi A., 1995: Electrophoretic karyotype variations among pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Plant Pathol., 44: 308–315.
- Miller H.J., Henken G., Van Veen J.A., 1989: Variation and composition of bacterial populations in the rhizospheres of maize, wheat, and grass cultivars. Can. J. Microbiol., 35: 656–660.
- Mohamedali G.H., 1990: Assessing yield losses caused by pink root rot disease (*Pyrenochaeta terrestris* (Hansen) Gorenz, Walker and Larson) in several onion varieties (Sudan). Sudan Agricultural Journal, 13: 92–102.
- Montesinos E., Bonaterra A., Badosa E., Francés J., Alemany J., Llorente I., Moragrega C., 2002: Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. Int. Microbiol., 5: 169–175.
- Nelson P.E., 1991: History of *Fusarium* systematics. Phytopatology, 81: 1045–1051.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Cook R.J., 1981: *Fusarium* diseases, biology and taxonomy. The Pennsylvania State Univ. Press., University Park and London.
- Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O., 1983: *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State Univ. Press., University Park and London.

- Neergaard P., 1945: Danish species of *Alternaria* and *Stemphylium*. Copenhagen.
- Netzer D., Rabinowitch H.D., Weintal Ch., 1985: Greenhouse technique to evaluate onion resistance to pink root. *Euphytica*, 34: 385–391.
- Nichols C.G., Gabelman W.H., Larson R.H., Walker J.C., 1965: The expression and inheritance of resistance to pink root in onion seedlings. *Phytopathol.*, 55: 752–756.
- Nishimura J., 1986: Control of onion diseases and its problems. *Plant Protection*, 40: 6–12.
- Nirenberg H.I., 1981: Differenzierung der Erreger der Halmbruchkrankheit. I. Morphologie. *Z. Pflanzenk. Pflanzen.*, 88 (5): 241–248.
- Olivain C., Humbert C., Nahalkova J., Fatehi J., L'Haridon F., Alabouvette C., 2006: Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil. *Appl. Environ. Microb.*, 72 (2): 1523–1531.
- Parmeter J.R., 1970: *Rhizoctonia solani*, biology and pathology. Univ. of California Press Berkeley, Los Angeles and London.
- Paulitz T.C., 1990: Biochemical and ecological aspects of competition in biological control, [in:] R. Baker and P.E. Dunn (ed.), *New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*. Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y.: 713–724.
- Paulitz T.C., Park C.S., Baker R., 1987: Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.*, 33: 349–353.
- Pląskowska E., 1991: Communities of fungi associated with winter wheat manifesting symptoms of the foot-rot complex, cultivated after different forecrops. *Phytopathol. Pol.*, 1: 41–44.
- Posada M.L., Patino B., Mirete S., Munoz M.C., Vazquez C., Gonzalez-Jaen M.T., 2001: Comparative analysis of polygalacturonases in isolates of seven species of *Fusarium* from *Pinus pinea*. *Mycol. Res.*, 105: 100–104.
- Porter I.J., Merriman P.R., Keane P.J., 1989: Integrated control of pink root (*Pyrenochaeta terrestris*) of onions by dazomet and soil solarization. *Aust. J. Agr. Res.*, 40 (4): 861–869.
- Postma J., Rattink H., 1992: Biological control of *Fusarium* wilt of carnations with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Botany*, 70: 1199–1205.
- Puhalla J.E., 1981: Genetic considerations of the genus *Fusarium*, [in:] *Fusarium: Diseases, Biology and taxonomy*. Nelson P.E., Toussoun T.A., Cook R.J., The Pennsylvania State Univ. Press, University Park and London: 291–305.
- Puhalla J.E., 1985: Classifications of strains *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Can. J. Botany*, 62: 179–83.
- Rajendran K., Ranganathan K., 1996: Biological control of onion basal rot (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*) by combined application of fungal and bacterial antagonists. *J. Biol. Control*, 10: 97–102.
- Rataj-Guranowska M., 1987: Identyfikacja ras *Fusarium oxysporum* f. sp. *lupini* Snyder et Hansen za pomocą metod immunologicznych. Praca habilitacyjna. Ossolineum. Wrocław.
- Rataj-Guranowska M., Walkowiak-Cagara I., 1994: Heterokaryons among three formae speciales *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Phytopathol. Pol.*, 7: 57–70.
- Rataj-Guranowska M., Łukaszewska N., Carder J.H., Barbara D.J., 1993: A rapid method for the section of the vegetatively compatible nit mutants of two wild pathogens. *Phytopathol. Pol.*, 5: 83–89.
- Rataj-Guranowska M., Pieczul K., 2002: Characterization of special forms of *Fusarium oxysporum*. *Post. Nauk Rol.*, 1: 33–44.
- Ray H., Douches D.S., Hammerschmidt R., 1998: Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. *Physiol. Mol. Plant P.*, 53 (2): 93–103.
- Rodziewicz A., 2000: Biosynteza i właściwości biotechnologiczne pozakomórkowych amylaz bakterii z rodzaju *Bacillus*. *Zesz. Nauk. AR Wroc.*, 388. Rozpr. habilit. 172: 12–28.
- Rondomański W., 1985: Choroby warzyw z rodziny liliowatych, [w:] *Szkodniki i choroby roślin warzywnych*. PWRiL, Warszawa: 189.

