

Badania nad grzybami z rodzaju *Typhula* II.

Właściwości biologiczne

MARIA DYNOWSKA

Zakład Botaniki Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Olsztynie

D y n o w s k a M.: (Department of Botany, Institute of Biology, Teachers Training College, Żołnierska 14, 10-561 Olsztyn, Poland). *Studies on fungi of the genus Typhula II. The biological propriety*. Acta Mycol. 20(1): 71-94, 1984.

The basic biological properties of several representatives of fungi from the genus *Typhula* were investigated. Enzymatic activity is connected with the way of living of particular species and closely corresponds with pathogenic properties. The highest degree of pathogenicity is found for *T. ishikariensis*.

PRZEGLĄD LITERATURY

Dotychczasowe badania wykazały, że większość grzybów z rodzaju *Typhula* może rozwijać się w zakresie temperatur od 0 do 21°C. Jednakże optimum termiczne bywa różne dla poszczególnych gatunków i stadiów rozwojowych (B e r t h i e r 1976; C o r n e r 1950; L e h m a n n 1965a,b; P o t a t o s o w a 1960b).

Według B r u e h l a i C u n f e r a (1975) wzrost grzybni *Typhula incarnata* Lasch, ex Fr. przebiega najszybciej w temp. 10°C, podczas gdy L e h m a n n (1965a) podaje 7°C. Ten sam autor twierdzi, że intensywność rozwoju grzybni szybciej maleje w miarę spadku niż wzrostu temperatury. Dla *T. ishikariensis* Imai optimum wynosi 5°C, a dla *T. idahoensis* Remsberg – 15°C (B r u e h l, C u n f e r 1975) lub 9-12°C (C o r n e r 1950).

Rozwój sklerot *T. incarnata* na podłożach naturalnych odbywa się najszybciej w temperaturze 6°C. Natomiast zarodniki podstawkowe tego grzyba lepiej kiełkują w temperaturze od 12-17°C (L e h m a n n 1965a). Wilgotność odgrywa mniejszą rolę niż temperatura, jednak L e h m a n n (1965a) zauważył, że do prawidłowego rozwoju *T. incarnata* niezbędny jest określony stopień wilgotności.

Decydujące znaczenie dla rozwoju większości gatunków ma grubość i okres zalegania pokrywy śnieżnej. W rejonach, w których śnieg utrzymuje się długo, szczególnie dobrze rozwijają się *T. ishikariensis* i *T. idahoensis* (Årsvoll, Smith 1978; Bruehl, Cunfer 1975).

Z badań Lehmana (1965a,b) nad *T. incarnata* wynika, że grzyb ten w warunkach anaerobowych nie rozwija się. Zaciemnienie przyspiesza wzrost jego grzybni, natomiast rozwój sklerot następuje niezależnie od intensywności i długości fali światła. Według autora istnieje niezbędny okres promieniowania konieczny do wytworzenia zarodników podstawkowych. Światło o zróżnicowanej długości fali indukuje tworzenie zarodników podstawkowych.

Grzybniami z rodzaju *Typhula* zajmowało się dotychczas wielu autorów, szczególnie w krajach skandynawskich (Jamalainen 1964), w Ameryce Północnej (Bruehl, Cunfer 1975), NRD i NRF (Lehmann 1965a,b), Związku Radzieckim (Ignatovič 1951; Potatosowa 1960a,b) i Czechosłowacji (Zvára, Kuběš 1971). Większość opisanych gatunków to saprofity, jednak niektóre okazały się groźnymi patogenami i zaliczane są do pasożytów fakultatywnych. Do tych ostatnich należą: *T. incarnata*, *T. ishikariensis*, *T. idahoensis* oraz *T. trifolii* Rostr. Z badań patogeniczności *T. incarnata* wynika, że w warunkach NRD i RFN w największym stopniu porażany jest jęczmień ozimy, rzadziej pszenica i żyto (Lehmann 1965a). Według Bruehla i Cunfera (1975) jest to grzyb pospolity, łatwo przystosowujący się do warunków otoczenia, w związku z czym może być spotykany częściej od innych.

Jako patogeny zbóż ozimych podawane są również *T. ishikariensis* i *T. idahoensis*. Gatunki te zawsze omawiane są razem z racji ich dużego podobieństwa. Wyjaśnienie szeregu powiązań między nimi z uwzględnieniem cech genetycznych znaleźć można w pracach Årsvolla i Smitha (1978), Bruehla i Cunfera (1975) oraz Bruehla, Machtes i Kiyomoto (1975).

T. ishikariensis jest gatunkiem, który dominuje na ozimych zbożach i trawach porastających obszary uprzednio zalesione, o dużej wilgotności i długo utrzymującej się pokrywie śnieżnej (Årsvoll, Smith 1978; Bruehl, Cunfer 1975; Jańczak 1978). Jest też najbardziej wirulentna ze wszystkich gatunków omawianego rodzaju, atakuje nie tylko trawy, ale także niektóre warzywa i chwasty (Bruehl, Cunfer 1975). Bardzo często towarzyszy jej *T. idahoensis* (Cunfer 1974; Cunfer, Bruehl 1973). Grzyb ten rozwija się szczególnie dobrze na terenach o długim zaleganiu pokrywy śnieżnej, a będących niegdyś łąkami lub pastwiskami (Jańczak 1978).

Objawy choroby powodowanej przez *T. incarnata* występują po stopnieniu śniegu. Zewnętrzne liście zakażonej rośliny zwolna żółkną od wierzchołka aż do podstawy. Przy silnym porażeniu liście zewnętrzne obumierają, a szyjka

korzeniowa zamiera. Na obumarłych blaszkach, a także w pochwach liściowych, tworzą się skleroty grzyba. Występują one również we wnętrzu zbutwiałej tkanki i na korzeniach w pobliżu gleby (L e h m a n n 1965a).

T. ishikariensis, *T. idahoensis* w Kanadzie może występować już jesienią, podczas chłodnej i deszczowej pogody (B r u e h l, C u n f e r 1975). Grzybnia rozwija się zimą, pod warstwą śniegu, wiosną pojawia się na powierzchni gleby oraz na porażonych roślinach. Chore rośliny wyglądają jak oparzone wrzątkiem. Zazwyczaj zniszczeniu ulega węzeł krzewienia. Nadziemne części łatwo oddzielają się od podziemnych. Rozwój choroby w dalszych etapach przebiega tak samo jak w przypadku *T. incarnata*. Istotna różnica leży w stopniu wirulencji omawianych gatunków.

B r u e h l i C u n f e r (1975) przeprowadzili porównawcze badania patogeniczności *T. incarnata*, *T. ishikariensis* i *T. idahoensis* w stosunku do pszenicy, rzepaku ozimego i koniczyny. *T. ishikariensis* powodowała zniszczenie wszystkich zakażonych roślin. Pozostałe wykazały mniejszą szkodliwość.

Dalszy gatunek patogeniczny, *T. trifolii*, jest przyczyną częstych zachorowań i zamierania koniczyny czerwonej na terenie Związku Radzieckiego i Czechosłowacji (I g n a t o v i ě 1951; Z v ā r a, K u b e š 1971). Poza wyżej wymienionymi krajami notowany jest również na terenie Danii, Norwegii, Szwecji (Y l i m ā k i 1969) i Węgier (P o t a t o s o v a 1960b).

W przypadku chorób powodowanych przez grzyby z rodzaju *Typhula* główne źródła infekcji stanowią skleroty utworzone na początku wiosny i pozostające na szczątkach chorych roślin. Rozwój sklerot nie zależy od obecności rośliny żywicielskiej; istotną rolę odgrywa głębokość zalegania przetrwalników w glebie oraz rodzaj gleby (L e h m a n n 1965a,b; P o t a t o s o v a 1960a; V o l k 1937).

Autorzy zajmujący się badaniem gatunków pasożytniczych w różny sposób interpretują mechanizm infekcji. C o r m a c k i L e b e a u (1959) stoją na stanowisku, że w warunkach naturalnych infekcja następuje tylko poprzez miejsca zranione. Częściowo potwierdził to L e h m a n n (1965a). Dowiódł również, że rośliny słabe lub mechanicznie uszkodzone są atakowane częściej, a grzybnia haploidalna powstająca z zarodników podstawkowych wykazuje słabszą patogeniczność niż diploidalna, która rozwija się ze sklerot. Ponadto L e h m a n n (1965a) wykazał, że grzybnia *T. incarnata* wytwarza egzotoksynę zdolną do wywoływania szeregu zaburzeń w przemianie materii rośliny-żywiciela. V o l k (1937) uważa, że infekcja najczęściej następuje przez korzenie.

Z mechanizmami infekcji ściśle wiąże się problem aktywności enzymatycznej. B e r t h i e r (1976) podjął próby wykrycia u grzybów z rodzaju *Typhula* celulazy, lakazy i tyrozynazy. Wykazał m.in. istnienie celulazy u *T. ishikariensis* i *T. phacorrhiza* oraz celulazy i lakazy u *T. incarnata*. Z dostępnej

literatury wynika, że jest to pierwsza i dotychczas jedyna wzmianka na temat syntetyzowania niektórych enzymów przez opisywane grzyby.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wzięto po 3 izolaty gatunków: *T. incarnata* Lasch ex Fr., *T. phacorrhiza* Fr., *T. sclerotioides* (Pers.) Fr. i *Typhula* sp. oraz 2 izolaty *T. ishikariensis* Imai zebranych w różnych punktach województwa olsztyńskiego. Wybrane do badań izolaty pochodziły ze stanowisk ekologicznie różnych i znacznie oddalonych od siebie.

W celu wyhodowania grzybni na wyjałowione płytki Petriego z agarem glukozowo-ziemniaczanym wykładano odkażone powierzchniowo skleroty i fragmenty owocników. Płyn odkażający stanowił 0,1% roztwór sublimatu lub mieszanina alkoholu etylowego i 5,25% podchlorynu sodu w stosunku 1:1. Hodowle inkubowano w lodówce oraz w temperaturze pokojowej. Najodpowiedniejszą porą roku do izolowania grzybów była jesień, a szczególnie październik i listopad. W tym okresie rozwój grzybni był najintensywniejszy i następował najszybciej.

