

Niektóre właściwości biologiczne *Botrytis anthophila*

Certain biological properties of *Botrytis anthophila*

MARIA BUDERACKA-NIECHWIEJCZYK

Grzyb powodujący pleśń pylnikową koniczyny czerwonej, *Botrytis anthophila* Bondarcew 1912, zaobserwowany został po raz pierwszy w Rosji (Trusova 1912). Jaczewski (1913 i 1916) początkowo zaliczył go do rodzaju *Ovularia*; w późniejszych jego pracach omawiany gatunek występuje pod nazwą rodzajową *Oedocephalum* Jacz. Spotykane jeszcze w literaturze nazwy gatunkowe *Botrytis antherarum-trifolii* Schlecht (1921) oraz *Botrytis trifolii* Kingma (1927) są raczej synonimami, ponieważ grzyby te morfologicznie i biologicznie nie różnią się od gatunku opisanego przez Bondarcewa. Cechą charakterystyczną, na podstawie której Bondarcew zaliczył ten grzyb do rodzaju *Botrytis*, jest budowa trzonek konidialnych. U przedstawicieli rodzaju *Oedocephalum* na trzonekach konidialnych występuje rodzaj sterygm, których nie mają grzyby z rodzaju *Botrytis* a szczególnie *B. anthophila*. Poza tym grzyb ten jest wąsko wyspecjalizowany w porażeniu roślin żywicielskich, a ponadto cechuje się wyraźnym organotropizmem; cecha ta bardziej zbliża ten grzyb do pasożytów obligatorycznych, podczas gdy pokrewne gatunki, np. *Botrytis cinerea* Pers. są przeważnie pasożytami fakultatywnymi.

Hodowlę grzyba na sztucznym podłożu prowadzili różni autorzy: Bondarcew (1914), Jaczewski (1916), Siłow (1933), Noble (1946) oraz Ramazanova (1958). Ostatnia autorka badała ponadto kiełkowanie zarodników na sztucznym podłożu.

Z uwagi na zbyt skąpe dane w dostępnej literaturze na temat biologii patogena, podjęto badania laboratoryjne dotyczące warunków wzrostu grzybni na sztucznych podłożach, wpływu temperatury, podłoża i odczynu pożywki oraz wpływu temperatury i podłoża na kiełkowanie zarodników.

KIELKOWANIE ZARODNIKÓW

Metoda badań. Kielkowanie zarodników przeprowadzono w kropli wody destylowanej, 10 i 25% roztworze glukozy oraz 2,5% roztworze brzezki. Szkiełka z kroplami wkładano do wyłożonych wilgotną bibułą szalek Petriego i ustawiano w pomieszczeniach o odpowiedniej temperaturze. Kielkowanie zarodników prowadzono w temperaturze 10, 15, 20, 23, 25, 28 i 30°C. Procent kiełkujących zarodników obliczano po 6, 8, 12, 24 i 48 godzinach.

Wyniki badań. Z danych liczbowych wynika (tabela 1), że kielkowanie zarodników *Botrytis anthophila* może odbywać się niezależnie od podłoża w zakresie temperatury 15—28°C. Poza tymi granicami kielkowania nie obserwowano. Zauważono, że zarodniki przed kielkowaniem nieco pęcznią i nieznacznie wydłużają się. Kielkując wytwarzają przeważnie jedną, rzadziej dwie strzępki rostkowe. Wyrastają one zazwyczaj z końców zarodnika, rzadziej z boku, ale na ogół niedaleko końca. Temperatura 23—25°C okazała się optymalną dla kielkowania. W temperaturze tej zarodniki zaczynały kielkować najwcześniej, bo już po 6-ciu godzinach i w największej ilości, zwłaszcza w 25% roztworze glukozy (wykresy na ryc. 1 i 2); liczba kiełkujących zarodników obliczona po 48 godzinach wynosiła 86,7%. Najslabiej zarodniki kielkowały w temperaturze 15 i 28°C, chociaż w tej ostatniej liczba kiełkujących zarodników wynosiła 50%.

