

EDWARD ARSENIUK

## CZYNNIKI FIZYCZNE, CHEMICZNE I BIOLOGICZNE INDUKUJĄCE TWORZENIE OOSPOR PRZEZ HETEROTALICZNE GATUNKI RODZAJU *PHYTOPHTHORA*

PHYSICAL, CHEMICAL AND BIOLOGICAL FACTORS INDUCING OOSPORES FORMATION  
IN THE HETEROTHALIC SPECIES OF *PHYTOPHTHORA*

### Wstęp

Wcześniej [1] omówiono rodzaje homotalizmu i heterotalizmu oraz specyficzną bądź hormonalną indukcję tworzenia oospor u rodzaju *Phytophthora*. Oprócz indukcji specyficznej u heterotalicznych gatunków wzmiankowanego rodzaju istnieje jeszcze niespecyficzna indukcja tworzenia oospor. Dotychczas wykryto wiele czynników indukujących tworzenie gametangiów, a następnie zarodników przetrwalnikowych, lecz mechanizm ich działania jest zazwyczaj nieznan. Niektóre z tych czynników zwiększają tylko liczbę tworzonych oospor, inne zaś uruchamiają cały mechanizm procesu płciowego. Ten sposób stymulowania grzybni *Phytophthora* do tworzenia oospor nosi nazwę indukowanej wsobności.

### Czynniki zwiększające liczebność oospor

Wpływ światła na reprodukcję płciową *Phytophthora* jest znany od dawna. Kultury poddane działaniu spektrum światła widzialnego tworzą tylko nieliczne oospory. Według Harnisha [8] spektrum fal świetlnych hamująco działających na tworzenie oospor u *P. cactorum* i *P. capsici* mieściło się w zakresie 390—600 nm. Całkowita ciemność i światło fluoryzujące zaś wydatnie zwiększają ilość tworzonych oospor [12].

Temperatury optymalne dla tworzenia oospor mieszczą się w zakresie 20—24°C [5, 6, 10, 21].

Składniki odżywcze, tlen i CO<sub>2</sub> mają duży wpływ na ilość tworzonych oospor [6, 10, 14, 20]. Wszystkie niezbędne do reprodukcji płciowej składniki pokarmowe patogeny te czerpią z tkanek roślinnych.

Z chwilą wprowadzenia pożywek syntetycznych właściwie zdano sobie sprawę, co jest niezbędne dla normalnego rozwoju tych grzybów. Oprócz wspomnianych steroli [1] bardzo ważny w pożywce jest stosunek C:N. Za optymalny uważany jest stosunek 28:1. Nadmierne odchylenie od tej proporcji powoduje absorpcję oospor [6, 13].

Ko [11] utrzymuje, że używanie agarozy zamiast agaru do zestalania pożywki zwiększa liczbę produkowanych oospor. Problem polega na tym, że agar posiada silne właściwości wiążące w stosunku do związków chemicznych. W ten sposób są one inaktywowane i niedostępne rosnącej grzybni.

### Czynniki indukujące wsobność

W przeszłości podejmowano próby indukowania produkcji oospor przez heterotaliczne gatunki *Phytophthora* dodając do pożywki filtry z uprzednio krzyżowanych kultur. Niestety wszystkie próby kończyły się niepowodzeniem. Jest co prawda doniesienie Galloway'a [7] o produkcji oospor przez pojedyncze kultury *P. meadii* i *P. colocasiae*, ale doświadczenie to wykonano w 1936 roku i jak dotychczas nikt uzyskanych wówczas wyników nie potwierdził.

Kilka lat temu Brasier [4] donosił o produkcji oospor przez 12 izolatów *P. palmivora* spośród 23 przetrzymywanych pod olejem parafinowym, a następnie przeszczepionych na pożywkę. Niestety ta zdolność do wsobnego tworzenia oospor była tracona po kilku przeszczepieniach i izolaty powracały do pierwotnej formy  $A_1$  bądź  $A_2$ .

Według Tsao [22] wiek kultury gatunku heterotalicznego może mieć istotny wpływ na tworzenie oospor. Sześciomiesięczne lub starsze izolaty  $A_1$  i  $A_2$  *P. parasitica* tworzyły 5—70 oospor na  $\text{mm}^2$  pożywki. Badacz ten sugeruje, że starsza grzybnia może produkować substancję chemiczną niezbędną do przełamania bariery niezgodności. Autor niniejszego artykułu podejmował próby powtórzenia doświadczenia wykonanego przez Tsao, jednakże za każdym razem uzyskiwano tylko negatywne wyniki.