Wpływ temperatury i rodzaju podłoża na wzrost i rozwój grzybni badano na agarze glukozowo-ziemniaczanym o pH 5,8 i pożywce Czapek-Doxa o pH 5,5. Inokula o średnicy 5 mm wykładano na płytki Petriego i inkubowano w temp. 5, 10, 15, 20 i 25°C. Przyrost grzybni mierzono w odstępach 2-dniowych, w ciągu 14 dni, biorąc pod uwagę dwie prostopadłe do siebie średnice kultur. Po 2 tygodniach określano: morfologię kolonii; układ, kształt i wielkość oraz zabarwienie sklerot; grubość strzępek.

Wpływ kwasowości podłoża na wzrost i rozwój grzybni badano na agarze glukozowo-ziemniaczanym, przyjmując następujące wartości pH: 4, 5, 6, 7 i 8. Przy pomiarach kwasowości stosowano metodę kolorymetryczną.

Poszczególne kultury hodowano w tych zakresach temperatury, w których wykazywały największy przyrost. Po upływie 2 tygodni oceniono wzrost i rozwój grzybni, stosując kryteria takie same jak przy badaniu wpływu temperatury i rodzaju podłoża.

Rozwój grzybów na podłożach naturalnych prowadzono na wyjałowionych kawałkach liści i łodyg 16 gatunków roślin naczyniowych, na których znajdowano skleroty grzybów i umieszczano w probówkach zawierających 3 ml agaru wodnego. Probówki autoklawowano dwukrotnie. Po wyjałowieniu w każdej umieszczono niewielką ilość grzybni wyhodowanej na agarze glukozowo-ziemniaczanym. Obserwacje przeprowadzano co 2 dni, ostateczne wyniki zanotowano po upływie 4 tygodni.

Oznaczanie aktywności enzymatycznej. Wychodząc z założenia, że w życiu grzybów ważną rolę odgrywają wytwarzane przez nie enzymy, podjęto wstępne badania w celu ujawnienia obecności poligalakturonazy, lipazy, celulazy i

proteaz. Wszystkie próby przeprowadzano jesienią w trzech powtórzeniach.

Zdolność do rozkładu pektyny określano metodą *Verbiny i Cury* (1969). Kryterium stanowiła zmiana zabarwienia czerwieni metylowej pod wpływem nagromadzającego się w środowisku kwasu galakturonowego, który powstaje przy enzymatycznym rozczepieniu pektyny. W przypadku grzybów mających własności pektolityczne wokół kolonii ukazywała się czerwona strefa uwarunkowana zmianą wartości pH pożywki. Średnice tych stref mierzono codziennie przez 14 dni.

Rozkład tłuszczów badano zgodnie z metodą podaną przez *Chruścika* (1974) przeszczepiając grzyby na 1-procentowy agar wodny z dodatkiem tłuszczu w ilości 10 g/l i błękitu bromotymolowego jako wskaźnika. Wokół kolonii wytwarzających lipazę obserwowano zmianę zabarwienia podłoża z niebieskiego na żółte, spowodowaną powstawaniem wolnych kwasów tłuszczowych. Hodowle prowadzono przez 14 dni w temp. 15°C, a następnie dokonano pomiaru żółtej strefy.

Wstępną analizę własności celulolitycznych przeprowadzono na podłożu *Dubosa* (*Chruścika* 1974; *Rodina* 1968) z paskami bibuły filtracyjnej jako jedynym źródłem węgla. Paski o masie początkowej 0,07 g umieszczano w probówkach z pożywką, a następnie autoklawowano i inokulowano grzybnią badanych szczepów. Po 3 tygodniach inkubacji w temp. 15°C bibułę wyjmowano i płukano w wodzie destylowanej usuwając grzybnię, która przyczepiła się do jej powierzchni. Paski suszono do stałej masy w temp. 95°C i ponownie ważono. Ubytek masy świadczył o rozkładzie celulozy przez grzyb.

Rozkład białka badano na żelatynie odżywczej, przy czym miarą zdolności proteolitycznych był stopień upłynnienia podłoża (*Chruścika* 1974). Hodowle inkubowano w temp. 15°C. Po upływie 2 tygodni mierzono i porównano średnice upłynnionych stref.

Badanie patogeniczności. Do doświadczeń infekcyjnych przeprowadzonych jesienią wzięto 3 gatunki roślin żywicielskich: koniczynę czerwoną 'Hruszowską', rzepak ozimy 'Primor' i żyto ozime 'Dańkowskie Złote' oraz 5 badanych gatunków grzybów z rodzaju *Typhula*. Nasiona odkażone powierzchniowo 50% alkoholem etylowym i 0,1% sublimatem wysiano w sierpniu do doniczek z wysterylizowaną glebą i pozostawiono na wolnym powietrzu. W każdej doniczce umieszczono kilkanaście nasion, a po wykiełkowaniu i pojawieniu się pierwszych liści pozostawiono po 10 normalnie rozwiniętych roślin. Następnie przygotowano materiał infekcyjny. Grzybnię wybranych izolatów namnożono w zamkniętych słojach na wyjałowionej pożywce glebowej. Hodowle prowadzono w temperaturze optymalnej dla każdego gatunku grzyba przez 4 tygodnie, tj. do momentu przerośnięcia pożywki przez grzybnię.

Rośliny zakażono w drugiej dekadzie listopada. W tym celu na powierzchni gleby pomiędzy roślinami rozsypano po 100 ml rozdrobnionego materiału

infekcyjnego, przeznaczając dla każdego grzyba 5 doniczek z danym gatunkiem żywicielskim. Doniczki przykryto płatami ligniny zmoczonymi wodą, imitującymi śnieg (K o c z o w s k a 1977). Hodowle prowadzono początkowo na wolnym powietrzu w miejscu zacienionym. Po 2 tygodniach, gdy temperatura spadła poniżej $0,5^{\circ}\text{C}$, doniczki zostały przeniesione do piwnicy o temperaturze nie przekraczającej 5°C . Przez cały czas trwania doświadczenia rośliny były kontrolowane, a gleba utrzymywana w stanie wilgotnym. Po 60 dniach przeanalizowano zmiany w wyglądzie i rozwoju roślin oraz przeprowadzono obliczenia wyróżniając: rośliny martwe, rośliny chore i rośliny zdrowe.

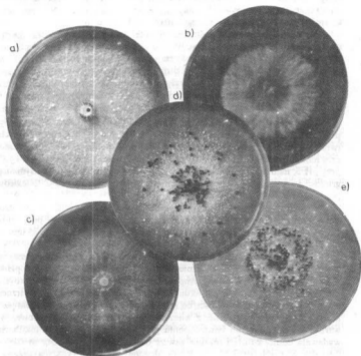
WYNIKI

T. incarnata (ryc. 1a) najlepszy rozwój wykazała na agarze glukozowo-ziemniaczanym w temp. 10°C przy pH 6, najslabszy w temp. 5°C przy pH 4 (ryc. 2a). W optymalnych warunkach kolonie zawsze były w zarysie regularne, strefowane, z wierzchu białe, puszyste i połyskujące, wysokości 1,5-2(3) mm, od spodu mniej lub bardziej różowe. Skleroty kuliste i owalne występowały pojedynczo lub w luźnych skupieniach. Ich wymiary wynosiły (0,7)1,2-1,5-2,3(3) mm, najczęściej były barwy różowej lub różowoczerwonej i tworzyły układ koncentryczny lub regularnie rozproszony.

Przy mikroskopowej analizie kolonii zauważono, że strzępki intensywnie rozgałęziają się, często są nierównomiernie zgrubiałe, z licznymi uwypukleniami. Największą grubość ($10\ \mu\text{m}$) osiągnęły strzępki przy pH 7 i 8 w temp. 15°C . W optymalnych warunkach były nieco cieńsze (do $7,5\ \mu\text{m}$).

Na pożywce Czapek-Doxa kolonie były nieregularne, bezbarwne, prawie całkowicie pozbawione grzybni powietrznej. Cienkie strzępki (do $3,74\ \mu\text{m}$) słabo rozgałęziały się tworząc bardzo niewyraźną i nikłą grzybnię. Najintensywniejszy wzrost uzyskano w temp. 15°C , najslabszy w temp. 5°C . Skleroty nie występowały.

T. ishikariensis (ryc. 1b) osiągnęła optymalny wzrost na agarze glukozowo-ziemniaczanym w temp. 5°C przy pH 6, najslabszy w temp. 15°C przy pH 4 (ryc. 2b). W niższej temperaturze w całym badanym zakresie pH kolonie były przeważnie regularne, koncentrycznie strefowane, z wierzchu śnieżnobiałe, puszyste, połyskujące, wysokości do 3 mm, o obfitej grzybni powietrznej, od spodu kremowobrazowe. Kuliste, białe, ciemnobrazowe i czarne skleroty o wymiarach $0,1-0,5 \times 0,5-0,65\ \text{mm}$ były regularnie rozrzucone na całej powierzchni kolonii lub ułożone w koncentrycznych kręgach. Największe ($0,5-1,2 \times 0,5-1\ \text{mm}$) powstały w temp. 15°C przy pH 8, najmniejsze i typowe dla badanego gatunku w temperaturze 5°C . W wyższej temperaturze kolonie stawały się nieregularne i przybierały zabarwienie brązowe. Najgrubsze strzępki (do $7,5\ \mu\text{m}$) obserwowano w warunkach optymalnych.



Ryc. 1. Wzrost grzybów na agarze glukozowo-ziemniaczanym
The growth of fungi on potato dextrose agar

a - *T. incarnata*; b - *T. ishikariensis*; c - *T. phaeocephala*; d - *T. sclerotoides*; e - *Typhula* sp.

Na pożywce Czapek-Doxa rozwój *T. ishikariensis* był wyraźnie słabszy. Bezbarwne kolonie o nieregularnym brzegu, przeważnie zanurzone w podłożu, charakteryzowały się najmniejszymi rozmiarami w porównaniu z pozostałymi gatunkami. Bardzo nikła grzybnia składała się z cienkich strzępek, osiągających maksymalną grubość (4,5 μm) w temp. 5 i 20°C. Skleroty tworzyły się jedynie w

temp. 15 i 20°C. Ich barwa, kształt i układ były identyczne jak na agarze glukozowo-ziemniaczanym. Różniły się jedynie wielkością. Na pożywce Czapek-Doxa były wyraźnie mniejsze (0,08-0,2 × 0,08-0,16 mm).

T. phacorrhiza (ryc. 1c) osiągnęła najintensywniejszy wzrost na agarze glukozowo-ziemniaczanym w temp. 10°C przy pH 8, najslabiej rosła przy pH 4 w temp. 5°C (ryc. 2c). Niezależnie od temperatury i pH podłoża kolonie były zawsze regularne, z wierzchu białe, od spodu kremowe. Konsystencja i wygląd powierzchni w różnej temperaturze były różne: od puszystych, kosmkowatych i połyskujących w temperaturze niższej, do kutnerowatych, nikłych, prószystych i często zagłębionych w podłożu w wyższej.

