

Porównanie wzrostu oraz niektórych morfologicznych i anatomicznych cech *Rhizoctonia cerealis* i *R. solani*

ZBIGNIEW WEBER, TOMASZ ZDZIEBKOWSKI

Katedra Fitopatologii Akademii Rolniczej w Poznaniu

Weber Z., Zdziebkowski T.: (Academy of Agriculture, Chair of Phytophathology, Poznań, Dąbrowskiego 159, Poland). *Comparison of the growth and some morphological and anatomical features of Rhizoctonia cerealis and R. solani*. Acta Mycol. 25(2): 27-34, 1989 (1990).

In laboratory experiments were observed diameter of hyphae as well as the influence of temperature and kind of medium on mycelium growth, colour of colony and forming of sclerotia by *R. cerealis* and *R. solani*.

WSTĘP

Rhizoctonia solani Kühn po raz pierwszy została opisana w roku 1858 (teleomorfa nosi nazwę *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk 1956); w młodych wegetatywnych strzępkach występują u tego grzyba komórki wielojądrowe ze ścianami poprzecznymi z wyraźnym aparatem porowym (Parmeter, Sherwood, Platt 1969). O występowaniu gatunku podobnego do *R. solani*, lecz posiadającego dwujądrowe komórki i wytwarzającego zarodniki podstawkowe typowe dla rodzaju *Ceratobasidium*, donosili Parmeter, Whitney i Platt (1967). Prace porównawcze pozwoliły na opisanie nowego gatunku, *R. cerealis* van der Hoeven 1977.

Celem niniejszej pracy było porównanie *R. cerealis* i *R. solani* pod względem liczby jąder w komórkach rosnących strzępek, wzrostu grzybni, średnicy strzępek rosnącej części grzybni powietrznej, koloru kolonii i wytwarzania sklerot na dwóch pożywkach.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem pracy było sześć izolatów grzybów z rodzaju *Rhizoctonia*. Izolaty 1a i 1b, pochodzące z ostrych plam oczkowych pędów pszenżyta Gołębniak, Marcinowski 1988), okazały się gatunkiem *R. cerealis*, a

izolaty R-13 i R-2 wyizolowane z szychki korzeniowej rzepaku ozimego (Weber 1987) oraz Z-1 i Z-2 uzyskane ze sklerot występujących na bulwach ziemniaka – gatunkiem *R. solani*.

Przed przystąpieniem do określenia liczby jąder w komórkach strzępek, z rosnącej części kolonii pobierano grzybnię powietrzną, którą utrzymywano: przez 2 minuty w wodzie destylowanej, przez 2-3 minuty w 3⁰/₀ wodnym roztworze formaldehydu, przez 5-10 minut w 50⁰/₀ wodnym roztworze safraniny 0 (Martin 1987; Yamamoto, Uchida 1982). Wybarwione strzępki umieszczano w kropli gliceryny. W ten sposób przygotowane preparaty obserwowano w mikroskopie świetlnym Jenamed 2 (obiektyw Planachromat H. I. 100 × 1,30) przy powiększeniu 1000 ×.

Przy ocenie wpływu temperatury (10, 15, 20, 25 i 30°C) na wzrost grzybni izolatów określano wzrost liniowy podczas 3 i 4 doby na pożywkach: agarowo-glukozowo-ziemniaczanej (AGZ) i Czapka oraz przyrost suchej masy grzybni w czasie 23 dni na tych samych pożywkach pozbawionych agaru. W pierwszym przypadku w każdej kombinacji stosowano po 3 płytki Petriego o średnicy 90 mm z 18 ml pożywki, a w drugim po 3 kolbki stożkowe o pojemności 100 ml z 20 ml pożywki. Inokulum stanowiły krążki o średnicy 5 mm pożywki (odpowiednio AGZ lub Czapka) przerośnięte przez 7-10-dniowe kolonie grzybów. Wzrost liniowy określano wzdłuż dwóch prostopadłych linii każdej płytki Petriego. Przyrost suchej masy oceniano po zebraniu grzybni z każdej kolbki na oddzielny krążek bibuły o określonej masie. Suszenie grzybni wraz z bibułą wykonywano przy temp. 80°C do momentu uzyskania stałej masy.