- Raper K.B., Fennell D.I., 1965: The genus *Aspergillus*. Baltimore.
- Raper K.B., Thom C., 1949: A manual of the *Penicillia*. Baltimore.
- Reinecke P., Fehrmann H., 1979: *Rhizoctonia cerealis* van der Hoeven an Getreide in der Bundesrepublik Deutschland. Z. Pflanzenk. Pflanzen., 86 (3–4): 190–204.
- Rengwalska M.M., Simon P.W., 1986: Laboratory evaluation of pink root and *Fusarium* basal rot resistance in garlic. Plant Dis., 70 (7): 670–672.
- Reuveni M., 1998: Relationships between leaf age, peroxidase and β -1,3-glucanase activity and resistance to downy mildew in grapevines. J. Phytopathol., 146: 525–530.
- Rifai M.A., 1969: A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers, 116: 1–56.
- Salerno M.I., Gianinazzi S., Arnould C., Gianinazzi-Pearson V., 2004: Cell interactions between a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain and root tissues of *Eucalyptus viminalis*. J. Gen. Plant Pathol., 70: 153–158.
- Sato H., Konoma K., Sakamura S., 1979: Phytotoxins produced by onion pink root fungus, *Pyrenochaeta terrestris*. Agr. Biol. Chem. Tokyo, 43 (11): 2409–2411.
- Scher F.M., Baker R., 1980: Mechanism of biological control in a *Fusarium*-suppressive soil. Phytopathol., 70: 412–417.
- Schneider R., 1965: Nachweis des Erregers der "Pink root" der Zwiebeln, *Pyrenochaeta terrestris*, in Deutschland. Phytopathol. Z. 53: 249–254.
- Schneider R., Gerlach W., 1966: *Pyrenochaeta lycopersici* nov. spec., der Erreger der Korkwurzelkrankheit der Tomate. Phytopathol. Z. 56: 117–122.
- Shan-da Liu, Baker R., 1980: Mechanism of biological control in soil suppressive to *Rhizoctonia solani*. Phytopathol., 70: 404–411.
- Shah J., 2005: Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. Ann. Rev. Phytopathol., 43: 229–260.
- Shell M.A., 2000: Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. Annu. Rev. Phytopathol., 38: 263–292.
- Shishkoff N., 1984: *Pyrenochaeta terrestris* on onion mycorrhiza effect. Phytopathol., 74: 809.
- Siemer S.R., Vaughan E.K., 1971: Bioassay of *Pyrenochaeta terrestris* inoculum in soil. Phytopathol., 61: 146–148.
- Simmons E.G., 1964: Typification of *Alternaria*, *Stemphylium* and *Ulocladium*. Mycologia, 59 (1): 67–91.
- Simons G., Vos P., Groenendijk J., Wijbrandi J., Diegaarde P., 1996: Isolation and characterization of the 12 *Fusarium oxysporum* resistance locus from tomato. Int. Congr. Mol. Plant-Microbe Int. Knoxville, TN (abstr.).
- Sivanesan A., 1987: Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers, Commonwealth Mycological Institute, Kew 158.
- Smith I.M., Dunez J., Lelliott R.A., Phillips D.H., Archer S.A., 1989: European Handbook of Plant Diseases. Blackwell Scientific Publication. Oxford: 376.
- Snech B., Netzer D., Krikun J., 1974: Isolation and identification of *Pyrenochaeta terrestris* from soil on dilution plates. Phytopathol., 64: 275–276.
- Snyder W.C., Hansen H.N., 1940: The species concept in *Fusarium*. Am. J. Bot., 27: 64–67.
- Sprague R., 1944: *Phoma terrestris* on *Gramineae* in the Northern Great Plains. Phytopathology, 34: 129–131.
- Srivastava K.J., Tiwari B.K., Pandey U.B., 1991: Studies on biological control of onion plant pathogens. Newsletter Associated Agricultural Development Foundation, 11: 5–6.
- Stankiewicz M., Pietr S., Gajewska E., Jaśkiewicz S., 1997: Aktywność mykopasożytnicza indukowanych mutantów *Trichoderma harzianum* odpornych na benomyl i iprodione. Drob-noustroje w środowisku. Występowanie, aktywność i znaczenie. Akademia Rolnicza w Krakowie. Katedra Mikrobiologii: 631–638.