Skleroty występowały w kilku przypadkach. Najczęściej tworzyły się przy pH 7 w temp. 10°C w postaci nieregularnych lub owalnych, półprzezroczystych tworów wielkości 1,5-2 × 1-1,5 mm, barwy beżowożółtej, leżących bezpośrednio przy inokulum. Największe skleroty (3-3,5 × 2,5-2,5 mm) powstały w temp. 10°C przy pH 5, najmniejsze (0,1 × 0,2 mm) przy pH 6 w temp. 15°C. Maksymalną grubość strzępek (7 μm) obserwowano przy pH 7 w temp. 10°C. Niekiedy pojawiały się płonne, białawe owocniki.

Na pożywce Czapek-Doxa grzybnia *T. phacorrhiza* rozwijała się bardzo słabo. Otrzymano kolonie bezbarwne, prawie zawsze zagłębione w podłożu o bardzo delikatnych strzępkach, osiągających maksymalną grubość (6,25 μm) w temp. 20°C. Na omawianym podłożu skleroty nie występowały.

T. sklerotiolides (ryc. 1d) najlepiej rosła na agarze glukozowo-ziemniaczanym w temp. 15°C, przy pH 7, nieznacznie słabiej przy pH 5 i 6, najslabiej przy pH 4 w temp. 10°C (ryc. 2d). W niższej temperaturze otrzymano kolonie o regularnych kształtach, z wierzchu białe, połyskujące, puszyste, o obfitej grzybni powietrznej dochodzącej do 5 mm wysokości, od spodu kremowe. W wyższej temperaturze kolonie były mniej regularne, z wierzchu kremowe, od spodu brązowe. W warunkach optymalnych bardzo obfita grzybnia już po 4 dniach inkubacji wydawała liczne, kuliste i owalne, zawsze ciemnobrązowe, skleroty wielkości 0,1-0,4 × 0,1-0,4 lub 0,8-1 × 0,9-2 mm ułożone w koncentrycznych kręgach wykazujące tendencję do zlewania się. Skleroty nie powstawały jedynie w temp. 5°C. Najgrubsze strzępki (8,25-8,75 μm) tworzyły się w temp. 20°C przy pH 6. W niższej temperaturze więcej było strzępek cieńszych z licznymi rozgałęzieniami i uwypukleniami niż grubszych, nierozgałęzionych i bez uwypukleń.

Pożywka Czapek-Doxa i w tym przypadku okazała się mniej korzystna dla rozwoju grzyba niż agar glukozowo-ziemniaczany. Kolonie zawsze nieregularne, zagłębione w podłożu, były zbudowane z delikatnych, nikłych, w różny sposób rozgałęziających się strzępek. Najgrubsze (5,25 μm) wytwarzały się w temp. 10°C. Skleroty nie tworzyły się.

Typhula sp. (ryc. 1e) osiągnęła maksymalny wzrost na agarze glukozowo-

-ziemniaczanym przy pH 7, nieco słabszy przy pH 6 w temp. 15°C, minimalny przy pH 4 w temp. 10°C. W optymalnych warunkach kolonie zawsze były regularne, z wierzchu białe i puszyste, koncentrycznie strefowane, od spodu kremowe. Niezależnie od poziomu pH pojawiały się kuliste i owalne skleroty o barwie brązowej i czarnej ułożone w koncentrycznych kręgach, z tendencją do zlewania się i tworzenia skupień. Wielkość przetrwalników wahała się od 0,5-1,5 × 0,5-0,8 mm w temp. 20°C do 1-3,2 × 1-2,1 mm w temp. 15°C. Najgrubsze strzępki (7,5 μm) obserwowano przy pH 7 w temp. 15°C.

Na pożywce Czapek-Doxa wszystkie kolonie rosły bardzo słabo, były do siebie podobne, bezbarwne, pajęczynowate, o nikłej grzybni, pozbawione sklerot. Najgrubsze strzępki (3,75 μm) tworzyły się w temp. 15°C.

Z analizy pomiarów wynika, że grzyby z rodzaju *Typhula* rozwijają się na obydwu badanych podłożach w temp. od 5 do 20°C, przy czym na agarze glukozowo-ziemniaczanym wzrost jest intensywniejszy niż na podłożu Czapek-Doxa. Grzyby te rosną przy całym przyjętym zakresie pH, optimum leży w granicach pH 6-7. Wyjątek stanowi *T. phacorrhiza*, która okazała się gatunkiem bazofilnym wykazującym optimum wzrostu przy pH 8.

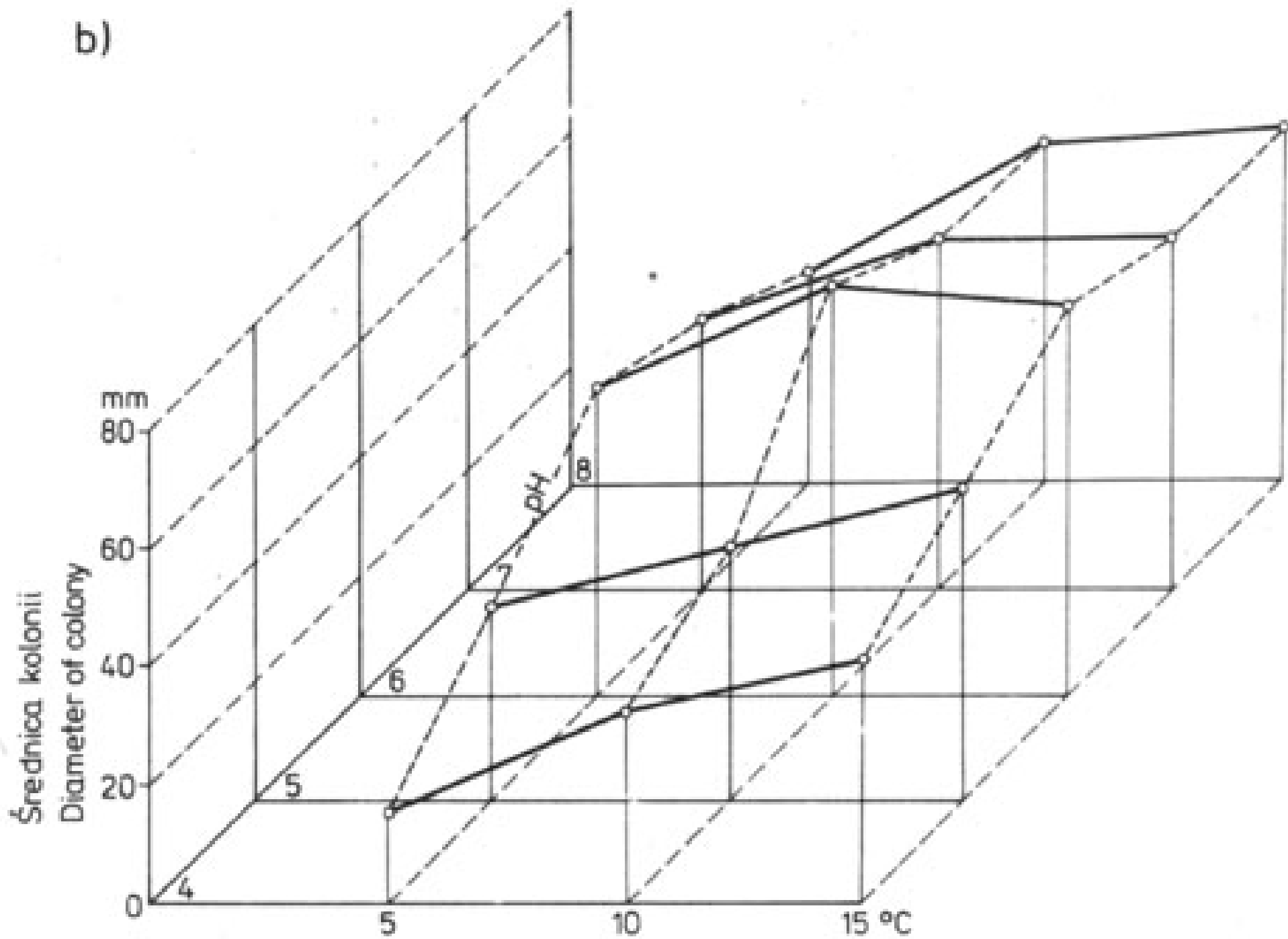
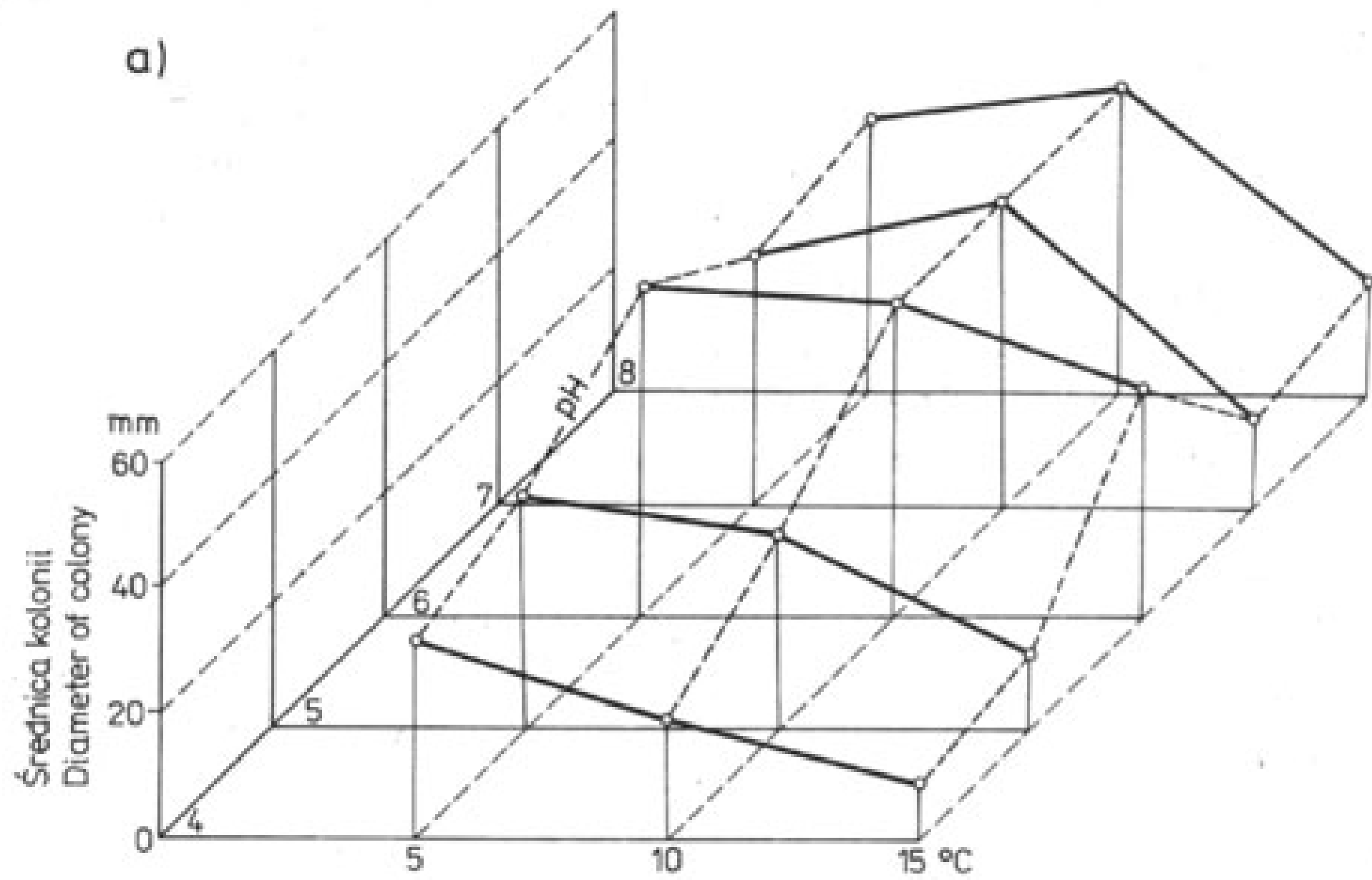
Rozwój grzybów na podłożach naturalnych. Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić różnice we wzroście grzybów na fragmentach wybranych gatunków roślin naczyniowych (tab. 1). Na podłożach, na których badano grzyby ich grzybnia zawsze była obfita, puszysta i połyskująca, z licznymi sklerotami o kształcie oraz zabarwieniu charakterystycznym dla danego gatunku. We wszystkich przypadkach po upływie miesiąca wzrost ustawał, a grzybnia lekko przysychała. Zwiększała się jedynie liczba sklerot.