Grubość strzępek grzybni powietrznej określano u kolonii ocenianych izolatów grzybów rosnących przy temp. 25°C na agarze AGZ i na pożywce Czapka. W każdej kombinacji wykonywano po 20-30 pomiarów średnicy wierzchołkowych komórek strzępek grzybni w połowie ich długości.

Opis koloru i występowania sklerot wykonano jednorazowo na 9-dniowych koloniach wszystkich izolatów grzybów z rodzaju *Rhizoctonia*.

W celu określenia istotności różnic szybkości wzrostu liniowego i przyrostu suchej masy grzybni oraz średnicy strzępek wykonano analizę wariancji. Przed wykonaniem obliczeń odpowiednie wartości przekształcono wg Freeman-Tukeya lub Bliss. Przy porównywaniu średnich wartości posługiwano się metodą Tukeya.

WYNIKI

Izolaty *Rhizoctonia* sp. pochodzące z pszenicy zawierały po 2, a pochodzące z rzepaku i ziemniaka – więcej niż 2 jądra w komórkach strzępek grzybni.

Szybkość wzrostu liniowego grzybni grzybów z rodzaju *Rhizoctonia* zale-

żała od temperatury i rodzaju pożywki (tab. 1, 2). Na pożywce AGZ maksymalny wzrost grzybni *R. cerealis* (5,8 - 5,9 mm/dobę) zanotowano przy temp. 20°C, chociaż wartości uzyskane przy temp. 25°C okazały się mniejsze w stopniu nieistotnym statystycznie (tab. 1). Maksymalny wzrost grzybni

Tabela 1 — Table 1

Wpływ temperatury na liniowy wzrost grzybów na pożywkach AGZ (A) i Czapka (B)
Influence of the temperature on the linear growth of fungi on potato-dextrose-agar (A) and Czapek medium (B)
(Poznań, 7-11.12.1987)

Gatunek Species	Izolat Isolate	Średni przyrost* grzybni w czasie 3 i 4 doby Mean growth rate* of the mycelium during 3 th and 4 th day (mm)					
		10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	
A <i>R. cerealis</i>	1a	1,5 ^{bc}	2,7 ^{de}	5,8 ^{gh}	4,4 ^{ef}	1,1 ^b	
	1b	1,9 ^{cd}	3,3 ^e	5,9 ^{hij}	5,3 ^{ghi}	2,8 ^e	
	<i>R. solani</i>	R-13	0,2 ^a	3,7 ^{ef}	8,0 ^{kl}	8,5 ^l	2,7 ^e
		R-2	0,4 ^a	6,0 ^{hij}	10,2 ^m	5,5 ^{ghi}	2,7 ^e
		Z-1	1,1 ^b	7,2 ^{jk}	12,6 ^{op}	12,3 ^{nop}	11,1 ^{mno}
		Z-2	1,7 ^{bc}	6,1 ^{ij}	11,2 ^{mno}	13,3 ^p	11,0 ^{mn}
B <i>R. cerealis</i>	1a	1,0 ^a	3,2 ^e	3,2 ^e	2,3 ^{cd}	2,0 ^{bc}	
	1b	1,3 ^{ab}	5,0 ^e	4,8 ^{fg}	3,2 ^{cd}	3,9 ^{ef}	
	<i>R. solani</i>	R-13	2,7 ^{cd}	10,7 ^{jkl}	10,6 ^{jkl}	8,6 ^{hij}	3,5 ^{ef}
		R-2	3,0 ^{cd}	8,5 ^{hi}	10,9 ^{jkl}	4,5 ^{fg}	1,4 ^{ab}
		Z-1	2,7 ^{cd}	4,7 ^{fg}	9,6 ^{jkl}	12,7 ^{mn}	11,2 ^{lm}
		Z-2	2,3 ^{cd}	7,4 ^{hi}	9,8 ^{jkl}	13,9 ⁿ	9,0 ^{ijk}