Reeves and Jackson [19] dowodzą, że mechaniczne uszkodzenie grzybni izolatów  $A_2$  *P. cinnamomi* indukowało tworzenie przez te izolaty gametangiów, a następnie oospor. Z innych heterotalicznych gatunków tylko jeden izolat *P. cryptogea* tworzył oospory. Izolaty typu  $A_1$  żadnego z badanych gatunków oospor nie tworzyły. Dwa gatunki homotaliczne, *P. citricola* i *P. cactorum*, w reakcji na mechaniczne uszkodzenie korkoborem tworzyły więcej oospor (tab. I). Oprócz mechanicznych uszkodzeń grzybni korkoborem, bądź skalpelem, również uszkodzenia powodowane przez eter lub  $\text{H}_2\text{O}_2$  stymulowały tworzenie oospor przez izolaty typu  $A_2$  *P. cinnamomi*.

Według wyżej wymienionych badaczy (tab. I) gatunki *Phytophthora* hodowane na zabitych termicznie nasionach konopi tworzyły mniej gametangiów, a następnie oospor. Taka reakcja może być spowodowana usunięciem substancji stymulujących, lub wyprodukowaniem substancji hamujących podczas sporządzania wyciągu z martwych nasion.

Tabela I

Wpływ mechanicznego uszkodzenia grzybni na rozmnażanie płciowe izolatów *Phytophthora* sp. hodowanych na nasionach konopi i pożywce syntetycznej (wg [19])

Izolat	Typ zgodności	Oospory					
		SP		LUS		DS	
		Uszkodz.	Kontrola	Uszkodz.	Kontrola	Uszkodz.	Kontrola
<i>P. combivora</i>	A <sub>2</sub>	—	—	N	—	—	—
<i>P. combivora</i>	A <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—
<i>P. cinnamomi</i>	A <sub>2</sub>	+	+	—	—	N	—
<i>P. cinnamomi</i>	A <sub>2</sub>	+	—	+	—	—	—
<i>P. cinnamomi</i>	A <sub>2</sub>	+	—	+	—	N	—
<i>P. cinnamomi</i>	A <sub>1</sub>	—	—	—	—	—	—
<i>P. cinnamomi</i>	A <sub>1</sub>	—	—	1	—	—	—
<i>P. cinnamomi</i>	A <sub>1</sub>	—	—	—	—	—	—
<i>P. cryptogea</i>	A <sub>2</sub>	+	—	—	—	—	—
<i>P. cryptogea</i>	A <sub>1</sub>	—	—	—	—	—	—
<i>P. nicotianae</i>	A <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—
<i>P. citricola</i>	homotaliczny	nb	nb	26,6 *	15,2	15,5	6,4
<i>P. cactorum</i>	homotaliczny	nb	nb	24,6	17,3	16,0	10,9

\* — średnio/mm

N — nieliczne, nb — nie badano

„+” — oospory obecne, „—” — brak oospor

SP — pożywka syntetyczna: (g/l destylowanej H<sub>2</sub>O), D — glukoza, 10, L — asparagina, 0,6, tiamina — HCL, 0, 001, cholesterol, 0,003; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,005; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,002; CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O, 0,01; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,002; agar, 17.

LUS — pożywka z wyciągu żywych nasion konopi (50 g/l), zestalane agarem

DS — pożywka z wyciągu nasion konopi zabitych termicznie, zestalane agarem

Także wiek grzybni odgrywa istotną rolę w płciowej reakcji *P. cinnamomi* na uszkodzenie. Najsilniej reagowały kolonie 3-dniowe (tab. II), co wskazuje, że najbardziej wrażliwą jest młoda grzybnia [19].

Noon i Hickman [16] badając skuteczność chloronebu (Demosan 65 WP) w zwalczaniu grzybów z rodzaju *Phytophthora* odkryli, że izolaty A<sub>2</sub> *P. capsici* tworzyły oospory pod wpływem działania tego środka. Oospory tworzyły się po 5—6 tygodniach od dodania chloronebu do pożywki V-8, poczynając od dawki 3 µg/ml/ppm/ wzwyż. Także gatunek ten tworzył oospory, gdy grzybnia była poddana tylko działaniu par chloronebu. Interesujące jest to, że produkcja oospor była kontynuowana nawet wtedy, gdy grzybnię przeszczepiono na pożywkę pozbawioną tego fungicydu. Zjawisko to sugeruje, że chloroneb spowodował trwałą zmianę w grzybni czyniąc ją zdolną do ciągłej produkcji oospor. Być może zdolność ta wytworzyła się w wyniku mutacji. Niestety odkrycia dwóch wyżej cytowanych badaczy dotychczas nie potwierdzono. Przymuszczać mogli oni pracować z wtórnie homotalicznym izolatem *P. capsici*.

