

## Wpływ P i Ca na formowanie mikoryz sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) w warunkach aseptycznych

ELŻBIETA CHRUŚCIAK

Katedra Mikrobiologii Rolnej SGGW-AR, Warszawa

Chruściak E.: (Department of Agricultural Microbiology, Agricultural University, Warszawa, Rakowiecka 26/30, Poland). *Effect of P and Ca on the mycorrhiza of P. sylvestris formation in aseptic condition*. Acta Mycol. 20 (2): 213–218, 1984.

The effect of some phosphorus and calcium compounds on mycorrhiza formation in pure cultures was investigated. In this experiment – *Cenococcum graniforme*, *Suillus bovinus* and *Tricholoma albobrunneum* were used. The ability to synthesise acid phosphatase was tested in 11 strains. The presence of P has a stimulating effect on mycorrhiza formation by *S. bovinus* and *T. albobrunneum*. On control medium and medium containing CaO mycorrhiza was absent or only single. All strains synthesised phosphatase. The lowest enzymatic activity was found in two *C. graniforme* strains.

### WSTĘP

Praca stanowi kontynuację wcześniejszych obserwacji (Pachlewski, Chruściak 1981, 1983) dotyczących oddziaływania stosowanych w leśnictwie niektórych nawozów fosforowych i wapniowych na grzyby ektomikoryzowe. W tej części eksperymentalnej uwzględniono reakcję zespołu roślina – symbiont grzybowy. Ponadto, kierując się doniesieniami o wykazywanej u niektórych grzybów symbiotycznych aktywności fosfatazy (Bartlett, Lewis 1973), przetestowano pod tym kątem izolaty używane przez nas najczęściej w doświadczeniach.

### MATERIAŁ I METODY

Test przeprowadzono na trzech gatunkach grzybów: *Cenococcum graniforme* (nr kolekcji 3543), *Suillus bovinus* (nr 1941) i *Tricholoma albobrunneum* (nr 1951).

Szczepy pochodziły ze zbiorów muzealnych Pracowni Biologii Gleb Leśnych IBL w Sękocinie.

Podłoże podstawowe, „głodowe” (P a c h l e w s k a 1968) zawierało: agar 15 g, tiaminę 100  $\mu$ g, wodę destylowaną 1000 ml. Stanowiło ono substrat kontrolny (kombinacja 11), do którego dodawano jeden z zestawionych niżej związków w odpowiednim stężeniu: CaO – 166 mg/l; CaO – 332 mg/l; CaO – 664 mg/l; superfosfat pylisty – 58 mg/l; superfosfat pylisty – 116 mg/l; superfosfat pylisty – 232 mg/l;  $AlPO_4$  – 32 mg/l;  $AlPO_4$  – 64 mg/l;  $FePO_4$  – 40 mg/l;  $FePO_4$  – 80 mg/l. Każdy wariant wykonany był w trzech powtórzeniach. Podłoża rozlewano do probówek o wymiarach 30 × 200 mm, do 1/3 objętości, formując niewielki skos. W celu uzyskania sterylnych siewek nasiona sosny zwyczajnej jałowiono powierzchniowo 0,2% roztworem wodnym sublimatu i po wielokrotnym płukaniu sterylną wodą wykładano na jałowy 0,6% agar wodny. Inkubacja trwała do momentu uzyskania długości kielka 1 - 1,5 cm (w temperaturze 25°C). Wykiełkowane nasiona przenoszono na skosy umieszczając je w pobliżu ścianki probówki. Zabiegu tego dokonano w maju 1981 r. Po upływie 3 - 4 tygodni, w momencie pojawienia się krótkich korzeni bocznych, wszystkie podłoża inokulowano grzybnią odpowiednich izolatów. Probówki z hodowlami inkubowane były na oknie (o wystawie wschodniej), w temperaturze pokojowej. System korzeniowy siewek osłonięto czarnym papierem.

Pierwsze obserwacje roślin przeprowadzono po miesiącu, następne po 2 i 3 miesiącach od chwili zaszczepienia grzybni. Oceniano pokrój makroskopowy pędu i systemu korzeniowego oraz (pod binokulem) ilość, rozmieszczenie, barwę i morfologię ektomikoryz.