- Steffens J.C., Robeson D.J., 1987: Secalonic acid A, a vivotoxin in pink root-infected onion. *Phytochemistry*, 26 (6): 1599–1602.
- Struckmeyer B.E., Nichols C.G., Larson R.H., Gabelman W.H., 1962: Histology of roots of susceptible and resistant varieties of onion in relation to the pink root fungus. *Phytopathol.*, 52: 1163–1168.
- Subramanian D., 2009: Enzymes in pathogenesis. *Proceedings: Plant Sciences*, 69: 133–141.
- Sumner D.R., Gitaitis R.D., Gay J.D., Smitle D.A., Maw B.W., Tollner E.W., Hung Y.C., 1997: Control of soilborne pathogenic fungi in fields of sweet onion. *Plant Dis.*, 81: 885–891.
- Sutton B.C., 1980: *The Coelomycetes*. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, England.
- Tims E.C., 1955: Some hosts of the pink root fungus (*Pyrenochaeta terrestris*) in Louisiana. *Phytopathol.*, 45: 350.
- Tischler W., 1971: *Agroekologia*. PWRiL, Warszawa: 340–353.
- Townsend G.R., Heuberger J.W. 1943: Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Dis. Rep.*, 24: 340–343.
- Truszkowska W., 1976: L'assolement comme moyen de lutte contre le fletissement de lupin jaune a base des recherches mycologiques. *Acta Mycol.*, 12 (2): 225–240.
- Truszkowska W., Czechowski K., Kowalski A., Kutrzeba M., 1979: Choroby podstawy żdźbła pszenicy ozimej po 10 latach monokultury. *Rocz. Nauk Roln.*, s. E, 9: 23–31.
- Truszkowska W., Dorenda M., Kita W., Kutrzeba M., 1980: Zgorzel podstawy żdźbła pszenicy powodowana przez *Fusaria* w świetle doświadczeń uprawowych. *Rocz. Nauk Roln.*, s. E, 10 (1–2): 103–117.
- Truszkowska W., Dorenda M., Kutrzeba M., 1986: Mikoflora jako czynnik ochrony pszenicy przed chorobami podstawy żdźbła powodowanymi przez grzyby, w zależności od warunków ekologicznych. *Acta Mycol.*, 22 (2): 145–163.
- Truszkowska W., Dorenda M., Moszczyńska E., 1991: Wpływ płodozmianu na występowanie zgorzeli podstawy żdźbła żyta (*Secale cereale* L.). *Rocz. Nauk Rol.*, s. E., 21 (1–2): 53–60.
- Truszkowska W., Narkiewicz-Jodko M., 1969: Badania oddziaływania grzybów saprofitycznych na patogeniczne dla pomidorów. *Acta Mycol.*, 5: 23–49.
- Turco E., Broggio M., Ragazzi A., 1999: Enzymes produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* compared on a saline and a non-saline substrate. *J. Plant Dis. Protect.*, 106 (4): 333–341.
- Urbanek H., Yirdaw G., 1984: Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol. Pol.*, 33 (2): 131–136.
- Urbanek H., 1987: Rola enzymów w interakcji roślina wyższa–patogen. *Wiadomości Botaniczne*, 31(1):15–28.
- de Vries G.A., 1952: Contribution to the knowledge of the genus *Cladosporium* Link ex Fr. Baarn. Uitgeverij & Drukkerij, Holandia.
- Wagner A., 1983: Zbiorowiska grzybów spod upraw pszenicy ozimej na czarnoziemach i ich wpływ na niektóre patogeny powodujące choroby podsuszkowe. *Rocz. Nauk Roln.*, s. E, 13 (1–2): 147–174.
- Weber Z., Werner M., Frużyńska-Jóźwiak D., 1996: Biotic effect of some selected fungi on different formae speciales of *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Phytopathol. Pol.*, 11: 127–133.
- Werner M., Wyrwa P., 1994: Patogeniczność wybranych form specjalnych grzyba *Fusarium oxysporum* Schlecht. względem goździków. *Acta Mycol.*, 29 (1): 5–12.
- Watson R.D., 1961: Rapid identification of the onion pink-root fungus. *Plant Dis. Rep.*, 45: 298.
- Witkowska D., 1993: Studia nad biosyntezą i praktycznym wykorzystaniem pozakomórkowych hydrolaz *Trichoderma viride*. *Zesz. Nauk. AR Wroc. Rozpr. habilit.* 115.
- Wollenweber H.W., Reinking O.,A., 1935: Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. P. Parey, Berlin.