T. phacorrhiza (ryc. 3a) i *Typhula* sp. (ryc. 3b) rozwijały się na wszystkich substratach roślinnych, przy czym pierwsza wytwarzała nawet długie, nitkowate i płonne owocniki. Najsłabszy wzrost dał się zauważyć u *T. ishikariensis*. *T. incarnata* i *T. sclerotioides* tylko na niektórych podłożach wykazywały wzrost intensywny (ryc. 3c i d), na ogół rozwój ich był umiarkowany.

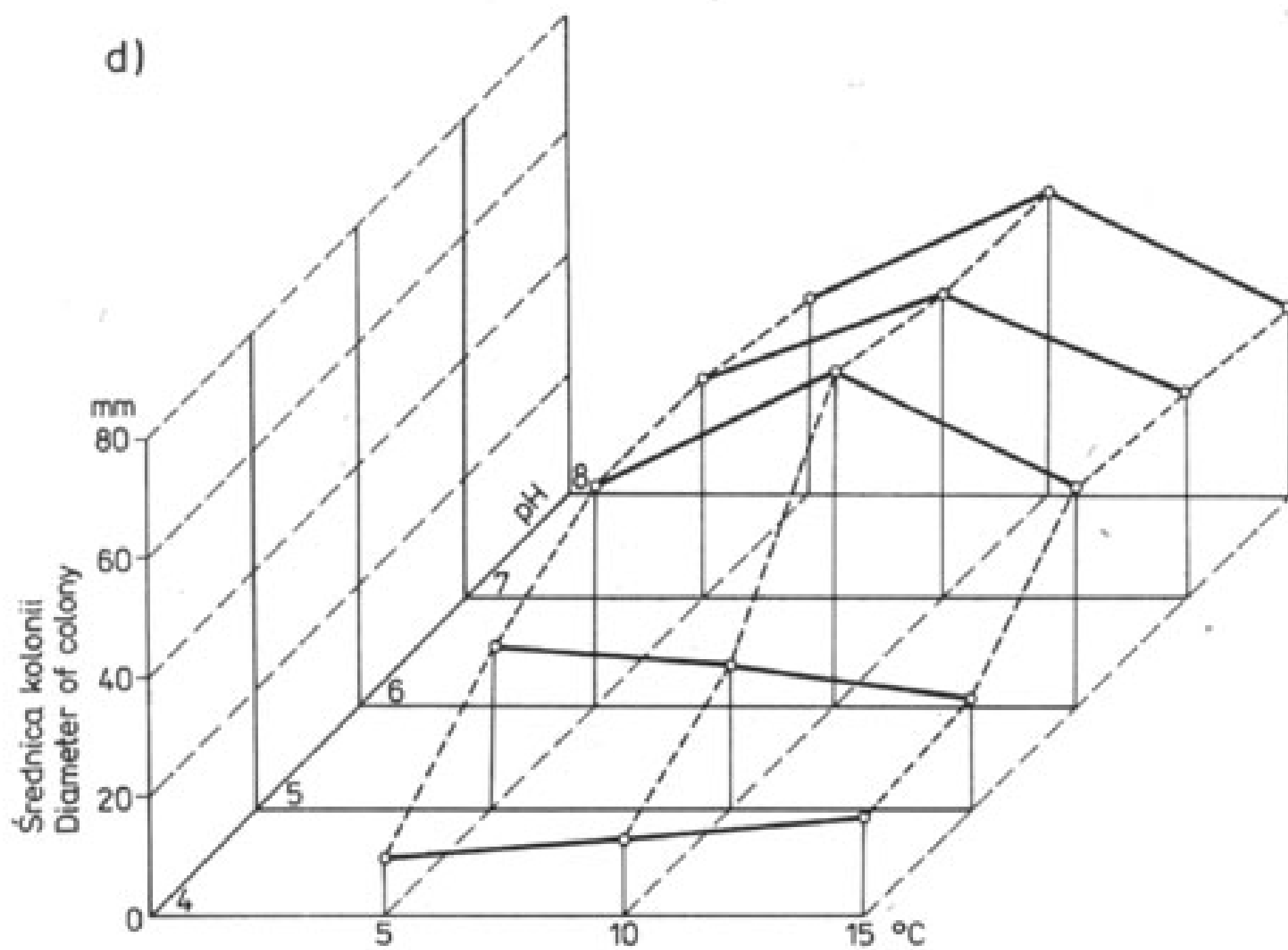
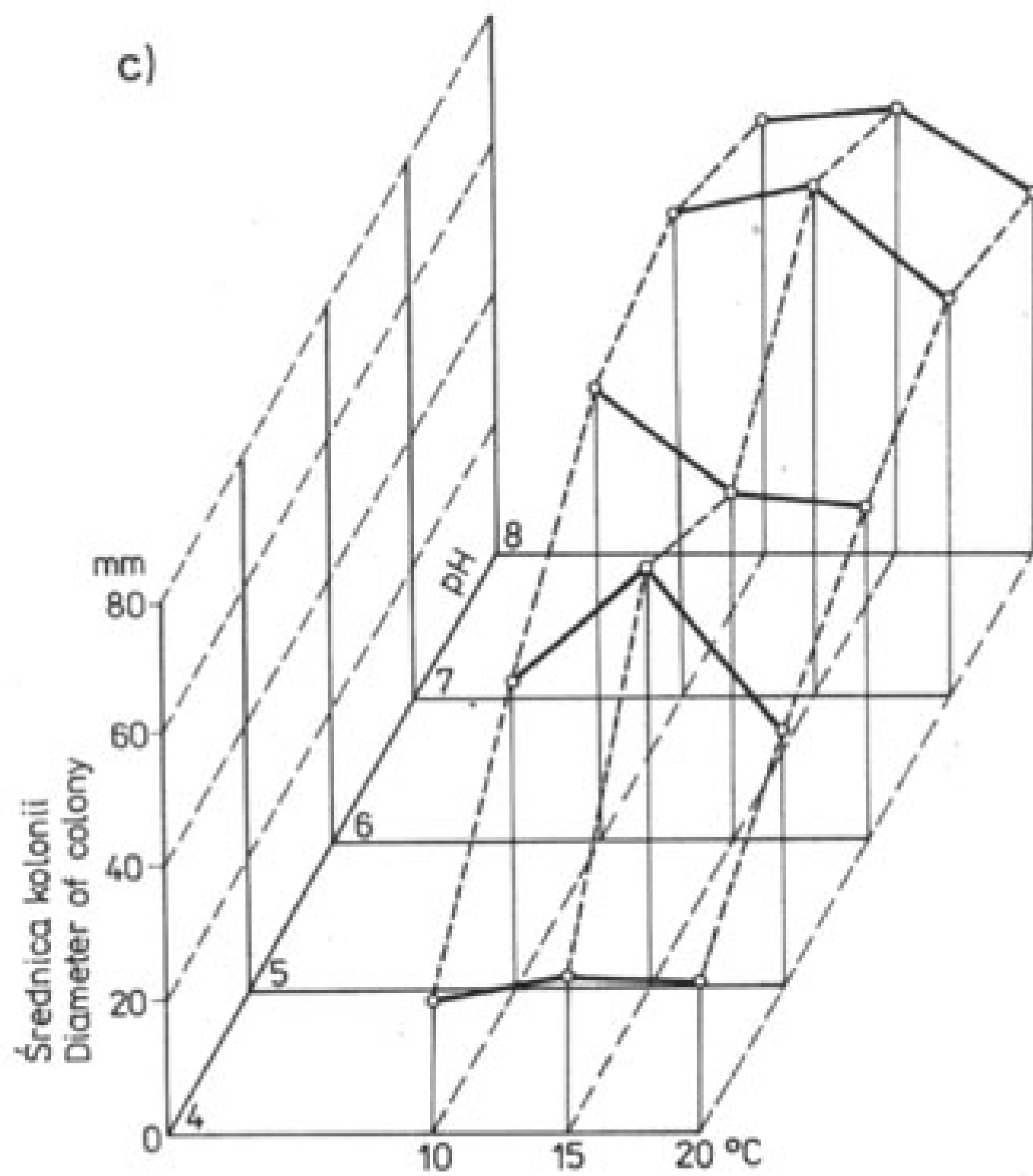
Otrzymane wyniki wskazują, że podłożami najmniej odpowiednimi dla wszystkich badanych izolatów okazały się liście *Populus tremula*, *Quercus robur*, częściowo *Acer negundo*, zaś najbardziej odpowiednimi rośliny jednoliścienne oraz *Aegopodium podagraria*, *Consolida regalis*, *Robinia pseudacacia*, *Salix* sp. i *Urtica dioica*.