Jeżeli chodzi o wpływ różnego podłoża na kielkowanie zarodników, to najlepszym okazał się 25% roztwór glukozy, nieco słabsze kielkowanie obserwowano w 10% roztworze glukozy i w wodnym roztworze brzezki. Najslabiej proces kielkowania przebiegał w wodzie destylowanej. Wskazuje to, że zasobność podłoża w składniki pokarmowe sprzyja szybkości kielkowania i wzrostowi strzępek rostkowych.

HODOWLA NA POŻYWKACH

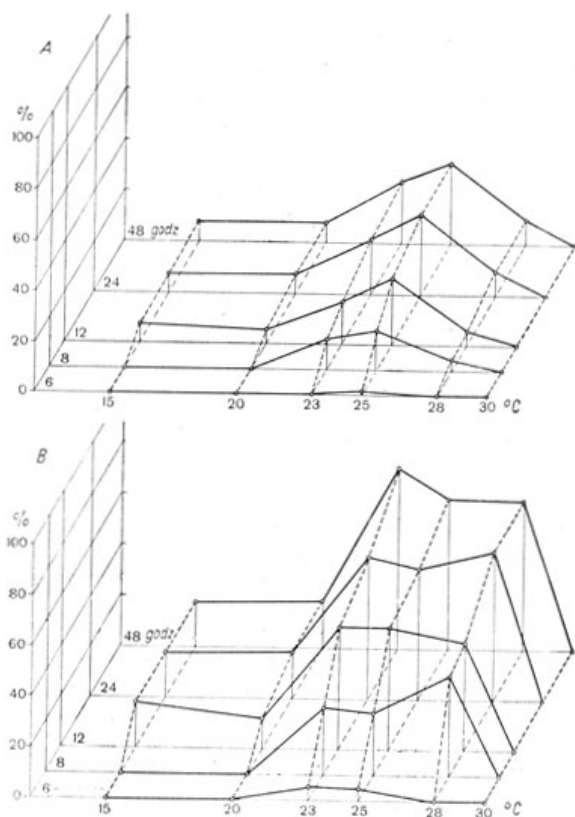
Metody badań. Kulturę grzyba otrzymano z porażonych nasion rozłożonych na pożywkę agarowo-brzezkową. Uzyskane z kultur zarodniki posłużyły następnie do otrzymania kultury jednozarodnikowej. Hodowlę przeprowadzono na pożywkach stałych w szalkach Petriego (o ϕ 10 cm) i na pożywkach płynnych w kolbach stożkowych (pojemność 100 ml). Do każdej szalki lub kolbki wlewano po 20 ml odpowiedniej pożywki. Pożywki stałe sterylizowano w autoklawie przez 20 minut pod ciśnieniem 1,5 atm, natomiast płynne w aparacie Kocha przez 3 dni po 40 minut. Do doświadczeń z każdą pożywką przeznaczono po 6 kolbek lub 6 szalek. W czasie trwania hodowli w przypadku pożywek stałych

Tabela 1 — Table 1

Kielkowanie zarodników *Botrytis anthophila* Bond. w zależności od temperatury, podłoża i czasuGermination of *Botrytis anthophila* Bond. spores depending on temperature and time

Temperatura Temperature	Podłoże Medium	Suma zarod. w 5-ciu kroplach Quantity of spores in 5 drops	Ilość zarodników skielkowanych, w % No. of spores germinating. %				
			po godzinach: — after hours:				
			6	8	12	24	48
15°C	Woda destylow. (distilled water)	95	—	—	7,4	7,4	7,4
	10% glukoza	71	—	—	16,9	16,9	16,9
	25%	90	—	—	16,7	20,0	20,0
	2,5% roztw. brzezki malt soil	83	—	—	10,8	10,8	10,8
20°C	Woda destylow. (as above)	76	—	—	5,3	7,9	7,9
	10% glukoza	92	—	—	11,9	18,5	18,5
	25%	66	—	3,0	22,8	47,0	47,0
	2,5% roztw. brzezki	79	—	—	10,8	12,1	18,5
23°C	Woda destylow. (as above)	83	—	12,0	16,8	21,7	24,1
	10% glukoza	87	5,7	26,4	48,2	56,3	71,2
	25%	68	10,3	42,6	58,8	66,2	86,7
	2,5% roztw. brzezki	82	2,4	15,8	32,9	48,8	52,4
25°C	Woda destylow. (as above)	79	1,3	15,2	26,0	31,6	31,6
	10% glukoza	81	4,9	24,7	48,1	51,8	59,2
	25%	99	12,1	32,3	52,5	85,8	85,8
	2,5% roztw. brzezki	62	1,6	16,1	29,0	70,9	80,6
28°C	Woda destylow. (as above)	93	—	4,3	5,4	9,7	9,7
	10% glukoza	68	—	39,7	42,6	58,8	58,8
	25%	90	—	46,6	56,6	68,9	68,9
	2,5% roztw. brzezki	83	—	14,5	21,1	32,6	32,6
30°C	Woda destylow. (as above)	72	—	—	—	—	—
	10% glukoza	87	—	—	—	—	—
	25%	94	—	—	—	—	—
	2,5% roztw. brzezki	70	—	—	—	—	—