- Woudt L.P., Neuvel A., Sikkema A., van Grinsven M.Q.J.M., de Milano W.A.M., Campbell C.L., Leslie J.F., 1995: Genetic variation in *Fusarium oxysporum* from cyclamen. *Phytopathol.*, 85: 1348–1355.
- Wright D.E., Schofield K., 1960: The pigment of *Phoma terrestris* Hansen. *Nature*, 188: 233–243.
- Yong-Ki K., Sang-Bum L., Hong-Sik S., Chan-Jung L., Hee-Dae K., 2003: Pink root of onion caused by *Pyrenochaeta terrestris* (syn. *Phoma terrestris*). *Plant Pathol. J.*, 19 (4): 195–199.
- Zalewska-Sobczak J., 1989: Wytwarzanie hydrolaz przez izolaty *Fusarium* w hodowlach na ścianach komórkowych rośliny – gospodarza i niegospodarza. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 374: 407–413.
- Zycha H., Siepmann R., Linnemann G., 1969: Mucorales. *J. Cramer A.*

WYKORZYSTANIE SAPROTROFICZNYCH FORM *FUSARIUM OXYSPORUM* SCHLECHT. EX FR. DO ZWALCZANIA RÓŻOWEJ ZGNILIZNY KORZENI PORA (*ALLIUM AMPELOPRASUM* SSP. *PORRUM* (L) J. GAY)

S t r e s z c z e n i e

W latach 2000-2003, w doświadczeniu wazonowym i polowym, oceniano antagoni-
styczne oddziaływanie wyselekcjonowanych, saprotroficznych form *Fusarium oxyspo-
rum* na *Pyrenochaeta terrestris*. Analizowano wpływ *F. oxysporum* na plonowanie
pora i rozwój różowej zgnilizny korzeni, zarówno na glebach naturalnie zasiedlonych
przez grzyby i sztucznie inokulowanych. Badano zależności biotyczne zachodzące po-
między *P. terrestris*, a reizolowanymi z korzeni *F. oxysporum sensu lato*. Szczepy
F. oxysporum różnicowano określając sposób odżywiania, aktywność enzymatyczną
oraz zgodność wegetatywną.

W badaniach wazonowych i polowych wykazano, że szczepionka zawierająca nie-
patogeniczne formy *F. oxysporum* była skutecznym środkiem ochrony przeciwko różo-
wej zgniliznie korzeni pora. Pory rosnące w wermikulicie, w obecności *F. oxysporum*,
były wyższe i w znacznie lepszej kondycji zdrowotnej niż rośliny rosnące na podłożu
praktycznie pozbawionym mikroorganizmów. Z testowanych sześciu szczepów, 5 wy-
raźnie stymulowało wzrost pora. W doniczkach z łączną aplikacją obydwu testowanych
gatunków: *P. terrestris* i *F. oxysporum*, zaobserwowano istotne ograniczenie objawów
różowej zgnilizny korzeni. W doświadczeniu polowym, trzy z zastosowanych szczepów
F. oxysporum, ograniczały rozwój różowej zgnilizny korzeni pora równie skutecznie jak
Topsin. Na tych poletkach przeciętne plony pora były na poziomie zbliżonym do uzy-
skiwanych z poletek chronionych chemicznie. Ograniczenie różowej zgnilizny korzeni
zaobserwowano również na poletkach z wprowadzanym do gleby patogenicznym dla
pora *F. oxysporum* f. sp. *cepae*.