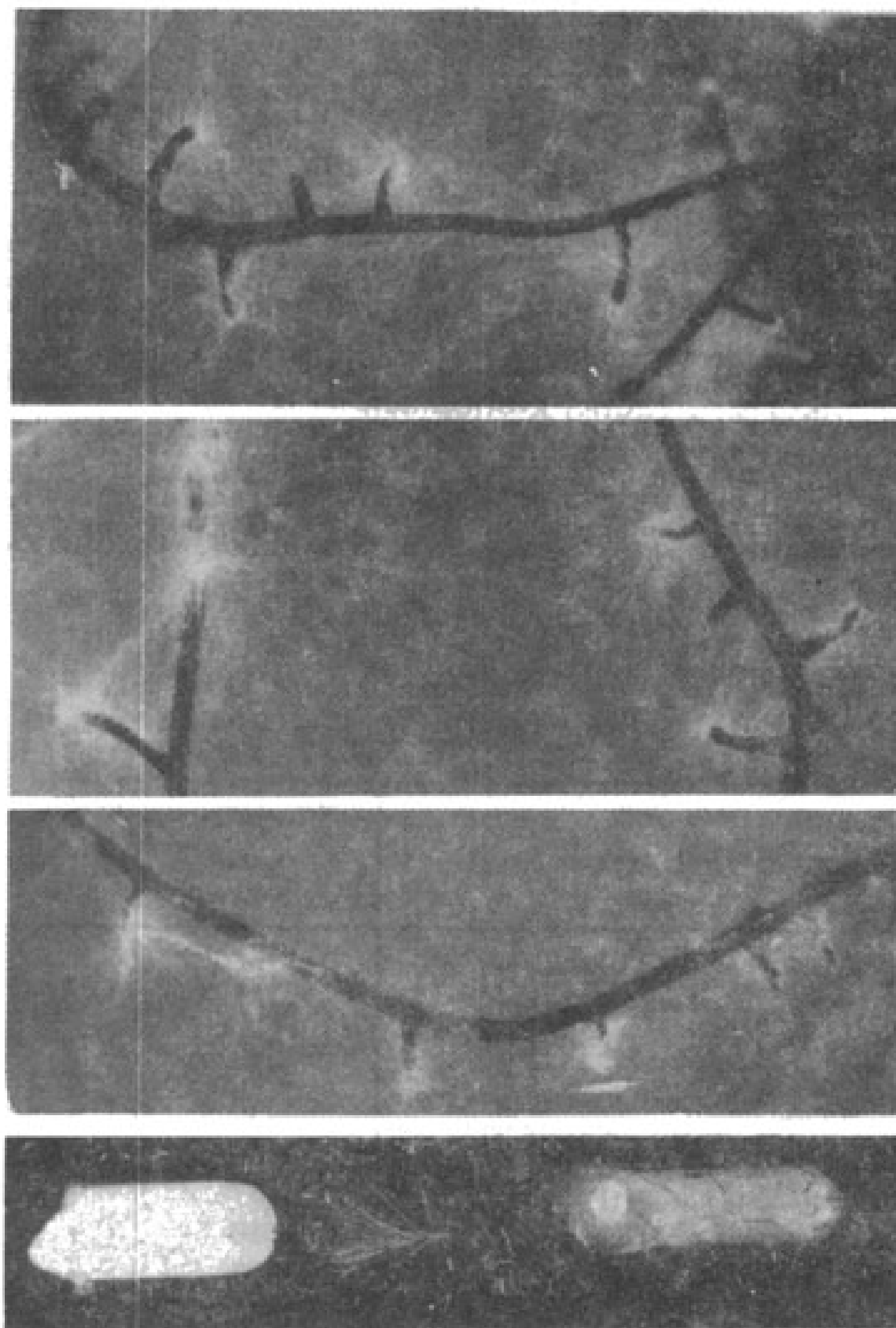
W celu ujawnienia zdolności syntezy kwaśnej fosfatazy przygotowano jako substrat jałowy (sączony przez sączek Seitza) wodny 1% roztwór fosforanu *p*-nitrofenyldwusodowego. Do wyjałowionych płytek Petriego wprowadzano po 1 ml tego roztworu zalewając i mieszając go z pożywką o składzie: glukoza – 20 g; maltoza – 5 g; winian amonu – 0,5 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0,5 g; cytrynian żelaza – 1% – 0,5 ml;  $ZnSO_4$  0,2% – 0,5 ml; tiamina – 50  $\mu$ g; agar – 15 g; woda destylowana – 1000 ml. Podłoże szczepiono centralnie fragmentami grzybni poszczególnych izolatów i inkubowano 5 - 10 dni w temperaturze 25°C. Jako kryterium wytwarzania fosfatazy traktowano pojawienie się żółtego zabarwienia wokół grzybni wskutek uwalniania do pożywki *p*-nitrofenolu (S k e r m a n 1969). Badaniu poddano 10 szczepów ektomikoryzowych i jeden ektendomikoryzowy.