Aktywność enzymatyczna. Ocena aktywności pektolitycznej dokonana na podstawie porównania wielkości i intensywności zabarwienia czerwonej strefy uwarunkowanej zmianą wartości pH pożywki, wykazała istotne różnice między badanymi grzybami. Po 2 tygodniach obserwowano umiarkowanie czerwoną strefę, o średnicy dochodzącej do 11 mm u *T. ishikariensis* i 10 mm u *T. incarnata*. Słabo czerwona strefa, o najmniejszej średnicy wynoszącej 6 mm, powstała w kulturach *T. phacorrhiza*.

Na podstawie otrzymanych wyników można sądzić, że spośród badanych



Ryc. 2. Wpływ temperatury i pH pożywki na wzrost grzybów (kultury 14-dniowe)
The effect of temperature and different pH values in medium on fungal growth (14-days culture estimation)



Ryc. 2 – c.d.

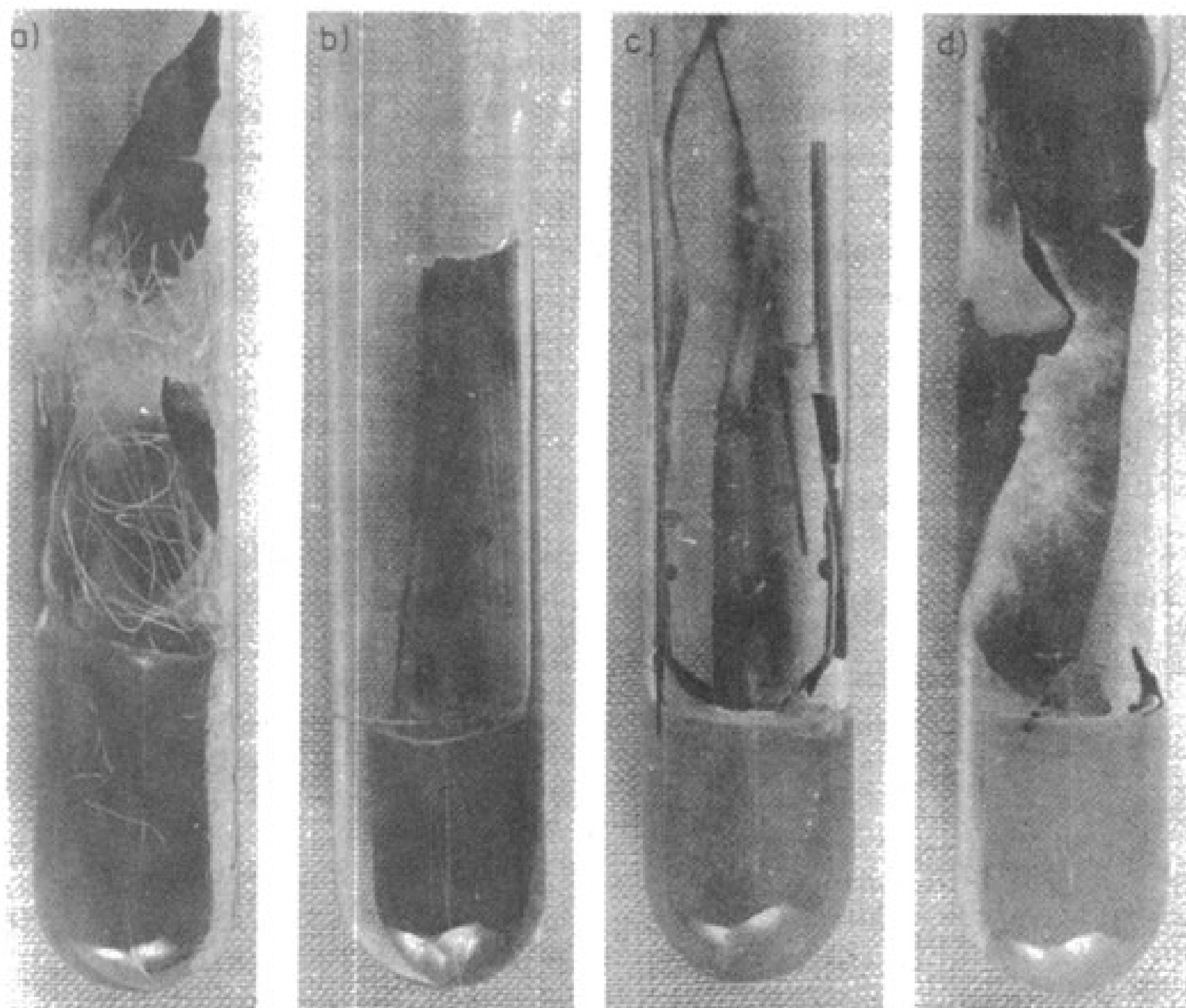
a – *T. incarnata*; b – *T. ishikariensis*; c – *T. phacorrhiza*; d – *T. sclerotioides*;

Tabela 1 - Table 1

Wzrost grzybów z rodzaju *Typhula* na liściach i fragmentach łodyg wybranych gatunków roślin naczyniowych
 The growth of fungi from the genus *Typhula* on leaves and stem fragments of the selected vascular plants

Gatunek Species	<i>Acer negundo</i> L.	<i>Agropodium podagraria</i> L.	<i>Betula terrestris</i> Ehrh.	<i>Consolida regalis</i> S. P. Grey	<i>Eriogon canadensis</i> L.	<i>Holcus</i> sp.	<i>Iris</i> sp.	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	<i>Poa annua</i> L.	<i>Populus tremula</i> L.	<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	<i>Salix</i> sp.	<i>Sesale coryle</i> L.	<i>Symphoricarpos albus</i> (L.) Blaze	<i>Quercus robur</i> L.	<i>Fritrea dioica</i> L.
I	1	2s	1	2s	2s	3s	3s	1	3s		2s	3s	3s		1	3s
II		1s	2s	1s	1s	1s	2s	2s	2s		2s	2s	2s	1s	1	1
III	2	3s	2	2s	2s	2s	2s	2	3s	2s	3	1	2s	3s	2s	3
IV	1	2s	2	2s	2s	2s	3s	1	2s	1	2s	3s	2s	2s	2s	3s
V	2s	3s	1	2s	3s	3s	3s	1	3s	1	3s	3s	3s	1	3s	2s

I - *T. lacunosa*, II - *T. tabularis*, III - *T. placuensis*, IV - *T. placuensis*, V - *Typhula* sp., 1 - intensywny (intense), 2 - wysubły (subtle), 3 - niemały (slight), s - skreśły (skretata)



Ryc. 3. Wzrost grzybów na pożywkach naturalnych
The growth of fungi on natural medium

a – *T. phacorrhiza* na (on) *Aegopodium podagraria*; b – *Typhula* sp. na (on) *Iris* sp.; c – *T. incarnata* na (on) – *Poa annua*;
d – *T. sclerotioides* na (on) *Salix* sp.

gatunków najwyższą aktywność pektolityczną wykazały: *T. incarnata* i *T. ishikariensis*, średnią – *Typhula* sp. i *T. sclerotioides*, najniższą – *T. phacorrhiza* (tab. 2).

Grzyby inokulowane na agarze wodnym z dodatkiem tłuszczu rosły dobrze i rozkładały tłuszcze już po 4 dniach hodowli. We wszystkich przypadkach obserwowano zmianę barwy podłoża z niebieskiej na żółtą pod wpływem wolnych kwasów tłuszczowych. Różnice wystąpiły w intensywności zabarwienia i szerokości barwnej strefy. Ocenę badanej aktywności przeprowadzono stosując takie same kryteria jak przy enzymach pektolitycznych.

Największą zdolność do rozkładu tłuszczów wykazała *Typhula* sp. i *T. sclerotioides*, średnią – *T. phacorrhiza* i *T. incarnata*. Najslabiej działała *T. ishikariensis* (tab. 3).

T a b e l a 2 – T a b l e 2

Aktywność pektolityczna grzybów z rodzaju *Typhula*
 Pectolytic activity of fungi of the genus *Typhula*

Gatunek Species	Średnica zabarwionej strefy w mm Diameter of coloured area in mm	Intensywność zabarwienia Intensity of colouring
<i>T. incarnata</i>	10,0	umiarkowanie czerwone moderate red
<i>T. ishikariensis</i>	11,0	“ “
<i>T. phacorrhiza</i>	6,0	nieznacznie czerwone slight red
<i>T. sclerotioides</i>	7,2	umiarkowanie czerwone moderate red
<i>Typhula</i> sp.	9,0	“ “

T a b e l a 3 – T a b l e 3

Aktywność lipolityczna grzybów z rodzaju *Typhula*
 Lipolytic activity of fungi of the genus *Typhula*

Gatunek Species	Średnica zabarwionej strefy w mm Diameter of coloured area in mm	Intensywność zabarwienia Intensity of colouring
<i>T. incarnata</i>	22,0	nieznacznie żółte slight yellow
<i>T. ishikariensis</i>	9,0	“ “
<i>T. phacorrhiza</i>	25,0	umiarkowanie żółte moderately yellow
<i>T. sclerotioides</i>	34,0	intensywnie żółte intensely yellow
<i>Typhula</i> sp.	46,0	“ “

Wszystkie badane gatunki wykazały właściwości celulolityczne. Największą aktywność obserwowano u *T. ishihariensis*, *T. incarnata* i *Typhula* sp. Pozostałe gatunki można traktować jako średnio aktywne.

Ubytek suchej masy pasków bibuły po upływie 3 tygodni kształtował się następująco:

- | | |
|-----------------------------|---------|
| 1. Kontrola | – 1,1% |
| 2. <i>T. ishihariensis</i> | – 17,2% |
| 3. <i>T. incarnata</i> | – 12,8% |
| 4. <i>Typhula</i> sp. | – 12,4% |
| 5. <i>T. sclerotiooides</i> | – 6,5% |
| 6. <i>T. phacorrhiza</i> | – 3,1% |

Zastosowana metoda pozwala zorientować się jaka ilość celulozy została zużyta, ale nie daje rozeznania jaką ilość grzyb wykorzystuje do budowy swej plechy.