Inny, z dość rozlegle badanych czynników powodujących tworzenie oospor, jest tzw. efekt Trichodermy [3, 5, 9, 17, 18]. W wyniku badań wielu badaczy dowie-

Wpływ wieku kultury na reakcję płciową grzybni *P. cinnamomi* po uszkodzeniu strzępek korkoborem (wg [19])

Przybliżony wiek strzępek podczas uszkodzenia (dni)	Wiek kolonii podczas uszkodzenia (dni)	Połączone gametangia	
		średnia liczba	3 krążki
		Uszkodzona	Kontrola
0—1	2	24	0
0—1	3	39,3	0
0—1	4	32,6	0
1—2	4	0,5	0
2—3	4	0	0
3—4	8	0,7	0

dziono, że *Trichoderma viride*, *T. koningii*, *T. piluliferum* i *T. polysporum* są zdolne do indukcji wosbnego tworzenia oospor przez heterotaliczne gatunki *Phytophthora*. Wymienione gatunki z rodzaju *Trichoderma* pospolicie zasiedlają powierzchnie korzeni różnych roślin [3, 17, 18].

Pierwszym badaczem, który odkrył efekt *Trichodermy* w hodowli sztucznej był Brasier [5]. Badacz ten zauważył, że przypadkowo zakażona kultura *P. cinnamomi* przez *T. viride* wytworzyła oospory. W wyniku dalszych badań okazało się, że reakcja płciowa ograniczona jest tylko do izolatów typu  $A_2$  różnych heterotalicznych gatunków *Phytophthora*. Jedne z tych gatunków mogą reagować silniej, inne zaś słabiej (tab. III).

Kultury heterotalicznych gatunków *Phytophthora* reagujące na substancje lotne wydzielane przez gatunki *Trichoderma* tworzą gametangia zazwyczaj w ciągu 2—4 dni, a więc znacznie szybciej niż w przypadku kojarzenia dwóch komplementarnych izolatów. Ciągła ekspozycja kultur *Phytophthora* na działanie substancji lotnych *Trichoderma* nie jest konieczna. Po kilkugodzinnym kontakcie kultury mogą być rozdzielone bez dalszego ujemnego wpływu na tworzące się oospory [5]. Należy pamiętać, że gatunki *Trichoderma* są często nadpasożytami *Phytophthora* [5].

Indukowanie tylko izolatów typu  $A_2$  *Phytophthora* sp. przez substancje lotne wydzielane przez wyżej wymienione gatunki *Trichoderma* sp. wskazuje na ich chemiczne pokrewieństwo ze związkiem chemicznym produkowanym przez izolaty typu zgodności  $A_1$  w krzyżówkach  $A_1 \times A_2$ . Należy nadmienić, że zarówno w krzyżówkach  $A_1 \times A_2$  *Phytophthora* spp., jak i przy użyciu izolatów *Trichoderma* konieczny jest egzogeniczny dodatek steroli do pożywki, niezbędnych do normalnej produkcji oospor.

Haskins i Gardner [9] dowiedli, że zarówno gatunki *Pythium*, jak i *Phytophthora* są w stanie pobierać sterole z grzybni *Trichoderma*. Na pożywkach bez steroli *Pythium acanthicum*, *P. arrhenomanes* i *P. sylvaticum* tworzyły oospory, gdy ich grzybnia była w bezpośrednim kontakcie z grzybnią *Trichoderma*. Wymienione gatunki *Pythium* są nadpasożytami grzybów i pomimo tego że *Trichoderma* jest również nadpasożytem były w stanie pobrać niezbędną dla nich ilość steroli z grzybni *Tri-*

TABELA III

Heterotaliczne gatunki *Phytophthora* sp. pogrupowane i uszeregowane według zdolności reakcji na substancje lotne *Trichoderma* sp. (wg [3])