## WYNIKI

Pokrój pędu siewek w poszczególnych kombinacjach nie wykazywał zasadniczych różnic. Długość części pozostającej ponad podłożem wahała się w

granicach 8 - 9 cm. Barwa igieł była na ogół żywo zielona. W rozwoju systemu korzeniowego także nie zanotowano istotniejszych różnic.

Obecność fosforu w podłożu raczej jednoznacznie pozytywnie wpływała na formowanie mikoryz u dwu spośród badanych szczepów – *Tricholoma albobrunneum* i *Suillus bovinus*. W kombinacjach: kontrolnej, a także tych gdzie dodawano CaO (1 - 3) mikoryzy nie wykształcały się wcale, bądź były pojedyncze.



Ryc. 1. Pokrój ogólny siewki sosny szczepionej grzybnią *Tricholoma albobrunneum* oraz mikoryzy na korzeniach bocznych

Pine seedling infected with *Tricholoma albobrunneum* mycelium: general appearance and mycorrhiza on lateral roots

fot. R. Bownik, IBL 1981

W przypadku *S. bovinus* także w kombinacji 4 – przy minimalnej dawce superfosfatu pylistego rozwój grzybni był słaby, brak było mikoryz, obserwowano obecność włóśników. Najwięcej mikoryz odnotowano w kombinacji 5, 6, 8, 9 i 10, a więc zawierających średnią i maksymalną dawkę superfosfatu pylistego, większą dawkę  $AlPO_4$  i oba stężenia  $FePO_4$ . Mikoryzy były proste i dichotomicznie rozgałęzione, o barwie kremowej, z dobrze wykształconą opłisnią. Większość z nich występowała w warstwie powierzchniowej, w mniejszym stopniu w agarze, głównie w górnej i środkowej części korzenia. W odniesieniu do *T. albobrunneum* tendencja wykształcania mikoryz była podobna.

W kombinacjach z dodatkiem CaO mikoryzy nie formowały się zupełnie, w kontroli obserwowano po 1 - 2 w próbówce. Najliczniejsze były w wariantach: 5 (średnia dawka superfosfatu pylistego), 7 (mniejsza ilość  $AlPO_4$ ) i 9 (mniejsza dawka  $FePO_4$ ). Odznaczały się barwą białą, były głównie proste, welniste, najczęściej uformowane nad powierzchnią agaru, rzadziej w substracie, usytuowane w górnej, względnie centralnej jego części (ryc. 1). *Cenococcum graniforme* nie wytwarzało mikoryz w żadnej kombinacji.

Zgodnie z przyjętymi poglądami (Björkman 1970, Dominik 1961, Melin 1953) niskie stężenie w środowisku P, a także N i K decydują o aktywnym powstawaniu mikoryz. Tendencja ta jednak sprzężona jest zapewne z