* — jednakowymi literami oznaczono wartości nie różniące się istotnie (means followed by the same letter are not significantly different at 5% level)

izolatów *R. solani* pochodzących z rzepaku (R-13, R-2) wynosił odpowiednio 8,5 (25°C) i 10,2 mm/dobę (20°C), a pochodzących ze sklerot znajdujących się na bulwach ziemniaka (Z-1, Z-2) — 12,6 (20°C) i 13,3 mm/dobę (25°C). Przy temp. 30°C szybkość wzrostu zbliżoną do maksymalnej stwierdzono jedynie u izolatów *R. solani* pochodzących z ziemniaka. Na pożywce Czapek maksymalny wzrost grzybni *R. cerealis* (3,2-5,0 mm/dobę) zanotowano przy temp. 15-20°C (tab. 1). Maksymalny wzrost grzybni izolatów *R. solani* pochodzących z rzepaku wynosił 10,7 (15°C) — 10,9 mm/dobę (20°C), a pochodzących z ziemniaka 12,7-13,9 mm/dobę (25°C).

Przyrost suchej masy grzybni na pożywce AGZ okazał się najwyższy przy temp. 10°C w przypadku *R. cerealis* (143 - 154 mg) oraz przy temp. 15 - 20°C w przypadku *R. solani* (176 - 209 mg), (tab. 2). Przyrost ten zależał od

Tabela 2 – Table 2

Wpływ temperatury na przyrost suchej masy grzybni na płynnych pożywkach AGZ (A) i Czapka (B)

Influence of the temperature on the increase of the mycelium mass of on liquid on liquid potato-dextrose medium (A) and on liquid Czapek medium (B)
(Poznań, 7-30.01.1988)

Gatunek Species	Izolat Isolate	Sucha masa grzybni w mg* Dry mass of mycelium in mg*				
		10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
A <i>R. cerealis</i>	1a	143 ^{ij}	88 ^{abc}	79 ^{ab}	71 ^a	110 ^{defg}
	1b	154 ^{ijk}	119 ^{fg}	117 ^{efg}	144 ^{ij}	137 ^{hi}
<i>R. solani</i>	R-13	170 ^{klmn}	206 ^r	195 ^{op}	142 ^{ij}	101 ^{cde}
	R-2	186 ^{mnop}	209 ^r	203 ^{op}	166 ^{kl}	123 ^{gh}
	Z-1	147 ^{ij}	169 ^{klm}	176 ^{lmno}	142 ^{ij}	94 ^{bcd}
	Z-2	157 ^{ik}	187 ^{nop}	180 ^{lmno}	144 ^{ij}	102 ^{cdef}
B <i>R. cerealis</i>	1a	72 ^a	127 ^{cd}	130 ^{cde}	205 ^{ij}	73 ^a
	1b	88 ^{ab}	149 ^{ef}	146 ^{de}	215 ^j	85 ^{ab}
<i>R. solani</i>	R-13	123 ^c	167 ^{fg}	177 ^{gh}	146 ^{def}	83 ^{ab}
	R-2	128 ^{cd}	187 ^{hi}	254 ^k	179 ^{gh}	124 ^c
	Z-1	98 ^b	337 ^l	326 ^l	212 ^j	137 ^{cde}
	Z-2	131 ^{ode}	369 ^{lm}	335 ^l	252 ^k	143 ^{cde}

* – jednakowymi literami oznaczono wartości nie różniące się istotnie (means followed by the same letter are not significantly different at 5% level)

gatunku i izolatu grzyba oraz od temperatury. Na pożywce Czapka największy przyrost suchej masy grzybni zanotowano przy temp. 25°C (205-215 mg) w przypadku *R. cerealis* oraz przy temp. 20°C w przypadku izolatów *R. solani* pochodzących z rzepaku (177-254 mg) i przy temp. 15°C, gdy izolaty *R. solani* pochodziły z ziemniaka (337-369 mg), (tab. 2).