Gatunek	% reagujących izolatów A <sub>2</sub>	Liczba testowanych izolatów A <sub>3</sub>	Gospodarz		Typ sporogialny
			korzenie	część nadziemna	
<b>Grupa A: reakcja silna i niezawodna</b>					
<i>P. cinnamomi</i> Rands	100	30	Z	—	T
<i>P. combivora</i> (Petri) Buism	100	15	Z	—	T
<b>Grupa B: reakcja zmienna</b>					
<i>P. palmivora</i> Butler	75	4	Z	—	T
<i>P. drechsleri</i> Tucker	66	3	NZ, Z	—	T
<i>P. cryptogea</i> Pethybr i Lafferty	60	5	NZ, Z	—	T
<i>P. nicotianae</i> Breda de Flaah	33	6	NZ, Z	NZ, Z	P
<b>Grupa C: reakcji brak lub reakcja słaba</b>					
<i>P. infestans</i> de By	50	2	—	NZ	P
<i>P. palmivora</i> MF1	0	30	—	Z	P
<i>P. arecae</i> (Colem) Pethybr	0	2	—	Z	P

Z — zdrowniały, NZ — niezdrzewniały, T — trwały, P — przemijający, *P. palmivora* MF1 = typ „S”

*choderma* — rodzaju grzyba zdolnego do syntezy steroli. Zaś, z termicznie zabitej grzybni *Trichoderma* sp. sterole były pobierane nie tylko przez *P. acanthicum*, ale i przez *P. cinnamomi*.

Mechanizm działania czynników indukujących wsobność heterotalicznych gatunków *Phytophthora* sp. może być mechanizmem obronnym zabezpieczającym te gatunki przed wyniszczeniem. Charakterystyczną cechą tego mechanizmu jest to, że w zdecydowanej większości tylko izolaty typu zgodności  $A_2$  reagują pozytywnie na działanie czynników indukujących [3, 5, 16, 18, 19, 22].

Według niektórych badaczy [3, 5, 24, 25] typ  $A_2$  heterotalicznych gatunków *Phytophthora* sp. w przyrodzie występuje znacznie częściej niż typ  $A_1$  (tab. IV). Dane z literatury wskazują, że z pewnością tak jest w przypadku typu  $A_2$  *P. cinnamomi* [5, 25]. Natomiast uwzględniając dane dotyczące występowania typów

TABELA IV

Częstotliwość wyosobnienia izolatów typów zgodności  $A_1$  i  $A_2$  *P. cinnamomi*, *P. combivora* i *P. palmivora* (wg [3])

Częstotliwość

Gatunek	$A_1$	$A_2$
<i>P. combivora</i>	3	14
<i>P. palmivora</i>	3	15
<i>P. cinnamomi</i> (Anglia)	0	30
<i>P. cinnamomi</i> (świat)	28	632

zgodności  $A_1$  i  $A_2$  innych heterotalicznych gatunków *Phytophthora* w różnych częściach świata nie można wyciągnąć tak jednoznacznego wniosku. Uzyskane dotychczas dane są po prostu zbyt skąpe do wyciągnięcia tego rodzaju wniosków. Niektóre doniesienia są wręcz sprzeczne [5, 24, 25]. Z prac nad rozprzestrzenieniem w świecie i częstotliwością występowania typów zgodności  $A_1$  i  $A_2$  należy wyłączyć *P. infestans*, gdyż w przypadku tego gatunku typ  $A_1$  jest rozprzestrzeniony we wszystkich strefach geograficznych występowania roślin — gospodarzy, zaś występowanie typu  $A_2$  ograniczone jest tylko do Meksyku [1].

Tym niemniej należy podkreślić, że większa częstotliwość wyosobniania izolatów typu  $A_2$  jak też ich pozytywna reakcja na czynniki indukujące wsobność są cechami korzystnymi zwiększającymi zdolność przeżycia heterotalicznych gatunków *Phytophthora*. W przyrodzie nie zawsze mogą się spotkać w jednym miejscu izolaty obu typów zgodności i dlatego też czynniki indukujące wsobność odgrywają istotną rolę w rekombinacji genetycznej tych gatunków. Wysłunęto [5] nawet hipotezę o degeneracji mechanizmu zgodności u niektórych gatunków. W czasie genetycznej izolacji typów  $A_1$  i  $A_2$ , taka degeneracja jest przyspieszona jeśli typ  $A_2$  wsobnie powtarza tylko swój genotyp.

W podsumowaniu należy podkreślić, że heterotaliczne gatunki *Phytophthora* są obupłciowe, zróżnicowane na dwa typy kojarzeniowe, które same w sobie są samopłodne lecz samoniezdadne. Natura dostarczyła więc wiele możliwości przełamania tej bariery samoniezdadności, co zapewne zwiększa szanse przeżycia i adaptację do warunków środowiska heterotalicznych gatunków rodzaju *Phytophthora*.