co 10 dni mierzono przyrosty liniowe kultur oraz notowano wygląd kolonii i stopień jej zarodnikowania. Po upływie 30 dni pożywki stałe rozpuszczano ogrzewając szalki w autoklawie, a następnie sączono je (na



Ryc. 1. Kielkowanie zarodników *Botrytis anthophila* Bond.

A — w wodzie destylowanej w zależności od temperatury i czasu; B — w 10% roztworze glukozy w zależności od temperatury i czasu

The germination of spores *B. anthophila* Bond.

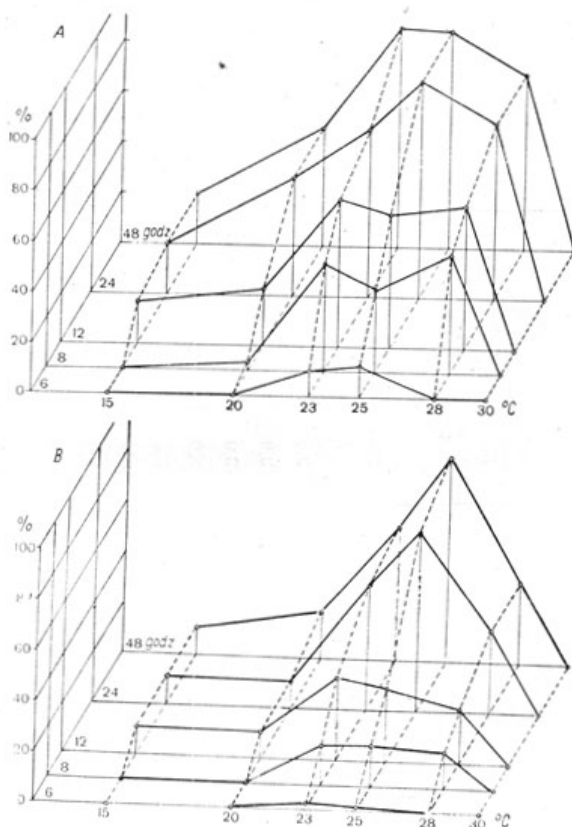
A — in distilled water in dependence of temperatures and time; B — in 10% glucose in dependence of temperatures and time

lejku Büchnera pod zmniejszonym ciśnieniem) przez sącziki uprzednio zważone do stałego ciężaru. Resztki agaru wymywano gorącą wodą. W przypadku pożywek płynnych sączone je od razu przez sącziki. Sącziki z grzybnią suszono przez 14 godzin w temp. ok. 105°C, a następnie zważono.

Opis kultury. Kultury grzyba na pożywce agarowo-brzeczkowej były początkowo białawe, puszyste, jednakże z czasem nieznacznie ciemniejące, a na powierzchni niektórych z nich obserwowano proszkowany nalot złożony z zarodników powstających na trzonkach konidialnych.

Na pożywce agarowej zawierającej wyciąg z nasion koniczyiny czerwonej grzyb w porównaniu z innymi rósł lepiej, dając charakterystyczne rudawobrnatne zabarwienie podłoża. Ponadto, zaobserwowano tu również pewne różnice w wyglądzie kultur, co posłużyło za podstawę wyodrębnienia dwóch form hodowlanych *Botrytis anthophila*.