Dziewięciodniowe kolonie *R. cerealis* na pożywce AGZ były białe lub jasnobrunatne (20-25°C) i nie wytwarzały sklerot (tab. 3). Izolaty *R. solani* pochodzące z rzepaku (R-13, R-2) były białe lub jasnobrunatne i przy temperaturze 15-25°C wytwarzały nieliczne skleroty. Kolonie izolatów z ziemniaka (Z-1, Z-2) przy temperaturze 20-25°C były ciemnobrunatne, a przy temperaturze 15-25°C wytwarzały liczne skleroty. Dziewięciodniowe kolonie *R. cerealis* na pożywce Czapka były białe. Jedynie przy temperaturze 25°C izolat 1b utworzył liczne skleroty (tab. 3). Kolonie izolatów (R-13, R-2) *R. solani* z rzepaku były białobrunatne i zwykle nie wytwarzały sklerot. Kolonie izolatów (Z-1, Z-2) tego gatunku z ziemniaka były białe do ciemnobrunatnych i prawie zawsze wytwarzały liczne skleroty.

Tabela 3 – Table 3

Kolor 9-dniowych kolonii grzybów i występowanie na nich sklerot, na pożywkach AGZ (A) i Czapka (B)

Colour of the 9-days colonies of Rhizoctonia species fungi and forming of the sclerotia by them on AGZ medium (A) and on Czapek medium (B)
(Poznań, 7–16.12.1987)

Gatunek Species	Izolat Isolate	Kolor kolonii* i obecność sklerot** Colonies colour* and presence of sclerotia**				
		10°C	15°C	20°C	25°C	30°C
A <i>R. cerealis</i>	1a	b. –	b. –	j.br. –	j.br. –	b. –
	1b	b. –	b. –	j.br. –	j.br. –	b. –
<i>R. solani</i>	R-13	b. –	j.br. +	j.br. +	j.br. +	j.br. –
	R-2	b. –	j.br. +	j.br. +	j.br. +	j.br. –
	Z-1	b. +	j.br. + +	c.br. + +	c.br. + +	c.br. – –
	Z-2	b. +	j.br. + +	c.br. + +	c.br. + +	c.br. – –
B <i>R. cerealis</i>	1a	b. –	b. –	b. –	b. –	b. –
	1b	b. –	b. –	b. –	b. + +	b. –
<i>R. solani</i>	R-13	b. –	br. –	j.br. –	j.br. –	j.br. –
	R-2	b. –	br. –	j.br. –	j.br. +	j.br. –
	Z-1	b. +	j.br. + +	j.br. + +	c.br. + +	c.br. + +
	Z-2	b. +	j.br. + +	j.br. + +	c.br. + +	c.br. + +

* – kolor (colour): b. – biały (white), br. – brązowy (brown), j.br. – jasnobrązowy (light brown), c.br. – ciemnobrązowy (dark brown)

** – skleroty (sclerotia): – brak (no), + nieliczne (not numerous), + + liczne (numerous)

Na pożywce AGZ średnica strzępek grzybni powietrznej *R. cerealis* wynosiła średnio 3,3–4,2 μm , a *R. solani* 5,5–7,9 μm (tab. 4). Na pożywce Czapka średnica strzępek grzybni powietrznej *R. cerealis* wynosiła średnio 2,5–3,3 μm , a *R. solani* 4,8–9,9 μm (tab. 4).

DYSKUSJA

W Polsce, podobnie jak w wielu innych krajach, obserwuje się coraz częstsze występowanie ostrej plamistości oczkowej na pszenicy, życie i pszenżycie (Hollins, Scott 1983; Łacicowa 1985; Pokacka, Wojtaszek 1977). Gatunki (*R. cerealis* i *R. solani*), które mogą powodować tę chorobę, identyfikuje się na podstawie liczby jąder w komórkach strzępek, szybkości wzrostu grzybni w ciemności na pożywce AGZ przy temp. 23°C, średnicy młodych strzępek grzybni oraz innych cech makro- i mikroskopowych

Tabela 4 – Table 4

Średnica strzępek powietrznej grzybni rosnącej części kolonii grzybów na pożywkach AGZ (A) i Czapka (B)

Diameter of air mycelium hyphal of the colony growing part of fungi on AGZ (A) and on Czapek medium (B)