## LITERATURA

- [1] Arseniuk E., 1984. Proceś płciowy w rozmnażaniu grzybów z rodzaju *Phytophthora* spp. Wiadomości botaniczne. 28: 131-144.
- [2] Barret J. T., 1948. Induced oospore formation in the genus *Phytophthora*. *Phytopathology* 38:2 (Abstr).
- [3] Brasier C. M., 1978. Stimulation of sex organ formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma* and its ecological implications. *Ann. Biol.* 89:135—139.
- [4] Brasier C. M., 1972. Observations on the sexual mechanism in *Phytophthora palmivora* and related species. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 58 (2): 237—251.
- [5] Brasier C. M., 1975. Stimulation of sex organ formation in *Phytophthora* by antagonistic species of *Trichoderma*. *New Phytologist* 74:183—198.
- [6] Christie T., 1958. Nutritional studies of *Phytophthora cactorum* New Zeal. *J. Sci.* 1:83—90.
- [7] Galloway L. D., 1936. Report of the imperial mycologist. *Scientific Reports. Pusa. Agr. Res. Inst.* 1934—35:120—130.
- [8] Harnish W. N., 1965. Effect of light on production of oospores and sporangia in species of *Phytophthora*. *Mycologia* 57:85—90.
- [9] Haskins R. H. and Gardner N. R., 1978. Effects of *Trichoderma* on sexual reproduction of some species of *Pythium* and *Phytophthora*. *Can. J. Bot.* 56:1651—1654.
- [10] Klure L. J. et al., 1977. The influence of temperature and nutrition on formation of sexual structures by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytophthora Newsletter*, no 5:30—31.
- [11] Ko W. H. et al., 1976. Effect of agar on inhibition of spore germination by chemicals. *Phytopathology* 66:363—366.
- [12] Leal J. A., Gomez-Miranda B., 1965. The effect of light and darkness on the germination of the oospores of certain species of *Phytophthora* on some synthetic media. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 48: 491—494.
- [13] Leal J. A. et al., 1967. The relation of the carbon nitrogen ratios in the basal medium to sexual reproduction in species of *Phytophthora*. *Mycologia* 59:953—954.
- [14] Mitchell D. J., Zentmyer G. A., 1971. Effects of oxygen and carbon dioxide tensions on sporangium and oospore formation by *Phytophthora* spp. *Phytopathology* 61:807—812.
- [15] Mukerjee N., Roy A. B., 1962. Microbial influence on the formation of oospores in culture by *Phytophthora parasitica* var. *sabdariffae*. *Phytopathology* 52:583—584.
- [16] Noon J. P. and Hickman C. J., 1974. Oospore production by a single isolate of *Phytophthora capsici* in the presence of chloroneb. *Can. J. Bot.* 52:1592—1595.
- [17] Pratt B. H. et al., 1972. Oospore production in *Phytophthora cinnamomi* in the presence of *Trichoderma koningii*. *Aust. J. Biol. Sci.* 25:861.
- [18] Reeves R. J. and Jackson R. M., 1972. Induction of *Phytophthora cinnamomi* oospores in soil by *Trichoderma viride*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 59:156—159.
- [19] Reeves R. J. and Jackson R. M., 1974. Stimulation of sexual reproduction in *Phytophthora* by damage. *J. Gen. Microbiol.* 84:303—310.
- [20] Roncadori R. W., 1965. A nutritional comparison of some species of *Phytophthora*. *Phytopathology* 55:595—600.
- [21] Smoot J. J. et al., 1958. Production and germination of oospores of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 48:165—171.

- [22] Tsao P. H., 1980. Homothallic oospore formation in single A<sub>1</sub> or A<sub>2</sub> mating type isolates of *Phytophthora parasitica* by the use of aged inocula. *Phytophthora Newsletter* no. 8:49—50.
- [23] Zentmyer G. A., 1952. A substance stimulating sexual reproduction in *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 42:24.
- [24] Zentmyer G. A. et al., 1973. Distribution of mating types of *Phytophthora palmivora*. *Phytopathology* 63: 663—667.
- [25] Zentmyer G. A., 1976. Distribution of the A<sub>1</sub> mating type of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 66:701—703.

Mgr Edward Arseniuk

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Immunologii Roślin,  
Radzików, 05-870 Błonie k. Warszawy