Pierwsza forma (ryc. 3 A) tworzyła białą puszystą grzybnię powietrzną o bardzo delikatnym różowym odcieniu. W zarysie kultura grzyba była mniej więcej okrągława, raczej płaska, otoczona 2—3 mm obwódką złożoną z luźnych strzępek grzybni, na których widoczne były pod mikro-



Ryc. 2. Kielkowanie zarodników *Botrytis anthophila* Bond.

A — w 25% roztworze glukozy w zależności od temperatury i czasu; B — w wodzie + roztworze brzożki (2,5%) w zależności od temperatury i czasu

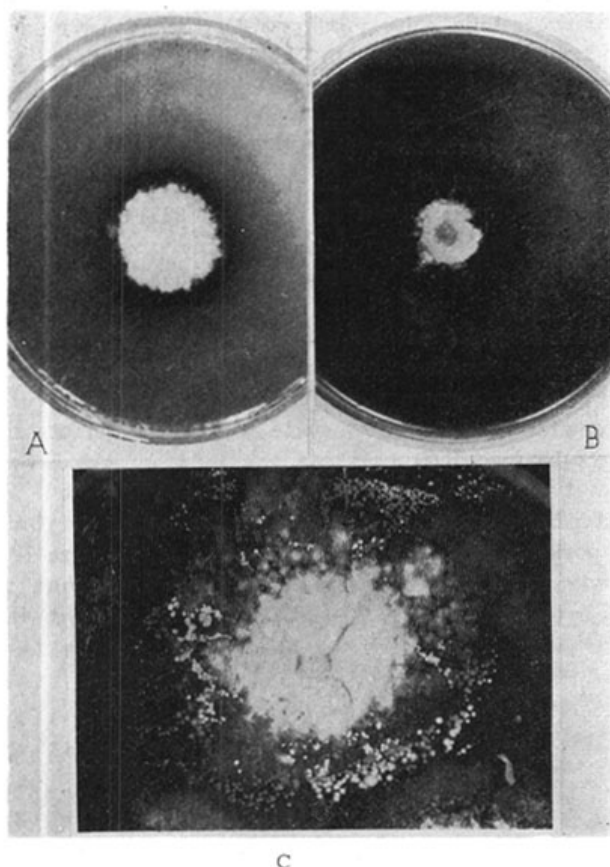
The germination of spores *B. anthophila* Bond.

A — in 25% glucose in dependence of temperatures and time; B — in water with malt extract (2.5%) in dependence of temperatures and time

Tabela 2 — Table 2

Zmiany pH pożywki w czasie wzrostu *Botrytis anthophila* Bond.
Changes pH of medium during growth of *Botrytis anthophila* Bond.

pH pożywki przed zaszczepieniem pH of medium before inoculation	po 7-miu dniach after 7 days			po 14-tu dniach after 14 days			po 21-dniach after 21 days			po 28-miu dniach after 28 days		
	pH podczas wzrostu during growth	pH po- żywki kontroln. pH of control medium	Cieżar grzybn. weight of myc. in mg	pH podczas wzrostu during growth	pH po- żywki kontroln. pH of control medium	ciężar grzybn. weight of myc. in mg	pH podczas wzrostu during growth	pH po- żywki kontroln. pH of control medium	ciężar grzybn. weight of myc. in mg	pH podczas wzrostu during growth	pH po- żywki kontroln. pH of control medium	ciężar grzybn. weight of myc. in mg
	2,1	2,7	2,3	—	2,0	2,0	—	2,0	2,0	—	2,0	2,0
2,6	2,7	2,7	—	2,6	2,65	—	2,5	2,6	—	2,8	2,7	—
3,5	3,3	3,0	32,2	3,0	3,9	67,6	2,7	3,0	72,1	3,1	3,0	76,6
4,4	3,3	4,6	50,3	3,0	4,6	110,8	2,7	4,5	109,1	2,9	4,7	113,5
5,1	3,4	5,3	30,1	3,0	5,3	59,7	2,7	5,2	65,2	3,0	3,1	68,7
5,7	3,3	5,9	28,7	3,0	5,7	54,2	2,8	5,6	63,0	3,0	5,7	66,7
5,9	4,5	5,9	32,9	6,0	5,9	69,1	2,8	5,9	75,2	3,0	6,0	77,5
6,6	5,9	6,6	52,1	3,1	6,7	96,3	3,2	6,6	99,8	2,7	6,7	101,7
7,5	6,3	7,5	—	5,0	7,5	—	5,3	7,6	—	5,2	7,6	—
8,0	7,6	8,0	—	6,9	8,0	—	7,6	8,05	—	6,9	8,05	—
8,7	8,0	8,3	—	8,0	8,3	—	8,5	8,4	—	8,5	8,5	—
8,9	8,3	8,7	—	8,3	8,5	—	8,4	8,5	—	8,0	8,1	—
9,1	8,2	8,3	—	8,3	8,3	—	8,5	8,2	—	8,0	8,1	—
10,4	8,9	9,4	—	9,0	9,4	—	9,2	8,7	—	8,7	9,4	—