Za najbardziej aktywne pektolitycznie uznano te gatunki, u których największa ilość podłoża zmieniła konsystencję. Średnice upłynnionej strefy u poszczególnych gatunków przedstawiały się następująco:

- | | |
|-----------------------------|---------|
| 1. <i>T. incarnata</i> | – 52 mm |
| 2. <i>T. phacorrhiza</i> | – 47 mm |
| 3. <i>T. ishihariensis</i> | – 37 mm |
| 4. <i>Typhula</i> sp. | – 34 mm |
| 5. <i>T. sclerotiooides</i> | – 26 mm |

Z zestawienia wynika, że największą aktywnością pektolityczną odznaczają się *T. incarnata* i *T. phacorrhiza*, najniższą – *T. sclerotiooides*. Średnią zdolność do rozkładu białka wykazuje *T. ishihariensis* i *Typhula* sp.

Ocena patogeniczności. Na podstawie doświadczeń infekcyjnych stwierdzono

Tabela 4 – Table 4

Porażenie koniczyny (K), rzepaku (R) i żyta (Z) przez grzyby z rodzaju *Typhula*
Infection of clover (K), rape (R) and rye (Z) by fungi of the genus *Typhula*

Gatunek Species	Rośliny w % – Plants in %								
	chore – sick						zdrowe – unaffected		
	martwe – dead			porażone częściowo partially infected					
	K	R	Z	K	R	Z	K	R	Z
<i>T. incarnata</i>	10	5	18	10	5	25	80	90	57
<i>T. ishihariensis</i>	100	98	100	0	2	0	0	0	0
<i>T. phacorrhiza</i>	0	0	0	0	0	0	100	100	100
<i>T. sclerotiooides</i>	0	0	0	0	0	0	100	100	100
<i>Typhula</i> sp.	4	0	5	20	15	20	76	75	75

różny stopień patogeniczności omawianych gatunków w stosunku do koniczyny, rzepaku ozimego i żyta (tab. 4).

Najwyższą patogeniczność wykazała *T. ishikariensis*. Już po czterech tygodniach masowo żółkły i więdły wszystkie rośliny. Po upływie siedmiu tygodni zaczął zamierać rzepak, a koniczyna i żyto zostały całkowicie zniszczone przez grzyb. Ostatecznie przy życiu pozostało kilka pożółkłych i wątłych roślin rzepaku, co stanowiło zaledwie 2%.

W przypadku *T. ishikariensis* choroba postępowała najszybciej, a okres inkubacji był najkrótszy. Grzybnia wytwarzająca liczne skleroty, o czarnym zabarwieniu, rozwijała się zarówno w glebie jak i na chorych roślinach.

Silne porażenie wywołała *Typhula* sp. Osiągnęło ono w przypadku rzepaku i żyta 25%, a koniczyny 24%.

Pierwsze symptomy choroby występowały zawsze w postaci brązowych plam na liściach zewnętrznych lub w postaci żółknięcia całych blaszek liściowych. Pojawiały się dopiero po 7 tygodniach inkubacji. Grzybnia *Typhula* sp. początkowo intensywnie rozrastała się w glebie, tworząc liczne skleroty, później stopniowo opanowywała rośliny.

T. incarnata powodowała nieco mniejsze szkody. Najwięcej porażonych roślin obserwowano w przypadku żyta — 43%, najmniej u rzepaku — 10%. Porażone rośliny początkowo więdły, zewnętrzne liście żółkły i zamierały. Najwcześniej, bo po upływie 4 tygodni, objawy pojawiały się na życie. Grzybnia rozwijała się zarówno na powierzchni gleby oraz pod pochwami liściowymi. Liczne skleroty pokrywały glebę. Przetrwalniki tworzyły się również na chorych roślinach: u żyta w pochwach liściowych, u rzepaku i koniczyny na łodydze pod liśćmi zewnętrznymi.

Nie zauważono żadnych symptomów chorobowych w przypadku *T. phacorrhiza* i *T. sclerotioides*. Grzybnia tych gatunków rozwijała się intensywnie tylko w glebie dookoła roślin. Powstawały liczne skleroty, a u *T. phacorrhiza* nawet owocniki.

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania laboratoryjne potwierdziły, że najistotniejszą rolę w rozwoju grzybów z rodzaju *Typhula* odgrywa temperatura, mniejszą — pH i składniki pokarmowe.

Najszybszy rozwój grzybni i wzmożone kiełkowanie sklerot obserwowano jesienią od października do połowy listopada. Obserwacje te są zgodne z badaniami wielu autorów.

Jako początek kiełkowania sklerot Lehmann (1965a) podaje trzecią dekadę października, a najwcześniejszy termin w warunkach niemieckich — 18 października, Škipsna (1958) dla ŁSSR — środek października, Potatowa (1960a) dla okręgu Leningradu — wrzesień i październik.

Różnice te najprawdopodobniej spowodowane są różnymi warunkami termicznymi w wymienionych obszarach. Przypuszczalnie spadek temperatury w jesieni stanowi koniec fazy nieaktywnej i jest bodźcem do kiełkowania sklerot oraz intensywnego wzrostu grzybni.

Wśród badanych gatunków zauważyć można różny stopień tolerancji na zmiany temperatury i kwasowości podłoża oraz różną reakcję na zmianę składu podłoża.

W warunkach laboratoryjnych optymalny rozwój wszystkie grzyby osiągnęły na agarze glukozowo-ziemniaczanym. Na pożywce Czapek-Doxa rosły słabo. Wyjątek stanowi *T. ishikariensis*, która – jako jedyny gatunek spośród badanych – wytwarza skleroty na obydwu podłożach, a cechy makroskopowe kolonii ma identyczne. W związku z tym, że agar glukozowo-ziemniaczany okazał się pożywką bardziej odpowiednią zdecydowano się na analizę i porównanie rozwoju na tym właśnie podłożu.

Najsłabszy wzrost na podłożu sztucznym wykazuje *T. phacorrhiza*. U tego gatunku obserwowano również największe zmiany morfologiczne kolonii będące konsekwencją zmian temperatury i pH. Najmniej wrażliwa na zmianę temperatury i kwasowości okazała się *T. sclerotioides*. *T. ishikariensis*, *T. incarnata* i *Typhula* sp. wyraźniej reagowały na zmianę temperatury niż na zmianę pH.

Gatunkiem wybitnie preferującym niską temperaturę okazała się *T. ishikariensis*. Jej maksymalny rozwój odbywa się przy temp. 5°C. Bruhl, Machtes i Kiyomoto (1975) wyrażają pogląd, że *T. ishikariensis* jest szeroko rozprzestrzenionym gatunkiem podbiegunowym i najlepiej rozwija się w temp. 0,5 - 10°C.

Bruhl i Cunfer (1975) porównując szybkość wzrostu *T. idahoensis*, *T. ishikariensis* i *T. incarnata* w temperaturze od 0,5 do 15°C doszli do wniosku, że w hodowli in vitro najbardziej charakterystyczne cechy wymienionych gatunków występują w temp. 10°C. Jednocześnie wykazali, że optimum termiczne dla rozwoju *T. ishikariensis* wynosi 5°C, *T. incarnata* – 10°C, *T. idahoensis* – 15°C.

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy potwierdzają dane Bruhla i Cunfera (1975), natomiast nie są zgodne z badaniami Lehmana (1960a) prowadzonymi nad *T. incarnata*. Autor ten podaje, że największy przyrost grzybni odbywa się w temp. 7°C przy pH 6. Zaliczył też *T. incarnata* do grupy grzybów litrofilnych. Jako minimum kwasowości do wzrostu Lehman podaje pH 4,88, podczas gdy Volk (1937) pH 3,5. Tasugi i Tomiyama (cyt. Lehman 1965a) uważają, że *T. incarnata* osiąga optimum wzrostu przy pH 6,7 - 7,7 bądź przy pH 5,4 - 6,9.

W przeprowadzonych badaniach własnych *T. incarnata* najlepiej rozwijała się przy pH 6. Przy pH 4 wzrost jeszcze odbywał się.

Z przytoczonych przykładów należałoby wnioskować, że optymalny stopień kwasowości podłoża nie jest jednoznacznie określony. Różnice te mogą wynikać z geograficznie różnego materiału badawczego lub też mogą wskazywać na duży

zakres tolerancji badanych grzybów w stosunku do kwasowości podłoża.

Dane uzyskane z badań własnych i literatury pozwalają sądzić, że temperatura należy do podstawowych czynników decydujących o przebiegu rozwoju badanych grzybów. Jest również czynnikiem różnicującym poszczególne gatunki. Wpływa także na najbardziej charakterystyczne cechy tych grzybów. Dlatego między innymi oznaczanie ich i porównywanie *in vitro* prowadzono biorąc pod uwagę temperaturę optymalną. W tych warunkach kolonie są zawsze regularne, charakterystycznie zabarwione, z grzybnią puszystą i obfitą oraz właściwym sobie układem sklerot. Wraz ze wzrostem temperatury kolonie tracą regularność, puszystość i połysk. Z mikroskopowych badań wynika, że najgrubsze strzępki z reguły tworzą się w temperaturze optymalnej.

Niemniej jednak istotne jest znaczenie kwasowości. Duża odporność grzybów z rodzaju *Typhula* na zmiany pH może być wynikiem ich przystosowania się do zmian warunków siedliskowych w ciągu całego roku. Opisywane grzyby korzystają z rozkładających się i gnijących substancji roślinnych, niektóre z substancji żywych. Zakres pH w obydwu przypadkach jest różny. Mimo to ten sam gatunek może rozwijać się na obydwu podłożach. W pierwszym przypadku będzie saprofitem, w drugim pasożytem. Gatunkiem zachowującym się w ten sposób jest *Typhula* sp.

Badane grzyby dobrze rosły i rozwijały się na podłożach naturalnych, którymi były sterylizowane fragmenty roślin naczyniowych.

Opierając się na otrzymanych wynikach można by sądzić, że grzyby te lepiej rozwijają się na roślinach jedno- niż dwuliściennych. Na uwagę zasługuje fakt, że *T. sclerotioides* w warunkach laboratoryjnych wykazuje najslabszy wzrost na podłożach, na których została znaleziona. Podobnie *T. ishikariensis*, znajdowana często na trawach (B r u e h l, M a c h t e s i K i y o m o t o 1975; Å r s v o l l i S m i t h 1978; P a r m a s t o 1965; P o t a t o s o v a 1960b), na *Poa annua* nie wykazywała żadnych oznak rozwoju.