Z zewnętrznych tkanek korzeni pora, uprawianego w obecności saprotroficznych
szczepów *F. oxysporum*, reizolowano od 48% do około 70% grzybów tego gatunku.
W większości kombinacji, z korzeni inokulowanych łącznie przez obydwie testowane
gatunki grzybów, *F. oxysporum* wyosabniano o około 10% mniej licznie niż przy
wprowadzaniu tylko jednego z komponentów. Z korzeni roślin podlewanych Topsinem,
w porównaniu do kombinacji, w których wprowadzano do gleby obydwa gatunki grzy-
bów, *F. oxysporum* izolowano nieznacznie mniej.

Testy zgodności wegetatywnej wykazały, że mimo znacznego zróżnicowania morfo-
logicznego i fizjologicznego wszystkie badane izolaty *F. oxysporum* należały do tej
samej grupy VGA. U większości testowanych szczepów, stwierdzono obecność enzy-
mów amylolitycznych, proteolitycznych, celulozylitycznych i pektynolitycznych. Enzy-
my te wydzielane były na różnym poziomie, bez względu na gatunek czy przystosowa-
nia pokarmowe. Wyniki testów biotycznych potwierdziły, że saprotroficzne szczepy
F. oxysporum mają zdolność ograniczania wzrostu *P. terrestris*.

Słowa kluczowe: *Pyrenochaeta terrestris*, różowa zgnilizna korzeni, por, *Fusarium
oxysporum*, ochrona biologiczna

**THE USE OF SAPROPHYTIC FORMS OF *FUSARIUM OXYSPORUM*
SCHLECHT. EX FR. FOR THE CONTROL OF THE PINK ROOT ROT
OF LEEK *ALLIUM AMPELOPRASUM* SSP. *PORRUM* (L) J. GAY**

S u m m a r y

The antagonistic action of the selected saprophytic forms of *Fusarium oxysporum* against *Pyrenochaeta terrestris* was assessed in the field and in the container experiments launched in 2000–2003. The effect of the *F.oxysporum* strains on the yield of leek and on the development of the pink root rot was analysed in the substrates naturally infested by pathogenic fungi, as well as in those that were experimentally inoculated with *P. terrestris*. The biotic relations between *P. terrestris* and *F. oxysporum* isolates re-isolated from the plant roots were investigated. The particular strains of *F. oxysporum* were discriminated using their mode of nutrition, enzymatic activity and their vegetative compatibility.

The container, as well as the field experiment both demonstrated that the vaccine containing non-virulent forms of *F. oxysporum* effectively protects leek from the pink root disease. The health status of the leek plants grown in vermiculite in the presence of *F.oxysporum* was higher and the plants themselves were taller than the other ones, grown in the practically sterile substrate. Five out of the six tested strains of *F. oxysporum* apparently stimulated the plants growth. In the plant pots to which the two tested fungi species were applied collectively, the symptoms of the pink root rot were reduced significantly.

Three of the *F. oxysporum* strains used in the field experiment reduced the pink root rot development to the extent comparable with the chemical fungicide, Topsin. The average yield harvested from these plots was also the level with the plots that were chemically protected. Interestingly, the reduction of the pink root rot disease was observed on the plots inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, the strain of *F.o.* that is virulent to leek.

Fusarium oxysporum made up 48–70% of the fungi isolates that were re-isolated from the inner tissues of the leek plants grown on plots inoculated with the saprophytic strains of this species. In majority of the combinations, if the root had been inoculated jointly with both of the tested fungi, then *F. oxysporum* was re-isolated ca 10% less frequently than from the plants previously inoculated with only one of the species. In the experimental variants with substrate inoculated by both of the species and watered with Topsin fungicide, *F. oxysporum* strains were isolated less frequently, although the difference is not statistically significant.

The vegetative compatibility tests have shown that, in spite of a considerable variation in morphology and physiology, all the investigated isolates of *F. oxysporum* belong to the same VGC group. In most of the tested strains the amylolytic, proteolytic, cellulolytic and pectinolytic enzymes were found and they were produced at different concentrations, irrespectively of the fungi species or its trophic adaptations. The results of the biotic assays confirmed the capability of reducing the growth of *P. terrestris* by the saprophytic strains of *F. oxysporum*.

Key words: *Pyrenochaeta terrestris*, pink root rot, leek, *Fusarium oxysporum*, biocontrol