(Poznań 7–10.12.1987)

Gatunek Species	Izolat Isolate	Średnica strzępek w μm Hyphal diameter in μm	
		zakres – range	średnio* – mean*
A <i>R. cerealis</i> <i>R. solani</i>	1a	(1,2)2,3-4,6(6,9)	4,2 ^a
	1b	2,3-4,6	3,3 ^a
	R-13	(4,6)6,9-8,1	7,1 ^{cd}
	R-2	(2,3)3,4-7,7	5,5 ^b
	Z-1	6,9-9,2	7,9 ^d
	Z-2	5,8-6,9(8,1)	6,7 ^c
B <i>R. cerealis</i> <i>R. solani</i>	1a	2,3- 4,6	3,3 ^b
	1b	(1,2)2,3- 3,4	2,5 ^a
	R-13	(3,4)4,6- 5,8	4,8 ^c
	R-2	(3,4)4,6- 6,9	5,3 ^d
	Z-1	6,9-11,5	9,9 ^f
	Z-2	4,6-11,5	7,7 ^e

* – jednakowymi literami oznaczono wartości nie różniące się istotnie
(means followed by the same letter are not significantly different at 5% level)

(Boerema, Verhoeven 1977; Parmeter 1970). Liczbę jąder w komórkach strzępek grzybni można określić po uprzednim ich wybarwieniu. Spośród różnych opisywanych w literaturze metod (Anderson 1982; Tu, Kimbrough 1973; Yamamoto, Uchida 1982; Lipps, Herr 1982; Martin 1987) łatwe do wykonania okazało się barwienie z formaldehydem i safraniną 0 podane w metodach niniejszej pracy. Jądra w tak wybarwionych strzępkach grzybni były dobrze widoczne w używanym mikroskopie, a prawie w ogóle nie można ich było zobaczyć w mikroskopie powiększającym 1350 razy (90×15) z obiektywem apochromatycznym.

Dobowy wzrost liniowy grzybni na pożywce AGZ wynosi u *R. cerealis* (przy 23°C) 4,8 - 7 mm (u izolatu 1a wzrost ten przy 25°C był już niższy od 4,8 i wynosił 4,4 mm), a u *R. solani* na tej pożywce przy tej samej temperaturze jest on większy; dobowy wzrost liniowy grzybni *R. solani* przy 25°C wahał się od 5,5 (R-2) do 13,3 mm (Z-2).

Trzecim ważnym elementem określanym przy oznaczaniu grzybów z rodzaju *Rhizoctonia* jest średnica młodych strzępek grzybni. Na agarze

ziemniaczanym średnica strzępek *R. cerealis* wynosi 2,8 - 5,5 μm (Boerema, Verhoeven 1977), a *R. solani* jest większa od 5 μm (Parmeter, Sherwood, Platt 1969). Średnie wielkości średnicy młodych strzępek grzybni ocenianych izolatów utrzymywanych w temp. 25°C obydwu gatunków grzybów mieściły się w podanych przedziałach. Na pożywce AGZ optymalne temperatury dla liniowego wzrostu *R. cerealis* wahały się w granicach 20 - 25°C, a *R. solani* w zależności od izolatu wynosiły 20 - 25 - 30°C. U Sandersa, Burpe'a i Colego (1978) optymalnymi okazały się odpowiednio temperatury 21 - 23°C i 28°C.

Różnice, jakie uzyskano w przyroście suchej masy grzybni między *R. cerealis* i *R. solani*, tylko częściowo są skorelowane z wartościami dotyczącymi przyrostu liniowego i wykazują małą regularność. Wydaje się, że ocena przyrostu suchej masy grzybni nie jest przydatna przy oznaczaniu omawianych dwóch gatunków grzybów z rodzaju *Rhizoctonia*. Kolor kilkudniowych kolonii i wytwarzanie sklerot, szczególnie na pożywce AGZ, wydają się być dość ważnym dodatkowym kryterium przy oznaczaniu obu gatunków grzybów (Błaszczak 1958; Boerema, Verhoeven 1977; Parmeter 1970). W przedziałach temperatury optymalnej dla wzrostu liniowego poszczególnych gatunków obserwowano jasnobrunatne zabarwienie kolonii *R. cerealis* i brunatne lub ciemnobrunatne kolonii *R. solani*.