Przypuszczać należy, że występuje tu swoiste zjawisko symbiozy, bez której rozwój grzybów jest niemożliwy. Dwukrotne jałowienie podłoży naturalnych doprowadziło do zniszczenia całej flory grzybowej i bakteryjnej, wśród której może znajdowały się organizmy symbiotyczne mające wpływ stymulujący. Przyczyny hamowania wzrostu można upatrywać również w braku pewnych związków, które ulegały rozkładowi podczas procesu sterylizacji lub w powstaniu nowych hamujących wzrost. Istnieje również możliwość, że związki potrzebne do życia nie mogą być w warunkach jałowych syntetyzowane.

Autorzy zajmujący się zagadnieniami współżycia w fyllosferze (K e r m e n 1968) zwracają uwagę na konieczność przeprowadzenia badań kompleksowych dla poszczególnych gatunków roślin. Tylko zbadanie całokształtu populacji mikroflory epifitycznej liści pozwoliłoby na ustalenie dla badanych grzybów warunków rozwoju najbardziej zbliżonych do naturalnych.

Bardzo prawdopodobne, że jedną z przyczyn hamowania wzrostu na *Acer*,

Quercus i *Populus* jest akumulacja garbników w liściach tych roślin. Garbniki, tak jak większość związków fenolowych, traktowane są jako czynniki grzybobójcze (P u k a c k a 1975). Na substancje te zwrócono uwagę przy badaniach mechanizmów obronnych roślin w walce z pasożytami, ponieważ charakteryzują się dużą toksycznością dla mikroorganizmów w stosunkowo niskich stężeniach. Produkty utleniania fenoli są bardziej toksyczne niż formy wyjściowe (F a r k a s, K i r a l y 1962).

Istnieje duża rozbieżność wyników prac doświadczalnych związanych ze znaczeniem substancji garbnikowych w zjawiskach immunologicznych. W tym samym czasie gdy jedni autorzy stwierdzają hamujący wpływ garbników na rozwój grzybów fitopatogennych, inni uważają, że związki te wywierają wpływ stymulujący. Wszyscy są zgodni, że poziom garbników w porażonych tkankach wzrasta, a większość uważa je za związki chemiczne najbardziej aktywne w walce rośliny z czynnikiem chorobotwórczym (R u b i n, A r c i c h o w s k a 1971).

Wyznacznikiem ekologicznej przynależności i powiązań symbiotycznych każdej grupy drobnoustrojów jest aktywność enzymatyczna. To przystosowanie znalazło swój wyraz między innymi we własnościach enzymatycznych, zwłaszcza w zakresie syntezy enzymów biorących udział w rozkładzie bardziej złożonych związków typu celulozy czy ligniny. Współdziałanie enzymów pektolitycznych i celulolitycznych jest dziś traktowane jako rzecz oczywista przy patogenezie wielu chorób roślinnych pochodzenia grzybowego. Uważa się, że istnieje prosta zależność między zdolnością rozkładu polisacharydów, a wirulencją mikroorganizmów (A l b e r s c h e i m 1969).

Mikroorganizmy patogeniczne, przenikające tkanki roślinne, muszą odznaczać się zdolnością do destrukcji komponentów ścian komórkowych.

Celulazy i pektynazy są enzymami zewnątrzkomórkowymi, produkowanymi po zetknięciu się z substratem (V e r b i n a, C y c u r a 1969). Aktywność tych hydrolaz może być hamowana w obecności cukrów prostych, w szczególności produktów rozpadu ścian komórkowych gospodarza, a także w obecności fenoli, o których wspomniano już wcześniej. Wykazano, że związki fenolowe, a zwłaszcza produkty ich utleniania powodują zmniejszenie aktywności celulazy i poligalakturonazy (L y r 1965; P a t i l, D i m o n d 1968) prawdopodobnie wskutek utleniania grup –SH tych enzymów.

Przez wydzielanie enzymów hydrolitycznych oraz przez redukcję substancji pektynowej i celulozy możliwe jest wnikanie czynnika chorobotwórczego do tkanki roślinnej. Do dyspozycji patogena pozostają produkty rozpadu służące mu jako pożywka (H ä n s s l e r 1973). Według Hänslera zdolności enzymatyczne niektórych grzybów, szczególnie pasożytniczych, ujawniają się dopiero w momencie zetknięcia się z rośliną – żywicielem.

Przeprowadzone badania wykazały, że w przypadku pasożytniczych gatunków z rodzaju *Typhula* jest inaczej. Wszystkie wyizolowane grzyby *in vitro*

zdolne były do rozkładu pektyny, celulozy oraz białka i lipidów. Grzyby te występują na opadłych liściach lub rozkładającym się materiale roślinnym. Są to siedliska, w których zachodzą intensywne procesy enzymatyczne, szczególnie procesy rozkładu, w których grzyby te biorą najprawdopodobniej udział czynny.

Gatunki saprofityczne, *T. phacorrhiza* i *T. sclerotioides* wykazywały wysoką aktywność lipolityczną i proteolityczną. Duża zdolność do rozkładu białka i lipidów pochodzących z wydzielin liści bądź z obumarłych szczątków roślinnych ułatwia rozwój saprofitów. Mniejsze znaczenie dla ich bytowania mają enzymy rozkładające pektyny i celulozę. Według *Dunlevaya* (cyt. *Chruścika* 1974) enzymy te uczynniają się w sytuacji, gdy liść ulega osłabieniu w warunkach niekorzystnych albo w okresie starzenia się, i wówczas pewne saprofity mogą stawać się okolicznościowymi pasożytami.

Natomiast *Pavlenko* i *Lizak* (1978) oraz *Fischer*, *Sharma* i *Webster* (1977) stwierdzili, że celulolityczna aktywność zależy od warunków występowania. Najwyższą aktywnością charakteryzują się gatunki biorące czynny udział w rozkładzie materiału roślinnego. *Pavlenko* i *Lizak* (1978) wykazali, że aż 92,8% przedstawicieli z rodzaju *Cladosporium* i *Alternaria* jest w stanie syntetyzować pełnowartościowy kompleks celulaz. Podobnie silne własności celulolityczne wykazują grzyby wodne (*Fischer*, *Sharma* i *Webster* 1977) rozkładające materiał roślinny w wodzie, czy grzyby mikoryzowe biorące czynny udział w rozkładzie ściółki (*Lyr* 1965; *Pachlewski* 1964; *Pachlewski*, *Chruścika* 1979).

Gatunki pasożytnicze charakteryzowała wysoka aktywność celulolityczna i pektolityczna.

Ta wysoka aktywność stwierdzona u *T. incarnata*, *T. ishikariensis* i *Typhula* sp. tłumaczy mechanizm intracelularnej infekcji i zdolności tych grzybów do rozkładu pektyny oraz celulozy, będących komponentami ścian komórkowych. Fakt ten może być wynikiem zdolności tych gatunków do porażania roślin naczyniowych.

Najbardziej wirulentna okazała się *T. ishikariensis*, która doprowadziła do zabicia prawie wszystkich roślin. Słabszą patogeniczność wykazały *T. incarnata* i *Typhula* sp.

Na podstawie otrzymanych wyników można sądzić, że *Typhula* sp. zdolna jest wyrządzać większe szkody niż *T. incarnata*. Wprawdzie po upływie 60 dni liczba martwych roślin w przypadku *T. incarnata* była większa niż przy *Typhula* sp., jednak ogólnie procent porażonych roślin był niższy. Może to wynikać z krótszego okresu inkubacji i szybszego rozwoju choroby u roślin zakażonych przez *T. incarnata*.

T. incarnata, *T. ishikariensis* i *Typhula* sp. były zdolne do porażania koniczyny, rzepaku ozimego i żyta, jednak zaznaczyły się pewne różnice w stopniu patogeniczności w stosunku do tych roślin. *T. ishikariensis* wykazała taki sam

rozwój na życie jak i na koniczynie. Nieco słabiej porażała rzepak. *T. incarnata* najsilniej atakowała żyto, najslabiej rzepak. Natomiast *Typhula* sp. względem wszystkich badanych roślin wykazała zbliżony stopień patogeniczności. Stosunkowo najslabiej porażała rzepak.

B r u e h l i C u n f e r (1975) stwierdzili, że rozwój i formowanie sklerocjów *T. incarnata* i *T. ishkariensis* są bardziej intensywne na zbożach ozimych i zielonych trawach niż na słomie i trawach obumarłych.

W warunkach amerykańskich *T. incarnata* najczęściej poraża ozime zboża i trawy, podczas gdy *T. ishkariensis* atakuje pszenicę, warzywa i niektóre chwasty. Ten sam gatunek w Japonii (B r u e h l, C u n f e r 1975) lepiej rozwija się na rzepaku niż na pszenicy, a w Finlandii jest bardzo pospolity na koniczynie (Y l i m ä k i 1969. Występuje nawet częściej niż *T. trifolii*, która z koniczyną jest ściśle związana.

P i e l k a (1970) badając pleśń śniegową żyta znalazła *T. incarnata* wśród grzybów towarzyszących gatunkowi *Fusarium nivale* (Fr.) Ces., który jest główną przyczyną tej choroby. Sądzi on, że w naszych warunkach *T. incarnata* nie odgrywa większej roli jako patogen zbóż.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy oraz dane z literatury wydają się temu przeczyć. Obserwacje rozwoju choroby prowadzone podczas prób infekcyjnych pozwalają przypuszczać, że badane grzyby mogą atakować wszystkie organy roślinne, a najczęściej liście zewnętrzne i hypokotyl. Obserwacje te zgodne są z wynikami F r a u e n s t e i n i L e h m a n n a (1974), L e h m a n n a (1965b) oraz B r u e h l a i C u n f e r a (1975).

Czynniki meteorologiczne, takie jak temperatura i pokrywa śnieżna, oraz ich periodyczne zmiany mają decydujący wpływ na rozwój badanych grzybów.