Ryc. 3. Kultury grzyba *Botrytis anthophila* Bond.

A — forma hodowlana z bardziej puszystą grzybnią i mniejszą ilością trzonków konidialnych; B — forma hodowlana charakteryzująca się proszkowatym nalotem składającym się z zarodników grzyba; C — kultura z widocznymi pseudosklerocjami

The cultures of *Botrytis anthophila* Bond.

A — form with fluffier mycelium and smaller number of conidiophores; B — form with a characteristic powder-like coating which consists of spores; C — culture with visible pseudosclerotia

skopem bardzo rzadko występujące trzonki konidialne. Grzybnia była wielokomórkowa, wypełniona ziarnistością, w której widoczne były kropelki tłuszczu. Utworzone na grzybni trzonki konidialne były krótkie, słabo rozgałęzione i pokryte niewielką liczbą zarodników. Zarodniki konidialne były przeważnie bezbarwne, jajowate lub elipsoidalne przeciętnie $14,72 \times 6,77 \mu$.

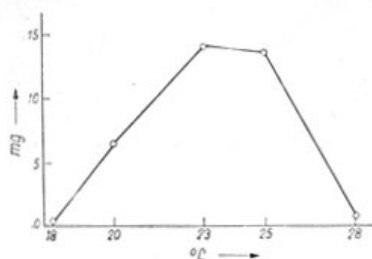
Druga forma hodowlana (ryc. 3 B) tworzyła kolonię nieco bardziej wzniesioną nad powierzchnię pożywki. Grzybnia powietrzna była skąpo

widoczna, a powierzchnię kultury pokrywał proszkowany nalot utworzony z trzonek i zarodników konidialnych. Trzonki konidialne miały liczne rozgałęzienia. Zarodniki konidialne tworzące się w dużych ilościach były bardzo różnorodnych kształtów: podłużne, jajowate, elipsoidalne i gruszkowate. Wymiary zarodników: $15,15 \times 5,81 \mu$.

Pierwsza z wymienionych form podobna była do grzyba opisanego przez Silow a *Botrytis trifolii* (Kingma 1927) otrzymanego od prof. Westerdijska z Holandii. Obydwie formy grzyba tworzyły na pożywce wyciągowej z nasion opisaną wyżej charakterystyczną pigmentację podłoża.

W kulturach *Botrytis anthophila*, trzymany na świetle przez 3 tygodnie, zaobserwowano tworzenie się na powierzchni agaru drobnych, \pm okrągłych, początkowo żółtych, później żółtooliwkowych utworów będących pseudosklerotami. Utwory te w dużej ilości otaczały kolonię rosnącego grzyba (ryc. 3 C).

Wpływ temperatury na wzrost grzybni. W doświadczeniach dotyczących wpływu temperatury na wzrost grzybni hodowano kultury na pożywce agarowo-brzeczkowej w temperaturze 18, 20, 23, 25 i 28°C. Stwierdzono, że dla wzrostu *Botrytis anthophila* najbardziej sprzyjająca była temperatura 23—25°C (wykres na ryc. 4). Zarówno



Ryc. 4. Wpływ temperatury na wzrost *Botrytis anthophila* Bond. na pożywce agarowo-brzeczkowej

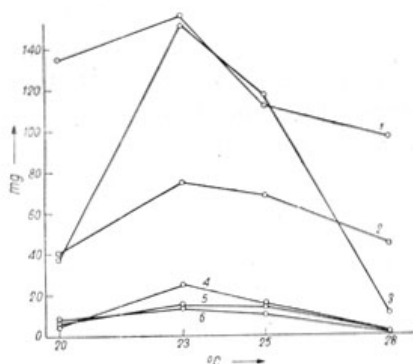
The influence of temperature on the growth of *Botrytis anthophila* Bond. on the beer-wort agar

ciężar suchej masy grzybni (14,1—13,6 mg) jak i średnica kolonii mierzona po 30 dniach hodowli (14,0—13,5 mm oraz $16,8 \times 19,8$ mm) są w tych temperaturach największe. Bardzo słaby wzrost obserwowano w temperaturze 18 i 28°C.