Podsumowując należy stwierdzić, że wśród wielu cech pozwalających odróżnić *R. cerealis* od *R. solani* bardzo ważnymi są: liczba jąder w komórkach strzępek grzybni, średnica młodych strzępek grzybni powietrznej i szybkość wzrostu liniowego grzybni na agarze glukozowo-ziemniaczanym przy temp. 23°C.

LITERATURA

- Anderson N. A., 1982, The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Ann. Rev. Phytopath. 20: 329 - 347.
- Błaszczak W., 1958, Badania nad rizoktoniozą ziemniaków. II. Prace Kom. Nauk Roln. i Leśn. Pozn. Tow. Przyj. Nauk IV, 4: 81 - 114.
- Boerema G. H., Verhoeven A. A., 1977, *Rhizoctonia cerealis* van der Hoeven. In Check-list for scientific names of common parasitic fungi. Ser. 2 b, Neth. J. Pl. Path. 83: 191 - 192.
- Gołębniak B., Marcinowski D., 1988, Występowanie chorób na pszenżycie w RZD Złotniki w roku 1987. Katedra Fitop. Akad. Roln. w Poznaniu. Ms.
- Hollins T. W., Scott P. R., 1983, Resistance of wheat cultivars to sharp eyespot caused by *Rhizoctonia cerealis*. Ann. of Appl. Biol. Supl., 102: 126 - 127.
- Lipps P. E., Herr L. J., 1982, Etiology of *Rhizoctonia cerealis* in sharp eyespot on wheat. Phytopath. 72: 1574 - 1577.
- Łacicowa B., 1985, Choroby podsuszkowe pszenżyta powodowane przez *Fusarium* spp. i *Rhizoctonia solani* Kühn. Ochr. Roślin 11: 3 - 5.
- Martin B., 1987, Rapid tentative identification of *Rhizoctonia* spp. associated with diseased turfgrasses. Plant Dis. 71: 47 - 49.

- Parmeter J. R., 1970, *Rhizoctonia solani* biology and pathology. Univ. Calif. Press: 1-255.
- Parmeter J. R., Sherwood R. T., Platt W. D., 1969, Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopath.* 59: 1270-1278.
- Parmeter J. R., Whitney H. S., Platt W. D., 1967, Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopath.* 57: 218-223.
- Pokacka Z., Wojtaszek D., 1977, Z badań nad patogenicznością *Rhizoctonia solani* Kühn na pszenicy i życie. *Mater. XVII Sesji Nauk. IOR*: 181-191.
- Sanders P. L., Burpee L. L., Cole H., 1978, Preliminary studies on binucleate turfgrass pathogens that resemble *Rhizoctonia solani*. *Phytopath.* 68: 145-148.
- Tu C. C., Kimbrough I. W., 1973, A rapid staining technique for *Rhizoctonia solani* and related fungi. *Mycologia* 65: 941-944.
- Weber Z., 1987, Susceptibility of rape to fungi causing root rot. *Abstr. 7 Intern. Rapeseed Congr. Poznań 11-14 May 1987*: 238.
- Yamamoto D. T., Uchida J. Y., 1982, Rapid nuclear staining of *Rhizoctonia solani* and related fungi with acridine orange and with safranin O. *Mycologia* 74: 1-3: 145-149.

SUMMARY

One of the simplest methods of staining nuclei of *Rhizoctonia cerealis* and *R. solani* proved to be that with 3% formaldehyde and 50% of safranin O. The nuclei were seen very well in the light microscope Jenamed 2 with objective Planachromat H. I. 100 × 1.30. The rate of linear growth, diameter of young air hyphae, colour of colony and formation of sclerotia in the case of two binucleate isolates from triticale were typical for *R. cerealis* and in the case of multinucleate isolates from rape and potato it appeared tht they are characteristic for *R. solani*.