Młode rośliny znajdujące się pod pokrywą śnieżną, gdzie temperatura jest często powyżej 0°C, oddychają dość intensywnie zużywając nagromadzone w liściach zapasy cukrów. Powoduje to ich osłabienie i zwiększa podatność na zakażenia przez grzyby będące w glebie lub na roślinach uprzednio porażonych. Osłabia rośliny także brak dostatecznej ilości tlenu. Może dojść nawet do oddychania beztlenowego, a wydzielające się przy tym produkty są dla roślin zabójcze. Sądzić można również, że im dłużej śnieg będzie leżał tym większa będzie możliwość wystąpienia chorób.

C o r n e r (1950) podkreśla, że choroby wywołane przez gatunki z rodzaju *Typhula* są tym bardziej niebezpieczne, że grzyby te najlepiej rosną w niskich temperaturach, podczas gdy roślina-żywiciel jest osłabiona. Zboża ozime bywają atakowane jesienią, a rozwój choroby postępuje w trakcie zimy, pod śniegiem.

Biorąc pod uwagę wymagania klimatyczne i pokarmowe badanych grzybów stwierdzić można, że w Polsce północno-wschodniej znajdują one doskonałe warunki bytowania.

WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań autorka doszła do następujących wniosków:

1. Najistotniejszą rolę w rozwoju grzybów z rodzaju *Typhula* odgrywa temperatura, mniejszą pH i rodzaj podłoża.

2. Wszystkie badane grzyby znajdują optymalne warunki do rozwoju na agarze glukozowo-ziemniaczanym. Rosną w zakresie pH 4-8 i temp. od 5 do 20°C, jednak zaznaczają się różnice w optimum termicznym i kwasowości.

3. Na fragmentach wybranych roślin naczyniowych, stanowiących podłoże naturalne, najlepiej rosną *T. incarnata*, *T. phacorrhiza* i *Typhula* sp., nieco słabiej *T. sclerotioides*, najslabiej *T. ishikariensis*.

4. *T. incarnata*, *T. ishikariensis* i *Typhula* sp. wykazują własności pasożytnicze w stosunku do koniczyny, rzepaku ozimego i żyta, przy czym najwyższą patogenicznością charakteryzuje się *T. ishikariensis*. *T. phacorrhiza* i *T. sclerotioides* należy uznać za saprofity.

5. Wszystkie badane grzyby *in vitro* zdolne są do rozkładu pektyny, celulozy oraz białka i lipidów.

6. Aktywność enzymatyczna związana jest ze sposobem życia poszczególnych gatunków. Najwyższą aktywnością pektolityczną i celulolityczną odznaczają się grzyby pasożytnicze: *T. incarnata*, *T. ishikariensis* i *Typhula* sp. Najbardziej intensywnym rozkładem tłuszczu charakteryzuje się *T. sclerotioides* i *Typhula* sp., natomiast białka – *T. incarnata* i *T. phacorrhiza*.

LITERATURA

- Albersheim P., Jones T. M., English P. D., 1969, Biochemistry of cell walls in the disease processes. *Ann. Rev. Phytophath.* 7: 171.
- Årsvoll K., Smith J. D., 1978, *Typhula ishikariensis* and its varieties, var. *idahoensis* comb. nov. and var. *canadensis* var. nov. *Can. J. Bot.* 56 (3): 348 - 364.
- Berthier J., 1976, Monographie des *Typhula* Fr., *Pistillaria* Fr. et genres voisins. *Bull. Soc. Linn. Lyon*, Spec. No.: 1 - 213.
- Bruehl G. W., Cunfer B. M., 1975, *Typhula* species pathogenic to wheat in the Pacific Northwest. *Phytopath.* 65: 755 - 760.
- Bruehl W., Machtes R., Kiyomoto R., 1975, Taxonomic relationships among *Typhula* species as revealed by mating experiments. *Phytophath.* 65: 1108 - 1114.
- Chruściak E., 1974, Mikroflora fyllofery. *Acta Mycol.* 10 (1): 173 - 180.
- Cormack M. W., Lebeau J. B., 1959, Snow mold infection of alfalfa, grasses and winter wheat by several fungi under artificial conditions. *Can. J. Bot.* 37: 685 - 693.
- Corner E. J. H., 1950, A monograph of *Clavaria* and allied genera. *Ann. Bot. Mem.* 1: 1 - 740.
- Cunfer B. M., 1974, Sexual incompatibility and aspects of the mono- and dikaryotic phases of *Typhula idahoensis*. *Phytopath.* 64: 125 - 127.
- Cunfer B. M., Bruehl G. W., 1973, Role of basidiospores as propagules and observations on sporophores of *Typhula idahoensis*. *Phytopath.* 63: 115 - 120.
- Farkas G. L., Kiraly Z., 1962, Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. *Phytopath. Z* 44: 105 - 159.

- Fischer P. J., Sharma P. D., Webster J., 1977, Cellulotic ability of aero-aquatic *Hyphomycetes*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 69 (3): 495-496.
- Frauenstein K., Lehmann H., 1974, Auswinterung des Getreides durch Pilzliche Krankheitserreger. Phytopath. Pflanzensch. 2: 138-143.
- Hänsler G., 1973, Zur Bildung pektolytischer und celulolytischer Enzyme durch *Cercospora herpotrichoides* Fron. Phytopath. 77: 1-19.
- Ignatović G. M., 1951, *Typhula trifolii* Rostrup parazit krasnovo klevera. Dokl. VAS-Ch NIL 4: 37-42.
- Jamalainen E. A., 1965, Control of low-temperature parasitic fungi in winter cereals by fungicidal treatment of stands. Ann. Agric. Fenn., ser. Phytopath. 7: 1-54.
- Jańczak C., 1978, Gatunki *Typhula* jako mało znane w Polsce patogeny zbóż ozimych. Ochr. Rośl. 9: 4-6.
- Kermen J., 1968, Mikoflora fytosfery. Post. Mikrobiol. 7 (1): 103-116.
- Koczowska I., 1977, Badania nad otrzymaniem materiałów wyjściowych żyta ozimego do hodowli odmian plennych, odpornych na wyleganie i na pleśń śniegową. Zesz. nauk. ART Olszt. 19: 49-74.
- Lehmann H., 1965a, Untersuchungen über die *Typhula*-Fäule des Getraides. Phytopath. Z. 54: 209-239; 1965b, ditto, ibid.: 255-288.
- Lyr H., 1965, On the toxicity of oxidized polyphenols. Phytopath. Z. 52: 229-240.
- Pachlewski R., 1964, Z badań nad mikoryzą ektotroficzną drzew leśnych. Sylwan 108: 35-48.
- Pachlewski R., Chruściak Z., 1979, Aktywność enzymatyczna grzybów mikoryzowych. Acta Mycol. 15: 3-9.
- Parmasto E. H., 1965, Определитель rogatikovykh грибов СССР, Clavariaceae Nauka Moskva-Leningrad: 28-43.
- Patil S. S., Diamond A. E., 1968, Repression of polygalacturonase synthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by sugars and its effect on symptom reduction in infected tomato plants. Phytopath. 58: 676-682.
- Pavlenko V. E., Lizak J. V., 1978, Isledovanie cellulozoliticheskich svojstv temnocvetnykh mikrocyetov. Mikol. Fitopat. 12: 296-300.
- Pielka J., 1970, Pleśń śniegowa żyta *Fusarium nivale* (Fr.) Ces. Inne gatunki wywołujące chorobę. Ochr. Rośl. 12: 6-9.
- Potatosova E. G., 1960a, Uslovija prorastanija sklerocjev u gribov roda Tifula. Zaščita Rastenij 7: 40.
- Potatosova E. G., 1960b, Griby roda *Typhula* v SSSR. Bot. Žurnal 45 (4): 557-572.
- Pokacka S., 1975, Fizjologiczne i biochemiczne podstawy odporności mieszańców topoli na grzyb *Dutkichiya populea* Sacc. et Pr. Arboret. Kórnickie 20: 227-277.
- Rodina A., 1968, Mikrobiologiczne metody badania wód. PWRiL Warszawa: 199.
- Rubin B., Arcichowska J., 1971, Biochemia i fizjologia odporności roślin. PWRiL Warszawa: 148-159.
- Skipsna J., 1958, Petijumi par zemaju sniega pelejumu-tifulozi (*Typhula itoana* Im. *Typhula idahoensis* Remsb.) un tas apskarošanu zemas kviešu sejumos Latvijas PSR retumu joslas rajonos. Augene Raža. Rīga 7: 221-139.
- Verbina N. M., Cycura O. I., 1969, Pektolityčeskaja aktivnost nekatorych gribov. Mikrobiol. 38: 29.
- Volk A., 1937, Untersuchungen über *Typhula graminum* Karst. Z. Pflanzenkrankh. 47: 338-365.
- Ylimäki A., 1969, *Typhula* blight of Clover. Ann. Agric. Fan. Tikkurila, ser. Phytopath. 8: 30-37.
- Zvára J., Kuběš M., 1971, Příspěvek k poznání fyziologie palušky jetelové (*Typhula trifolii* Rostr.). Ochrana Rostlin 7(1): 31-38.

SUMMARY

The influence of temperature, pH and medium on the growth and development of mycelium, enzymatic activity and pathogenicity of five species of fungi: *Typhula incarnata* Lasch. ex Fr., *T. ishikariensis* Imai, *T. phacorrhiza* Fr., *T. sclerotioides* (Pers.) Fr., *Typhula* sp. was studied.

1. Temperature was found have the most essential factor for the development of fungi of the genus *Typhula*, whereas pH and the kind of medium are less important.

2. All studied fungi have optimum conditions of growth on potato dextrose agar. They grow in pH range from 4 to 8 and temperature from 5 to 20°C, however, there are differences in thermal optimum and pH.

3. *T. incarnata*, *T. phacorrhiza* and *Typhula* sp. develop best on the leaves and stem of selected vascular plants which make natural medium, *T. sclerotioides* develop slightly worse, and the growth of *T. ishikariensis* is relatively poor.

4. *T. incarnata*, *T. ishikariensis* and *Typhula* sp. show parasitic properties against clover, rape and rye. The highest degree of pathogenicity found for *T. ishikariensis*.

5. *T. phacorrhiza* and *T. sclerotioides* should be ranked among *Saprophytes*.

6. All studied fungi in vitro are capable of decomposing pectin, cellulose, protein and lipids.

7. Enzymatic activity is connected with the way of living of particular species and closely corresponds with pathogenic properties. Parasitic fungi *T. incarnata*, *T. ishikariensis* and *Typhula* sp. show the highest degree of pectolytic and cellulolytic activity. Fat is decomposed most intensively by *T. sclerotioides* and *Typhula* sp., while protein by *T. incarnata* and *T. phacorrhiza*.