Wpływ podłoża na wzrost grzybni. Do badań zastosowano następujące pożywki stałe: agarowo-brzeczkową, agarowo-ziemniaczaną z glukozą, agarową z wyciągiem z nasion, owsianą używaną przez Bondarcewą-Monterwerdze oraz dwie pożywki mi-

neralne, płynne, z których jedna miała sacharozę jako źródło węgla, druga zaś glukozę (skład wg Lilly i Barnetta).

Obserwując wzrost grzyba na różnych pożywkach zarówno stałych, jak i płynnych stwierdzono, że najlepszą dla wzrostu okazała się pożywka zawierająca w swym składzie wyciąg z nasion koniczyny (wykres na ryc. 5). Sucha masa grzybni 30-dniowej kultury hodowanej na tej



Ryc. 5. Ciężar grzybni *Botrytis anthophila* (w mg) na różnych pożywkach:

1 — wyciągowa z nasion, 2 — płynna z glukozą, 3 — płynna z sacharozą, 4 — dekstrozowo-ziemniaczana, 5 — agarowo-brzeczkwowa, 6 — owsiana

Dry weight of mycelium (in mg) of *Botrytis anthophila* obtained on diferent medium:

1 — seeds extract medium, 2 — glucose medium (fluent), 3 — sacharose medium (fluent), 4 — potato-dekstroze agar, 5 — beer wort agar, 6 — oats medium

pożywce w temperaturze optymalnej wynosiła 150,6 mg. Równocześnie średnica rozwijającej się kolonii była największa, gdyż osiągnęła w tym przypadku $67,2 \times 83,8$ mm. Podobny wzrost obserwowano także na pożywce płynnej, w skład której jako źródło węgla wchodziła sacharoza. Na pozostałych pożywkach *Botrytis anthophila* rosła słabiej: na pożywce owsianej ciężar suchej masy grzybni wynosił 13,2 mg, na agarowo-brzeczkwowej 14,1 mg, na dekstrozowo-ziemniaczanej 24,3 mg.

Wpływ odczynu podłoża na wzrost *Botrytis anthophila*. Zastosowano pożywkę płynną z sacharozą (wg Lilly i Barnetta), którą doprowadzano za pomocą 0,1 n HCl i 1 n NaOH do żądanego odczynu. Po wysterylizowaniu pożywki wykazywały następujące pH: 2,1, 2,6, 3,5, 4,4, 5,1, 5,7, 5,9, 6,6, 7,8, 8,0, 8,7, 8,7, 8,9, 9,1 i 10,4. Odczyn pożywki mierzono pehametrem lampowym typu LBS-3A używając elektrody szklanej i kalomelowej. Po zaszczepieniu trzymano kultury w temperaturze 23°C. Hodowlę prowadzono w ciągu 28 dni. Co 7 dni mierzono pH pożywki przeznaczając na każdy odczyn (powtórzenie) 3 kolbki. Oddzieloną od pożywki grzybnię suszono i oznaczano jej suchą

masę. Równocześnie mierzono pH pożywek kontrolnych przetrzymywanych w tych samych warunkach.