Tabela 1 – Table 1

Aktywność fosfatazy  
Phosphatase activity

| Gatunek<br>Species  | Nr szczepu<br>No. of collection | Aktywność<br>Activity |
|---|---------------------------------|-----------------------|
| <i>Amanita verna</i> (Bull.: Fr.) Pers. ex Vitt.                          | 0141                            | +                     |
| <i>Boletus edulis</i> Bull. ex Fr.  | 1239                            | +                     |
| <i>Cenococcum graniforme</i> (Sow.) Ferd et Winge                         | 3543                            | ±                     |
| <i>C. graniforme</i>  | 4931                            | ±                     |
| <i>C. graniforme</i>  | 4947                            | +                     |
| <i>Hebeloma mesophaeum</i> (Pers. : Fr.) Quéf                             | 3037                            | +                     |
| <i>H. mesophaeum</i>  | 3050                            | +                     |
| <i>Lactarius quietus</i> Fr.  | 1377                            | +                     |
| <i>Suillus bovinus</i> (L. : Fr.) O. Kuntze                               | 1941                            | +                     |
| <i>Rhizopogon luteolus</i> Fr.  | 0211                            | +                     |
| izolat z ektendomikoryzy sosny<br>– fungus from ectendomycorrhiza of pine | MrgX                            | +                     |

+ znaczna aktywność fosfatazy (intensive activity)  
± aktywność nieco ograniczona (poor activity)

szeregiem innych parametrów określających dane siedlisko. Fosfor jest ważnym czynnikiem w systemie enzymów odpowiedzialnych za metabolizm węglowodanów (G ó r s k i 1961). Duży deficyt tego pierwiastka ogranicza ilość cukrów w roślinie, a od ich koncentracji w korzeniach z kolei zależy liczebność mikoryz (M e l i n 1953).

W warunkach przedstawionego doświadczenia, z racji złego oświetlenia, fotosynteza przy głodzie fosforowym mogła nie zapewniać odpowiedniego „minimum cukrowego”, by wykształciły się mikoryzy. Dodanie fosf. ru być może przyczyniło się do wzrostu zasobności węglowodanów w korzeniach, stymulując tworzenie mikoryz w kombinacjach zawierających P.

Przytoczone wyniki nie korespondują z danymi P a c h l e w s k i e j (1968), z których wynika, iż na agarze wodnym z tiaminą powstawały bardzo liczne mikoryzy. Różnice te można przypisać przypuszczalnie odmiennym warunkom oświetlenia i wilgotności, w jakich przeprowadzano doświadczenia, a być może także osłabionej aktywności mikoryzogennej szczepów.

Wszystkie badane izolaty odznaczały się zdolnością do syntezy fosfatazy, przy czym najmniej aktywne – na podstawie reakcji barwnej – okazały się dwa różne izolaty *Cenococcum graniforme*. Wyniki przedstawia tabela 1.

#### WNIOSKI

1. W hodowlach czystych, na podłożu głodowym, przy niekorzystnym oświetleniu, obserwuje się zredukowaną ilość mikoryz u siewek sosny.
2. Związki fosforu w wyżej wymienionych warunkach mogą oddziaływać dodatnio na wykształcanie mikoryz.
3. Wytwarzanie fosfatazy jest częstym zjawiskiem u grzybów ektomikoryzowych.

Składam podziękowanie panu profesorowi R. P a c h l e w s k i e m u za wyrażenie zgody na wykonanie fotografii do niniejszej pracy.

#### LITERATURA

- B a r t l e f t E. M., L e w i s D. H., 1973, Surface phosphatase activity of mycorrhizal roots of beech, *Soil Biol. Biochem.* 5: 249 - 257.
- B j ö r k m a n E., 1970, Forest tree mycorrhiza- the conditions for its formation and the significance for tree growth and afforestation. *Plant Soil* 32: 589 - 610.
- D o m i n i k T., 1961, Studium o mikoryzie. *Folia Forest. Polon. ser. A*, 5.
- M e l i n E., 1953, Physiology of mycorrhizal relations in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 4: 325 - 345.

- P a c h l e w s k a J., 1968, Badania nad syntezą mikoryzową sosny w czystych kulturach na agarze. Pr. IBL nr 345 - 350: 1 - 75.
- P a c h l e w s k i R., C h r u ś c i a k E., 1981, Effect of mineral sources of phosphorus on the growth of ectomycorrhizal fungi. Roczn. Glebozn. 32: 75 - 85.
- P a c h l e w s k i R., C h r u ś c i a k E., 1983, Wpływ różnych związków wapnia na wzrost grzybów ektomikoryzowych, Roczn. Glebozn. 34: 103 - 119.
- S k e r m a n V. B., Abstracts of microbiological methods, 1969, New York, London.
- Zbiorowo, 1961, Nawozy i nawożenie. II (red. M. Górski), Warszawa, PWRiL.