Stwierdzono, że wzrost grzyba rozpoczyna się powyżej pH 2,6 i ustaje przy pH 7,5 (tabela 2). Poza tymi granicami nie obserwowano rozwoju grzyba. Najlepszy wzrost wyrażony ciężarem grzybni po 28 dniach otrzymano na pożywce o wyjściowej wartości pH 4,4. Odczyn ten w czasie hodowli grzyba stopniowo się zmieniał i w chwili likwidacji doświadczenia pH pożywki wynosiło 2,9. Na pożywkach, na których obserwowano wzrost grzyba (granice pH: 3,5—6,6), stwierdzono w momencie zakończenia doświadczenia spadek wartości pH do 3,0. Zaobserwowano także, że odczyn pożywek kontrolnych uległ nieznacznie zmianie. Prawdopodobnie wywołane to było działaniem warunków zewnętrznych, w jakich trzymano pożywki. Z tego względu, że na stężenie jonów wodorowych w pożywce ma wpływ wiele czynników jak: skład pożywki, temperatura, objętość i okres wzrostu grzyba, uzyskane dane należy traktować jedynie jako orientacyjne. Do ścisłego oznaczenia pH należałoby zastosować pożywki zbuforowane.

WNIOSKI

1. Kiełkowanie zarodników *Botrytis anthophila* przebiega w temperaturze 15—28°C. Najlepiej kiełkują one w temperaturze 23—25°C. Jeżeli chodzi o podłoże, to proces kiełkowania najlepiej przebiega w 25% roztworze glukozy.

2. Temperatura 23—25°C jest optymalna dla wzrostu *Botrytis anthophila*. Z kilku przebadanych pożywek, zarówno stałych jak i płynnych, najbujniejszy wzrost otrzymano na pożywce agarowej zawierającej wyciąg z nasion koniczyny czerwonej.

3. Wyróżniono dwie formy hodowlane *Botrytis anthophila*. Jedna z nich odznaczała się silnym wzrostem delikatnej, puszystej, powietrznej grzybni o słabo różowym zabarwieniu oraz niewielką liczbą wytwarzanych zarodników. Kolonie drugiej formy, o zabarwieniu beżowym miały bardzo mało grzybni powietrznej, lecz w porównaniu do poprzedniej obficie zarodnikowały.

4. Ustalony w wyniku badań zakres odczynu pH, przy którym możliwy jest wzrost *Botrytis anthophila*, mieści się w granicach 3,5—6,6 przy czym najbardziej sprzyjająca jest pożywka o odczynie pH 4,4.

SUMMARY

1. Germination of *Botrytis anthophila* spores occurs at 15—28°C. The optimum temperature is 23—25°C. The most suitable medium for germination is 25% glucose solution.

2. The temperature 23—25°C is optimal for the growth of *Botrytis anthophila*. From among the media tested, both solid and liquid, the most abundant growth was noted on agar medium containing extract from red clover seeds.

3. In the culture two forms of *Botrytis anthophila* were distinguished. One exhibited a strong growth of the delicate fluffy aerial mycelium of a light pink colour, and produced a small number of spores. The colonies of the second form beige in colour had but little aerial mycelium, but as compared with the former one they sporulated more profusely.

4. The pH range was determined at which the growth of *Botrytis anthophila* is possible, it amounts to 3.5—6.6. The most favourable is a medium with pH 4.4.

LITERATURA

- Bondarcew A. S., 1927, Bolezni kulturnych rastenij i mery borby z nimi, Główny botaniczski sad SSR 352—354.
- Bondarcewa-Monterwerdze W. N., Wasilewski N. I., 1940, K biologii i morfologii niekotorych vidov *Ascochyta* na bobowych, Sporovyje rastienija 4: 345—376, Moskwa—Leningrad.
- Mejer A. A., Kriyodubskaja N. I., 1939, Mikroflora semjan krasnogo klevera w svjazi z metodami fitopatologičeskoj ekspertizy klevernych semjan, Trudy Baškirskogo Selskochozjajstwiennogo Instituta 2:255—283.
- Noble M., 1946, Seed borne diseases of clover Proceedings of jubilee Meeting held in London 20—25 October 1946 (Comprising volume XXX of Society's Transactions 1948 Cambridge university press).
- Lilly V. Y., Barnett H. L., 1951, Physiology of fungi (Przekład polski: Fizjologia grzybów — 1959).
- Ramazanowa S. S., 1958, Nove v biologii vzbuditiela cvetčnoj pleseni klevera *Botrytis anthophila* Bond., Trudy Vsesojuznogo Instituta Zaščita rastenij 10:153—165.
- Silov R. A., 1933, A systemic disease of Red Clover caused by *Botrytis anthophila* (Bond.) Trans., Brit. Mycol. Soc. 18:239—248.